



CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

**“Interacción *in vitro* de *Actinobacillus pleuropneumoniae*
con células endoteliales de aorta de cerdo”**

Jorge Alberto Burciaga Nava

Tesis

**Para la obtención del grado de
Doctor en Ciencias Biológicas**

Tutor : Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera

Asesores:

Dr. Miguel A. Reyes Romero, UJED

Dr. Ricardo Mondragón Flores, CINVESTAV-IPN

Aguascalientes, Ags., diciembre 2008

La presente tesis fue parcialmente financiada por:

Proyecto: “Detección y prevención de enfermedades respiratorias del cerdo a través del concepto de Granja Limpia” (FOMIX-AGS-2005-01-15051), Centro de ciencias básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags.

Programa para el Mejoramiento del Profesorado de la Secretaría de Educación Pública (PROMEP-SEP) a través del Cuerpo Académico Biomédico, Facultad de Medicina Universidad Juárez del Estado de Durango, Durango, Dgo., México.

Jorge Alberto Burciaga Nava fue receptor de beca del Programa para el Mejoramiento del Profesorado (PROMEP/103.5/06/2639) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-203722) para estudios de doctorado.

Agradecimientos

Al C.P. Rubén Calderón Luján. Rector de la Universidad Juárez del Estado de Durango, por el impulso que ha dado a la superación del profesorado.

A la Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera por su aceptación hacia mi persona como su estudiante, por su guía y apoyo durante el desarrollo de mi tesis.

Al Dr. Ricardo Mondragón Flores por su valiosa contribución durante el desarrollo de mi tesis.

Al Dr. Miguel A. Reyes Romero por su valioso asesoramiento durante mi desarrollo académico y de mi tesis.

A mis compañeras del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.J.E.D.: Chelo, Soco, Betty, Pilar, Mely y Martha Angélica por su constante y desinteresado apoyo.

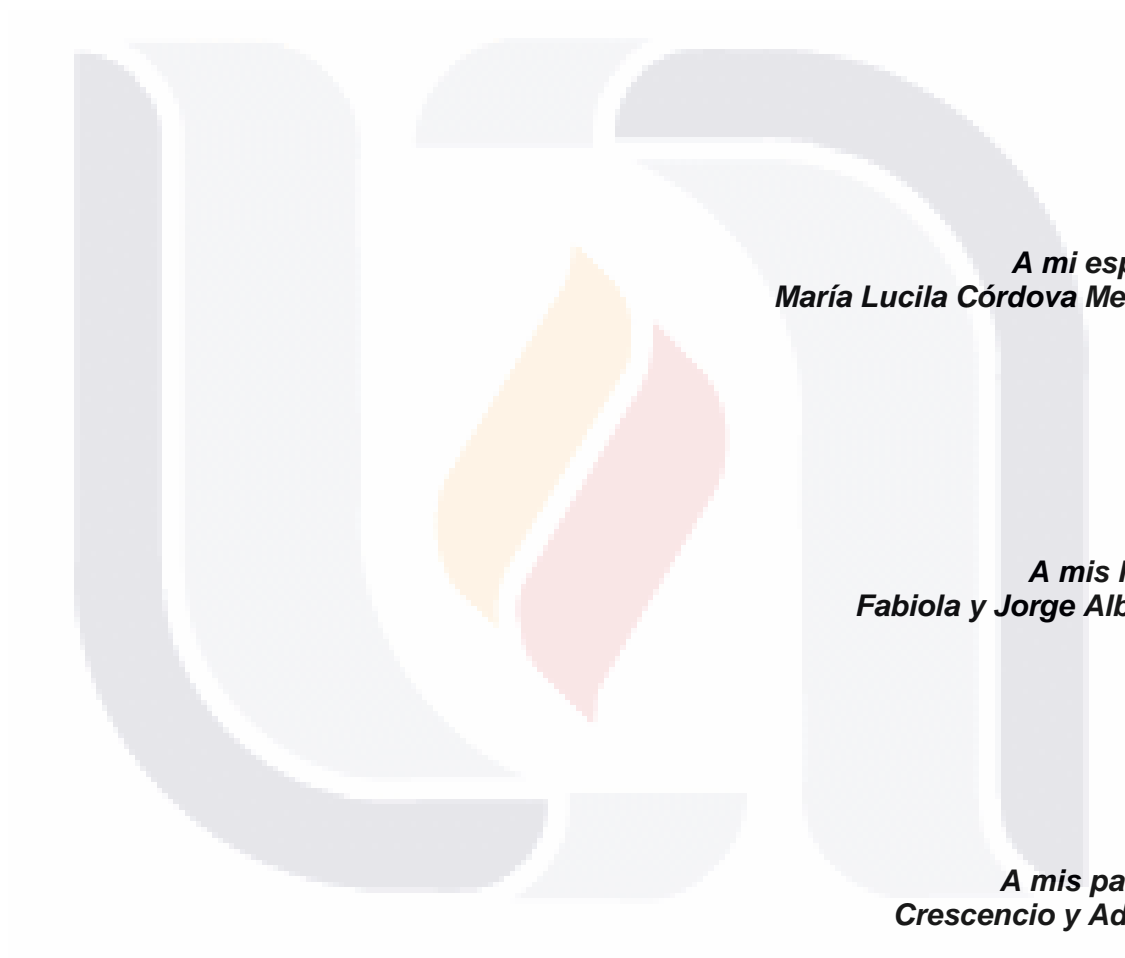
A la Facultad de Medicina de la U.J.E.D. por todas las facilidades otorgadas durante mi formación académica.

A todos los profesores del doctorado por todo lo otorgado.

Gracias

Jorge Alberto Burciaga Nava

DEDICATORIAS



***A mi esposa
María Lucila Córdova Medina***

***A mis hijos
Fabiola y Jorge Alberto***

***A mis padres
Crescencio y Adelita***

Resumen

Actinobacillus pleuropneumoniae es el agente etiológico de la pleuroneumonía porcina, enfermedad exclusiva de cerdos, altamente contagiosa presente en todo el mundo y de consecuencias letales. La enfermedad se caracteriza por pleuritis fibrosa y neumonía necrotizante hemorrágica con trombosis vascular pulmonar focal. En las etapas iniciales de la infección, la bacteria se adhiere y coloniza los tejidos del hospedero garantizando su supervivencia y proliferación. La interacción de *A. pleuropneumoniae* con células del tracto respiratorio porcino ha sido ampliamente estudiada y, aunque se ha detectado la presencia de la bacteria en sitios extrapulmonares, su fase hemática y la posible afectación del endotelio vascular no ha sido explorada. En el presente estudio se caracterizó la interacción *in vitro* de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 con una línea primaria de células endoteliales aisladas de aorta de cerdo así como el efecto citotóxico del sobrenadante de cultivo bacteriano sobre las células endoteliales. La adherencia de *A. pleuropneumoniae* a las células endoteliales se incrementó con la densidad de inóculo así como con el tiempo de incubación; la observación microscópica reveló la presencia de bacterias adheridas a la célula en forma dispersa; se demostró mediante un ensayo de protección por antibióticos que *A. pleuropneumoniae* puede internalizarse en las células endoteliales. El sobrenadante de cultivo provocó la muerte de células endoteliales por apoptosis y por necrosis. Los resultados obtenidos son similares al tipo de lesiones que se presentan en la enfermedad tales como denudación endotelial, trombohemólisis, necrosis y edema.

Índice de contenido

Capítulo 1. Introducción	1
1.1 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	2
1.1.1. Factores de virulencia.....	4
1.1.1.1. Cápsula.....	4
1.1.1.2. Lipopolisacárido (endotoxina)	5
1.1.1.3. Proteínas de membrana externa.....	7
1.1.1.4. Factores de adquisición de hierro.....	7
1.1.1.5. Exotoxinas	8
1.1.2. Otros factores de virulencia.....	9
1.1.2.1. Ureasa.....	9
1.1.2.2. Enzimas proteolíticas.....	10
1.1.2.3. Superóxido dismutasa.....	10
1.2. Interacción de <i>A. pleuropneumoniae</i> con células del hospedero.....	11
1.2.1. Adherencia.....	11
1.2.2. Internalización.....	13
1.3. El endotelio.....	14
1.3.1. Las células endoteliales.....	15
1.3.2. Función de las células endoteliales.....	16
1.3.2.1. Formación de nuevos vasos sanguíneos (neoangiogénesis).....	16
1.3.2.2. Control del tono vascular.....	16
1.3.2.3. Barrera selectiva entre la sangre y los tejidos.....	17
1.3.2.4. Función anticoagulante y antitrombótica.....	17
1.3.2.5. Participación en reacciones inflamatorias.....	17
1.3.2.6. Respuesta ante la fuerza de fricción del flujo sanguíneo	18
1.4. Interacción de patógenos con el endotelio.....	18
1.4.1. Adherencia e Invasión.....	19

1.4.2. Muerte celular.....	19
1.4.2.1. Muerte por necrosis.....	20
1.4.2.2. Muerte por apoptosis.....	20
1.5. Justificación.....	22
1.6. Hipótesis.....	23
1.7. Objetivo general.....	23
1.8. Objetivos específicos.....	24
Capítulo 2. Material y métodos.....	25
2.2. Aislamiento y cultivo de células endoteliales de aorta de cerdo.....	25
2.3. Caracterización del fenotipo endotelial.....	26
2.3.1. Captación de Ac-LDL-Dil.....	26
2.3.2. Inmunofluorescencia con anti CD-31 (PECAM).....	26
2.3.3. Inmunocitoquímica con anti CD-54 (ICAM).....	27
2.3.4. Migración celular.....	27
2.3.3. Curva de crecimiento.....	28
2.4. Bacteria y condiciones de crecimiento.....	29
2.5. Ensayo de citotoxicidad.....	30
2.6. Cuantificación de muerte celular por tinción con rojo neutro	
2.7. Detección de muerte celular por tinción con YO-PRO-1 e yoduro de propidio.....	31
2.8. Ensayo de adherencia.....	32
2.9. Microscopia electrónica de barrido (MEB).....	32
2.10. Reconocimiento específico de actina.....	33
2.11. Cuantificación de adherencia.....	33
2.12. Internalización de Actinobacillus pleuropneumoniae a células endoteliales.....	34
Capítulo 3. Resultados.....	36
3.1. Aislamiento y caracterización de células endoteliales de aorta de cerdo.....	36
3.2. Curva de crecimiento.....	40

3.4. Citotoxicidad del sobrenadante de cultivo de *A. pleuropneumoniae*
y tipo de muerte inducida 41

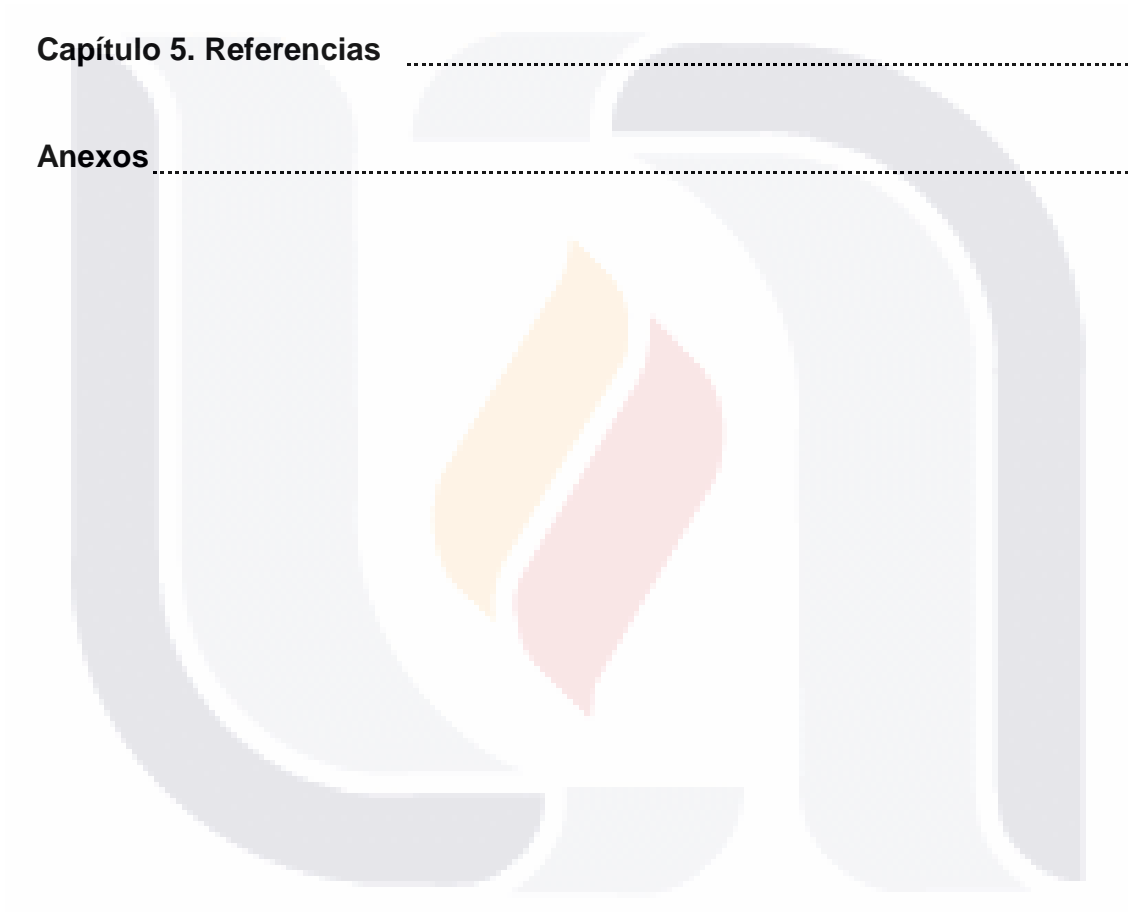
3.5. Adherencia de *A. pleuropneumoniae* a células endoteliales 46

3.6. Internalización de *A. pleuropneumoniae* a células endoteliales 51

Capítulo 4. Discusión y conclusiones 53

Capítulo 5. Referencias 59

Anexos 72



Capítulo 1

Introducción

1.1. *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Actinobacillus pleuropneumoniae es el agente etiológico de la pleuroneumonía porcina, enfermedad altamente contagiosa para la cual no existe una vacuna efectiva (Shope, 1964). Dicha enfermedad se caracteriza por la presencia de lesiones hemorrágicas en pulmones, ocasionadas por proteínas hemolíticas y citotóxicas producidas por la bacteria. La infección por *A. pleuropneumoniae* está distribuida por todo el mundo con graves repercusiones económicas para la industria porcícola (Bosse y cols., 2002).

A. pleuropneumoniae es un cocobacilo Gram negativo, mótil, no esporulado, formador de cápsula y perteneciente a la familia *Pasteurellaceae* (Inzana, 1990; Jessing y cols. 2008; Negrete-Abascal y cols., 2003); se organiza en colonias generalmente aisladas, en pares o en cadenas cortas. Inicialmente fue clasificado como *Haemophilus pleuropneumoniae* (Shope, 1964) posteriormente, la especie fue transferida al género *Actinobacillus* dadas sus características fenotípicas y a su alta homología con *Actinobacillus lignieresii* a nivel del ADN (Pohl y cols. 1983). Recientemente, mediante análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados de ADN (AFLP) se demostró que las cepas de *A. pleuropneumoniae* y *A. lignieresii* representan dos especies genéticas distintas (Kokotovic y Angen, 2007).

Existen dos biotipos de *A. pleuropneumoniae*: el biotipo 1 y el biotipo 2, los cuales se diferencian entre sí por su dependencia de NAD (dinucleótido de adenina y nicotinamida) para su crecimiento. El biotipo 1, el cual incluye 12 serotipos, es NAD dependiente mientras que el biotipo 2, con tres serotipos, no lo es. La diferencia entre los distintos serotipos se basa en su contenido de lipopolisacárido (LPS) de superficie y en su diversidad antigénica (Blackall y cols., 2002; Schaller y cols., 2001). Todos los serotipos son hemolíticos (Tarigan y cols., 1996), ureasa positivos (Bosse y MacInnes 2000) causan la misma enfermedad y la muerte en cerdos. Sin embargo, existen evidencias de que algunos serotipos son más virulentos que otros, esto debido en parte, a la producción de toxinas denominadas Apx (Kamp y cols., 1994). Los animales enfermos y aquellos que se han recuperado de la enfermedad son portadores de la bacteria y se cree que pueden transmitirla dentro y entre piaras (Chiers y cols., 2002). Al parecer, la ruta de infección es la transmisión directa por secreciones respiratorias entre cerdos, ya que la bacteria no puede sobrevivir sola por mucho tiempo en el medio ambiente (Velthuis y cols., 2002).

La prevalencia de la pleuroneumonía porcina varía de acuerdo a la situación geográfica y a los diferentes serotipos, por ejemplo, en Europa y en Japón el serotipo más comúnmente encontrado es el 2, en Norteamérica son el 1, 5 y 7; en Latinoamérica son el 1, 3, 5 y 8. En México, se han detectado los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9. Sin embargo, los serotipos dominantes son el 1 y el 8 (Dubreuil y cols., 2000).

La patología de la pleuroneumonía se caracteriza por una pleuritis fibrosa y una neumonía necrotizante hemorrágica con trombosis vascular pulmonar focal (Bosse y cols., 2002). Las lesiones pulmonares se caracterizan por edema severo, inflamación, hemorragia y necrosis (Ajito y cols. 1996; Bertram, 1985; Liggett y cols. 1987). La infección de cerdos con *A. pleuropneumoniae* provoca una rápida producción local a nivel pulmonar de citocinas pro-inflamatorias tales como factor de necrosis tumoral- α (TNF α), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) (Baarsch y cols., 1995); mientras que a nivel sistémico solo se ha detectado una elevación de IL-6 (Myers y cols., 2004). El TNF α y las interleucinas IL-1 e IL-6 son las responsables del desarrollo de inflamación pulmonar y de infiltración celular, mientras que la IL-8, que tiene fuerte poder quimiotáctico sobre leucocitos polimorfonucleares (PMN), induce el reclutamiento y la activación de los mismos dando lugar a la liberación de radicales libres de oxígeno y de enzimas proteolíticas con consecuencias graves sobre los tejidos del hospedero (Baarsch y cols., 2000; Huang y cols., 1999; Dom y cols., 1992). El daño tisular y la activación de neutrófilos y macrófagos han sido atribuidos a las toxinas Apx producidas por la bacteria (Dom y cols., 1994; Kamp y cols., 1994). *Actinobacillus pleuropneumoniae* se puede encontrar en el fluido alveolar y dentro de macrófagos alveolares así como en PMN pero no en células epiteliales (Min y Chae, 1998).

Aunque las vías respiratorias son el blanco predilecto para la infección por *A. pleuropneumoniae*, estudios de hibridización *in situ* han revelado presencia de la bacteria en tejido óseo de articulaciones de cerdos jóvenes asociada con lesiones

características de osteomielitis necrotizante lo cual implica necesariamente una fase de distribución hematogena de la enfermedad con posible afectación del endotelio vascular (Jensen y cols., 1999).

1.1.1. Factores de virulencia

Algunos conceptos importantes relacionados con el efecto de patógenos en un hospedero incluyen: virulencia, que se define como la relativa capacidad de un microorganismo de inducir daño en el hospedero; Factor de virulencia, que es cualquier componente proveniente de un patógeno que provoca daño en el hospedero. Dentro de los factores de virulencia se incluyen aquellos componentes esenciales para la supervivencia del patógeno así como modulinas las cuales son factores que provocan daño al hospedero a través de estimular la liberación de citocinas (Casadevall y Pirofski 1999, Casadevall y Pirofski 2000). Entre los factores de virulencia de *A. pleuropneumoniae* descritos a la fecha, se encuentran factores no secretados por la bacteria, así como factores secretados al medio extracelular o espacios intersticiales tales como: cápsula, el lipopolisacárido (LPS), proteínas de membrana externa (OMPs), factores de adquisición de hierro y toxinas, los cuales contribuyen a la colonización del hospedero, a la adquisición de nutrientes esenciales para la bacteria como el hierro, a evadir la respuesta defensiva del hospedero y al daño tisular.

1.1.1.1. Cápsula. Todas las bacterias patógenas poseen cápsula, la cual consiste de una capa de carbohidratos que cubre completamente al microorganismo.

Todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae* producen cápsula con algunas variantes en su composición y en su estructura; tales variaciones determinan la diferencia entre los diversos serotipos, y han sido utilizados para su serotipificación. La región de ADN que codifica para la síntesis y organización de la cápsula de los serotipos 1, 5, 6, 7, 8 y 12 ha sido identificada y su homología genética ha sido establecida (Jessing y cols., 2008). El material capsular de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 se compone de polisacáridos tipo ácido teicoico con unidades repetitivas de disacárido compuesto por 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa y D-galactosa altamente hidratados (Altman y cols., 1986). La cápsula protege a la bacteria contra la respuesta inmunológica del hospedero mediada por anticuerpos y complemento así como contra la fagocitosis. Las cepas mutantes no capsuladas de *A. pleuropneumoniae* son menos virulentas. El tipo y la cantidad de polisacáridos presentes en la cápsula al parecer también influyen en el grado de virulencia (Aloka y cols., 2003). Sin embargo, se ha encontrado que la cápsula afecta la adherencia *in situ* de *A. pleuropneumoniae* a las células del hospedero ya que cepas no encapsuladas muestran mayor adherencia a cortes congelados de tráquea porcina que la cepa normal capsulada (Rioux y cols., 2000).

1.1.1.2. Lipopolisacárido (LPS, endotoxina). El lipopolisacárido bacteriano (LPS), también conocido como endotoxina, es un componente natural de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Está involucrado en la adherencia de la bacteria a las células del hospedero (Jacques, 1996) y constituye un poderoso estimulante de las células del sistema inmunitario. El lipopolisacárido

está formado por moléculas complejas compuestas de tres regiones bien definidas: a) lípido A: esqueleto único de lípido consistente de diglucosamina ligado a ácido graso mediante enlace éster, amido o diéster; b) centro de oligosacárido compuesto de aproximadamente 10 monosacáridos incluyendo ácido 2-ceto, 3-desoxioctulosónico, heptosa, glucosa, galactosa y N-acetil-galactosamina y c) antígeno "O", compuesto por cadenas largas de polisacáridos organizadas en unidades repetitivas de uno a siete monosacáridos (ramnosa, galactosa y N-acetil-galactosamina) (Altman y cols., 1986; Fenwick y cols., 1986; Rioux y cols., 1997). Dependiendo de la presencia y del número de unidades repetitivas de antígeno-O los LPS pueden clasificarse en rugoso, semirugoso (presente en *A. pleuropneumoniae* serotipo 1) y liso (presente en *A. pleuropneumoniae* serotipo 2) (Byrd y Kadis, 1989). El LPS ha sido considerado como uno de los principales factores de virulencia de *A. pleuropneumoniae* ya que representa un importante factor de colonización de los tejidos del hospedero así como un potente inductor de la respuesta inflamatoria (Baarsch y cols., 1995). La inoculación de LPS purificado en cerdos por vía intratraqueal o intranasal, reproducir las lesiones de la enfermedad; sin embargo, debido a que el LPS por si solo no puede provocar los dos tipos principales de lesiones como son hemorragia y necrosis tisular, es muy probable que actúe junto con otros factores de virulencia bacterianos. Diversos estudios utilizando cepas mutantes de *A. pleuropneumoniae* modificadas en su capa de LPS han demostrado ser menos virulentas en cuanto a su poder de colonización del hospedero y en cuanto a la inducción de la producción de citocinas (Ramjeet y cols., 2005).

1.1.1.3. Proteínas de membrana externa (OMP por sus siglas en inglés). Las proteínas de membrana externa pueden localizarse simplemente embebidas en la bicapa de fosfolípidos; atravesar la membrana o bien formar complejos con carbohidratos formando glucoproteínas. Las proteínas de membrana externa bacteriana realizan diversas funciones importantes para la célula tales como: intermediación en el transporte entre el periplasma y el ambiente extracelular; adhesinas para la adherencia a células o tejidos del hospedero; enzimas para la respiración-generación de energía entre otras funciones. Las proteínas de membrana externa de *A. pleuropneumoniae* pueden diferir inmunológicamente entre los diferentes serotipos; proteínas de 14, 24, 32, 40, 42 y 48 kDa han sido purificadas aunque su papel en la virulencia no está totalmente aclarado (MacInnes y Rosendall 1987; Beaudet y cols. 1994; Deneer y Potter 1989; Gerlach y cols. 1993; Ito y cols. 1995; Cruz y cols. 1996). Entre las proteínas de membrana externa importantes para la virulencia de *A. pleuropneumoniae* se encuentran los receptores FhuA y HgbA las cuales le sirven como receptores para la adquisición de hierro a partir de fuentes como ferricromo (FhuA) o como hemoglobina (HgbA) (Shakarj y cols., 2006).

1.1.1.4. Sistemas de adquisición de hierro. El hierro es un nutriente esencial para el crecimiento de *A. pleuropneumoniae* quien a fin de disponer de cantidades adecuadas expresa dos distintas proteínas con afinidad por transferrina: TbpA y TbpB las cuales son proteínas que forman canales transmembranales para el transporte de hierro a través de la membrana externa; de este modo, el patógeno

utiliza la transferrina del hospedero como única fuente de hierro necesaria para su supervivencia y su virulencia (Baltes y cols., 2002; Baltes y cols., 2001). Sin embargo, a fin de poder incorporar hierro, la bacteria también requiere de energía, misma que es proporcionada por proteínas de membrana externa transductoras de energía pertenecientes al sistema de proteínas Ton B las cuales también participan en la captación de hierro vía receptores de sideróforos y vía captación del hierro del hem producido por la acción de hemolisinas de *A. pleuropneumoniae* (Beddek y cols. 2004).

1.1.1.5. Exotoxinas. La mayoría de las bacterias Gram negativas producen toxinas, las cuales juegan un papel importante en la defensa del microorganismo contra macrófagos y neutrófilos del hospedero (Welch y cols.1995.). *A. pleuropneumoniae* produce cuatro tipos de toxinas, Apx I, Apx II y Apx III, Apx IV con pesos moleculares comprendidos entre 103 y 120 KDa. Las toxinas ApxI, ApxII y ApxIII son expresadas tanto *in vitro* como *in vivo*, se liberan al ambiente asociadas a vesículas de membrana externa y son esenciales para el desarrollo de las lesiones típicas en pulmones (Frey J y cols. 1993; Negrete-Abascal y cols. 2000). La toxina Apx I que posee un fuerte poder hemolítico y citotóxico, ejerce su efecto sobre células fagocíticas (macrófagos alveolares y PMN) permitiendo a la bacteria evadir la primera línea de defensa del hospedero, a la vez que interviene en el desarrollo de lesiones sobre células endoteliales y epiteliales pulmonares. Su papel en la patogénesis está bastante claro en la actualidad (Bosse y cols., 2002). En cerdos expuestos a cepas de *A. pleuropneumoniae* mutantes, incapaces de

producir toxina, se observó que la bacteria era rápidamente eliminada de los pulmones por los macrófagos y PMN, sin que llegara a desarrollarse lesión alguna (Crujisen, 1992). La toxina Apx II posee débil actividad hemolítica y moderadamente citotóxica, en contraste, la Apx III no es hemolítica pero sí fuertemente citotóxica (Reimer y cols., 1995; Tascon y cols.1994). La toxina Apx IV, fue descrita recientemente y su papel en la patogenicidad no es claro ya que al parecer, Apx IV no es capaz de ocasionar lesiones, sin embargo está considerada como una toxina característica de especie (Bosse y cols, 2002).

1.1.2. Otros factores de virulencia

1.1.2.1. Ureasa. Virtualmente todas las cepas de *A. pleuropneumoniae* producen ureasa; esta enzima se compone de tres subunidades (α, β, γ) codificadas por tres diferentes genes *ureABC*, tiene un peso molecular de 200 kDa y contiene níquel en su sitio activo catalítico (Moblely y cols.,1995). La ureasa cataliza la hidrólisis de urea, la cual es el principal producto de excreción del nitrógeno en mamíferos, generando dos moléculas de amoniaco (NH_3) y una de ácido carbónico (H_2CO_3); el resultado neto es carbonato de amonio [$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$] lo que propicia un aumento en el pH.

La ureasa juega un papel importante en la patogénesis de muchas infecciones bacterianas (Moblely y cols.1995); en la infección por *A. pleuropneumoniae*, la ureasa sirve a la bacteria para garantizar en el hospedero un ambiente adecuado para su supervivencia, ya que el amonio que genera inhibe la fusión del fagolisosoma además de que al propiciar una elevación del pH intralisosomal

deprime la actividad fagocítica de macrófagos (Gordon y cols. 1980). Estudios con cepas mutantes de *A. pleuropneumoniae*, carentes de ureasa han demostrado que la bacteria es capaz de producir la infección aguda solo cuando se administra a altas dosis (10^5 - 10^6 UFC/mL en aerosol) pero no cuando se administra a bajas dosis (10^3 UFC/mL en aerosol) lo cual pudiera atribuirse a la rápida eliminación de la bacteria mutante ureasa negativa en comparación con la cepa no mutante (ureasa positiva) [Bosse y MacInnes 2000; Baltés y cols., 2001].

1.1.2.2. Enzimas proteolíticas. Además de su producción de ureasa, *A. pleuropneumoniae* también expresa enzimas proteolíticas las cuales son liberadas junto con las exotoxinas asociadas a vesículas de membrana externa. La actividad proteolítica de *A. pleuropneumoniae* le sirve para degradar IgA, IgG, gelatina y hemoglobina, al parecer para incrementar su supervivencia en el hospedero (Mulks y cols.1984; Negrete-Abascal y cols., 1994; Negrete-Abascal y cols. 1998).

1.1.2.3. Superóxido dismutasa. Además de las toxinas bacterianas, como mecanismo de defensa contra células inflamatorias, *A. pleuropneumoniae* también expresa la enzima superóxido dismutasa (SOD, Cu-Zn). Esta enzima con ubicación periplásmica, tiene la capacidad de degradar superóxido exógeno, protege la bacteria del ataque por radicales libres de oxígeno *in vitro* aunque no es requerido para su virulencia (Langford y cols.1996; Sheehan, y cols., 2000).

1.2. Interacción de *A. pleuropneumoniae* con células del hospedero

1.2.1. Adherencia

Para establecer la infección, *A. pleuropneumoniae*, además de evadir la respuesta defensiva del hospedero, tiene que colonizar los tejidos, para lo cual inicialmente se adhiere a las células a través de una interacción específica entre adhesinas bacterianas y ligandos complementarios en la célula hospedero (Hoepelman y cols., 1992). La adhesión de la bacteria a las células garantiza su resistencia a agentes deletéreos, garantiza su habilidad para obtener nutrientes y le permite, además, multiplicarse más eficientemente aumentando su toxicidad.

La adherencia de *A. pleuropneumoniae* ha sido demostrada tanto *in vitro* como *in vivo*. *In vitro*, *A. pleuropneumoniae* se adhiere a células bucoepiteliales, a células pulmonares y a células traqueales de cerdo (Belanger y cols., 1990; Jacques y cols., 1991; Paradis y cols., 1994; Paradis y cols., 1999), también se adhiere a células de la mucosa del tracto respiratorio (Belanger y cols., 1992; Belanger y cols., 1994) y a células epiteliales alveolares (van de Kerkhof y cols., 1996; Van Overbeke y cols., 2002). Dicha adherencia implica la participación de proteínas de matriz extracelular tales como colágena, fibronectina y vitronectina (Enríquez-Verdugo y cols., 2003-2004; 2004). Después de la inoculación intranasal de *A. pleuropneumoniae*, se ha detectado su adhesión a cilios de bronquiolos terminales, al epitelio alveolar y esporádicamente a epitelio de bronquios y tráquea sugiriendo que las células pulmonares pudieran ser el blanco primario de la infección (Dom y cols., 1994).

La adhesión de *A. pleuropneumoniae* a las células porcinas es multifactorial e involucra la participación de LPS presente en la membrana externa, lo cual se ha demostrado mediante ensayos de inhibición de la adhesión de *A. pleuropneumoniae* a células de epitelio alveolar con LPS soluble (Van Overbeke y cols., 2002; Hitchcock y cols., 1986).

Muchas bacterias patógenas se adhieren a las células del hospedero por medio de estructuras filamentosas poliméricas que protruyen desde la superficie bacteriana y que son conocidas como fimbrias. *A. pleuropneumoniae* presenta fimbrias tipo IV (Tfp) codificadas por cuatro genes (*apfABCD*). La expresión de (*apfABCD*) es constitutiva pero se induce cuando la bacteria está en contacto con la célula del hospedero tanto *in vivo* como *in vitro* lo cual facilita la adherencia de la bacteria a las células del hospedero (Zhang y cols., 2000; Boekema 2004).

Además de la adhesión a las células del hospedero, *A. pleuropneumoniae* requiere para una eficiente colonización tisular, de ciertos nutrientes que pueden ser variables de acuerdo al tipo de tejido colonizado. Uno de los nutrientes esenciales para esta bacteria es el hierro, el cual le sirve como cofactor para numerosas enzimas; dicho mineral no está disponible en el ambiente extracelular pues se encuentra atrapado por proteínas como transferrina y lactoferrina (Deneer y Potter, 1989). Para obtener este valioso nutriente, *A. pleuropneumoniae* expresa dos distintas proteínas con afinidad por transferrina, TbpA y TbpB. De este modo, este patógeno utiliza la transferrina del hospedero como única fuente de hierro necesaria para su supervivencia y virulencia (Baltes y cols., 2002; Baltes y cols., 2001; Beddek y cols., 2004).

1.2.2. Internalización de *A. pleuropneumoniae*

Los macrófagos alveolares constituyen la especie celular más abundante (85%) en el tejido pulmonar, en donde detectan, reconocen e inactivan microorganismos y productos microbianos. Una vez que el microorganismo es internalizado, un amplio rango de moléculas tóxicas intracelulares tales como anión superóxido, radical hidroxilo, óxido nítrico (principal componente), proteínas y péptidos catiónicos antimicrobianos, y lisozima actúan sobre el mismo a fin de destruirlo neutralizando su virulencia (Martin y Frevert 2005). *A. pleuropneumoniae* y sus componentes estructurales son fagocitados por macrófagos alveolares *in vitro*. *In vivo*, ambos son capaces de activar la respuesta inflamatoria (Baarsch y cols.,1995; Felnerova y cols., 2004). Sin embargo, la bacteria es capaz de sobrevivir intracelularmente por más de 90 minutos provocando la muerte de los macrófagos y amplificando la respuesta inflamatoria (Crujisen, 1992). El hecho de que la inoculación de pequeñas dosis (80 UFC) de la bacteria a nivel profundo (bronquios) en cerdos sea suficiente para producir la enfermedad sugiere que los macrófagos alveolares son incapaces de eliminar el inóculo, lo cual puede ser atribuible a sus factores de virulencia tales como cápsula, LPS, ureasa, superóxido dismutasa y citotoxinas los cuales protegen la bacteria de la fagocitosis y poseen efecto citotóxico (Van Leengoed and Kamp, 1989).

Aunque las células fagocíticas se especializan en internalizar patógenos, algunos microorganismos pueden invadir activamente células no fagocíticas accediendo al ambiente protector intracelular y en algunos casos favorecer la migración del

patógeno a través de barreras celulares tales como la barrera hemato-encefálica y los epitelios (Finlay y Cossart, 1997).

1.3. El endotelio

El endotelio vascular, es un epitelio plano simple que tapiza la superficie interna de los vasos sanguíneos y de las cavidades cardiacas facilitando el flujo laminar de la sangre y evitando la adherencia de las células sanguíneas; dicho epitelio no consiste en un simple recubrimiento inerte de los vasos o una barrera física entre la sangre y los tejidos sino que juega un papel muy importante en la fisiología del organismo (Cines y cols., 1998).

La existencia de una red de vasos sanguíneos y la separación física entre la sangre y los tejidos fue descrita por primera vez en 1628 por Harvey y poco tiempo después por Malphigi. En los años 1800's von Recklinghausen estableció que los vasos no son meramente túneles que penetran a través los tejidos corporales sino que están constituidos por células, mismas que fueron posteriormente descritas por Heidenhahn en 1891 (Cines y cols., 1998) como un activo sistema de células secretoras. El estudio ultraestructural del endotelio realizado por Palade en 1953 con el uso del microscopio electrónico y los estudios fisiológicos realizados por Gowan en 1959 dieron origen al entendimiento actual del endotelio como un órgano ampliamente diseminado, dinámico y heterogéneo que posee funciones secretoras, sintéticas, metabólicas e inmunológicas (Cines y cols., 1998).

El endotelio de los vasos sanguíneos de los diferentes órganos difiere con respecto a su morfología y su permeabilidad y es clasificado como "continuo",

“fenestrado” o “discontinuo”; es tan heterogéneo que hasta puede diferir entre secciones vasculares consecutivas e inclusive dos células endoteliales adyacentes pueden mostrar diferencias. Por ejemplo, en el riñón, el endotelio es fenestrado en capilares peritubulares, discontinuo en capilares glomerulares y continuo en otras regiones (Pries y Kuebler, 2006.; Aird, 2007).

1.3.1. Las células endoteliales

La superficie endotelial de un humano adulto recubre todos los vasos sanguíneos del cuerpo, consta de alrededor de 1 a 6×10^{13} células endoteliales, pesa aproximadamente 1 Kg y recubre un área aproximada de 1 a 7 m² en forma de monocapa, la cual, además de ser una barrera física entre el lumen de los vasos y el espacio intersticial también controla la permeabilidad de la pared de dichos vasos (Cines y cols., 1998). Entre las funciones que desempeñan las células endoteliales en el organismo destaca su papel regulador del flujo sanguíneo, ya que genera una superficie antitrombótica que facilita el tránsito del plasma y de los constituyentes celulares a través de la vasculatura, además de la generación de varias sustancias vasoactivas que controlan el tono vascular; la perturbación de tales funciones, la cual puede ocurrir en procesos inflamatorios, puede dar lugar a la generación de un microambiente protrombótico y antifibrinolítico que puede ser de fatales consecuencias (Cines y cols., 1998; Sato, 2001)

1.3.2. Función de las células endoteliales

1.3.2.1. Formación de nuevos vasos sanguíneos (neoangiogénesis). Es un proceso por el cual se forman los vasos sanguíneos y que tiene lugar tanto en el desarrollo embrionario como en la vida posnatal y representa un fenómeno fundamental para la reproducción y para el desarrollo tisular (Sato, 2001; Plendl, 2000).

1.3.2.2. Control del tono vascular. El endotelio vascular, controla el tono de los vasos sanguíneos través de la producción de agentes vasoactivos tales como el óxido nítrico (NO) y la prostaglandina I₂ (PGI₂). El NO se sintetiza a partir de L-arginina por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) y tiene como efecto la relajación del músculo liso vascular por inducción de la enzima guanilato ciclasa y aumento en los niveles intracelulares de GMPc (Denninger y Marletta, 1999.). La PGI₂ relaja el músculo liso por inducción de la adenilato ciclasa (Moncada y cols., 1976). Tanto el NO como PGI₂ controlan el tono vascular en reposo. El endotelio también tiene capacidad para producir factores vasoconstrictores tales como endotelina I, angiotensina II y metabolitos del ácido araquidónico (Yanagisawa y cols., 1988; Rubanyi, 1994).

1.3.2.3. Barrera selectiva entre la sangre y los tejidos. El endotelio es una monocapa continua de células estrechamente unidas por proteínas de unión intercelular como las cadherinas, que controla selectivamente la permeabilidad de

los vasos tanto a las células circulantes como a nutrientes y sustancias de desecho (Baldwin y Thurston 2001).

1.3.2.4. Función anticoagulante y antitrombótica. Las células endoteliales secretan moléculas que controlan la coagulación sanguínea y la función plaquetaria como las ya mencionadas PGI_2 y NO que inhiben la agregación plaquetaria. También mantienen la fluidez de la sangre promoviendo las vías anticoagulantes como la vía proteína C/proteína S, inactivan trombina a través de la liberación de glucosaminoglucanos y finalmente, participan en la eliminación del coágulo ya que propicia la activación de plasminógeno a plasmina la cual degrada trombos por digestión de la malla de fibrina (Cines y cols., 1998; Sato, 2001)

1.3.2.5. Participación en reacciones inflamatorias. Las células endoteliales coordinan la migración y extravasación de células inflamatorias a los sitios de lesión tisular o infección y liberan diversas citocinas y factores de crecimiento que sirven como agentes quimiotácticos; además, las células endoteliales responden ante estímulos inflamatorios como lipopolisacárido bacteriano (LPS) y a diversas citocinas (Michiels, 2003).

1.3.2.6. Respuesta ante la fuerza de fricción del flujo sanguíneo. Las células endoteliales se adaptan a la tensión ejercida por la fricción ocasionada por el flujo sanguíneo, reorientándose en dirección del flujo disminuyendo así la resistencia del endotelio a la fuerza de deslizamiento ejercida por la sangre (Traub y Berk,

1998). Se ha reportado que la tensión por fricción promueve la liberación de factores que inhiben la coagulación, la migración de leucocitos y la proliferación de células musculares lisas así como la supervivencia de las células endoteliales (Traub y Berk, 1998).

1.4. Interacción de patógenos con el endotelio

Debido a su situación anatómica, la superficie endotelial está expuesta a patógenos, a productos derivados de patógenos así como a diversos agentes generados por los mecanismos de defensa del hospedero durante la reacción inflamatoria. Los patógenos atacan al endotelio mediante una amplia variedad de estrategias: por adherencia, por invasión y replicación intracelular o por la liberación de exotoxinas que provocan muerte celular.

El primer contacto del patógeno con el endotelio es facilitado por la expresión de ciertas proteínas por la célula endotelial para las cuales existen adhesinas bacterianas afines como por ejemplo la fibronectina, la cual constituye un blanco para la adherencia de patógenos como *Staphylococcus aureus* a través de la interacción mediada por proteína A a la molécula de fibronectina. Otras proteínas de matriz extracelular expresadas por el endotelio tales como vitronectina, elastina y colágena funcionan como blancos moleculares para la adherencia de bacterias patógenas (Hippenstiel y Suttorp,. 2003).

1.4.1. Adherencia e Invasión de células endoteliales por bacterias patógenas

Diversos microorganismos patógenos como *Chlamydia pneumoniae* (Puolakkainen y cols., 2005), *Neisseria meningitidis* (Lambotin y cols., 2005.), *Aspergillus fumigatus* (Lopes Bezerra y Filler, 2004) *S. aureus* (Menzies y Kourteva, 2000) *Listeria monocytogenes* (Greiffenberg y cols., 2000), y *Streptococcus* grupo B (Lione y cols., 2005) poseen capacidad para adherirse e internalizarse en células endoteliales. Estos microorganismos, se adhieren e invaden la célula endotelial provocando modificaciones en su citoesqueleto de actina y algunos de ellos, ocasionan la muerte por apoptosis de la célula infectada (Menzies y Kourteva, 1998). Se ha sugerido que tal adhesión e internalización puede estar mediada por factores de adhesión celular expresados por las células endoteliales (Muro y cols., 2003; Patti y cols., 1994). La adherencia y la internalización de *A. pleuropneumoniae* a células endoteliales no ha sido descrita a la fecha.

1.4.2. Muerte celular

Uno de los mecanismos por los cuales las bacterias Gram negativas inducen daño citotóxico a las células del hospedero es a través de la formación y liberación de vesículas de membrana externa las cuales contienen factores de virulencia tales como adhesinas, toxinas y compuestos inmunomoduladores; dichos factores, median directamente la adherencia y la invasión de la bacteria a la célula eucariótica, ocasionan citotoxicidad y modulan la respuesta inmunitaria del hospedero (Kuehn y Kesty, 2005); *A. pleuropneumoniae* produce los factores de

virulencia antes mencionados que incluyen a proteasas y a las toxinas Apx asociados a vesículas de membrana externa (Negrete-Abascal y cols., 2000).

El efecto citotóxico de *A. pleuropneumoniae* puede ser por dos mecanismos: por necrosis o por apoptosis.

1.4.2.1. Muerte por necrosis. Las toxinas producidas por *A. pleuropneumoniae* forman poros en las células blanco, generando un desbalance osmótico que provoca hinchamiento y muerte celular (Maier y cols., 1996); también, las toxinas pueden provocar un incremento en la producción de radicales libres de oxígeno por macrófagos y neutrófilos resultando en daño a las células vecinas y provocando daño tisular y destrucción (Dom y cols., 1992). Tal efecto sobre las células del hospedero puede ser el responsable de las lesiones características de la infección como son la aparición de edema y de lesiones hemorrágicas y necróticas.

1.4.2.2. Muerte por apoptosis. La apoptosis es un tipo de muerte celular que se caracteriza por condensación de cromatina, fragmentación nuclear, encogimiento celular, fragmentación de la membrana plasmática con formación de cuerpos apoptóticos sin liberación del contenido intracelular al espacio extracelular (Reed, 2000).

La muerte celular por apoptosis de células endoteliales inducida por bacterias puede atribuirse ya sea al LPS, a la producción de citolisinas, a la generación de radicales libres de oxígeno por las mismas células endoteliales o por macrófagos

circulantes y a la formación de poros en la membrana celular ya que tales factores, pueden provocar la activación de señales tales como NF- κ B (Bannerman y Goldblum, 2003); provocar la activación de caspasas, provocar una disminución en los niveles de óxido nítrico el cual protege las células endoteliales contra la apoptosis, provocar apoptosis por influjo masivo de calcio o por liberación de citocromo c mitocondrial inducida por toxinas que son translocadas hasta la mitocondria (Bannerman y Goldblum, 2003; Florentini y cols., 2003). La muerte celular por apoptosis contribuye al daño tisular en el hospedero, sin embargo, también puede ser un mecanismo benéfico para el mismo ya que el hecho de que las bacterias fagocitadas provoquen apoptosis de la célula fagocítica contribuye a la aniquilación de la bacteria disminuyendo la respuesta inflamatoria (Crujisen, 1992). Aunque las toxinas de *A. pleuropneumoniae* provocan muerte celular, se desconoce si dicha muerte es por apoptosis o por necrosis (Jansen y cols., 1995; van der Kerkhof y cols., 1996).

El efecto citotóxico de *A. pleuropneumoniae* sobre macrófagos, PMN y epitelio pulmonar está plenamente demostrado; sin embargo, el efecto sobre las células endoteliales es poco conocido a pesar de que las lesiones tales como hemorragia y trombosis claramente involucran daño a nivel vascular. Estudios *in vitro* han demostrado un efecto citotóxico de las toxinas de *A. pleuropneumoniae* sobre las células endoteliales (Serebrin y cols., 1991) así como un efecto de denudación endotelial determinado en cortes histológicos de tejido pulmonar de cerdos enfermos (Cornejo-Amador, 2006). No obstante se ha encontrado que el LPS aislado de *A. pleuropneumoniae* muestra adherencia a endotelio vascular porcino

(Paradis y cols, 1994), se desconoce si el microorganismo como tal se adhiere a las células endoteliales, si se internaliza en ellas y si les ocasiona la muerte, ya sea por necrosis o por apoptosis. Tal efecto pudiera ser una de las causas de las lesiones características de la infección como son hemorragia, trombosis y necrosis.

1. 5 Justificación

A. pleuropneumoniae produce pleuropneumonía fibrinosa a fibronecrotizante, septicemia, complicaciones ocasionales como endocarditis y pericarditis que implican daño del endotelio vascular en cerdos. Durante el curso de la infección, el endotelio está continuamente expuesto al patógeno, sus factores de virulencia, así como a los mecanismos de defensa del hospedero durante la respuesta inflamatoria. Sin embargo, el conocimiento acerca del efecto que *A. pleuropneumoniae* tiene sobre el endotelio es escaso debido a que los estudios *in vivo* de interacciones hospedero-patógeno que involucran al endotelio son limitados dado lo intrincado de la anatomía de los lechos vasculares; dificultad que se pretende resolver con la utilización de modelos *in vitro* de endotelio vascular porcino.

Con base a lo anterior, el propósito del presente trabajo fue determinar cuál es el efecto de la interacción de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y sus toxinas sobre las células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo. Además de determinar si la bacteria provoca la muerte de las células endoteliales, distinguir en qué forma la apoptosis o necrosis son las causas de esta muerte celular, y si la bacteria se

adhiera o se internaliza en la ese tipo de células. Así mismo, establecer si el efecto citotóxico que la bacteria tiene sobre las células endoteliales es provocado por las toxinas Apx o por otros mecanismos. Los resultados obtenidos contribuirán a determinar la causa de las lesiones características de la pleuroneumonía porcina como hemorragia y necrosis. Además, de que se podrá esclarecer el mecanismo mediante el cual los microorganismos afectan el endotelio vascular. La comprensión de dichas alteraciones aportará elementos que contribuyan a mejorar los esquemas de tratamiento y de prevención de enfermedades infecciosas que afectan a los cerdos.

1.6 Hipótesis:

Actinobacillus pleuropneumoniae se adhiere e internaliza en las células endoteliales de aorta de cerdo *in vitro* provocando la muerte de las mismas. Tal efecto puede relacionarse con las lesiones hemorrágicas y necróticas que se presentan en la pleuropneumonia porcina.

1.7 Objetivo general:

Caracterizar la interacción de *A. pleuropneumoniae* con células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo.

1.8 Objetivos específicos:

1. Establecer un cultivo de células endoteliales de aorta de cerdo y caracterizar su fenotipo endotelial por captación de Dil Ac-LDL (perclorato de 1,10-dioctadecil-3,3,30,30-tetrametilindocarbocianina-LDL-Acetilada), mediante el reconocimiento con anticuerpos específicos (anti CD31 y anti CD54) y por su capacidad de migración en cultivo.
2. Estudiar la interacción de *A. pleuropneumoniae* con las células endoteliales:
 - a) Caracterizando el efecto de sobrenadantes de medio de cultivo de crecimiento de *A. pleuropneumoniae* biotipo I serotipo 1, cepa 4074 (toxina cruda) en fase exponencial de crecimiento sobre la viabilidad de las células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo.
 - b) Determinando el tipo de muerte celular (apoptosis-necrosis) inducida por el sobrenadante de cultivo de *A. pleuropneumoniae* sobre las células endoteliales de aorta de cerdo.
 - c) Analizando las diferentes etapas involucradas en la adhesión e internalización de células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo por microscopía óptica y electrónica.

Capítulo 2

Material y métodos

2.1. Aislamiento y cultivo de células endoteliales de aorta de cerdo

Fragmentos de aorta torácica fueron asépticamente disectados de cerdos adultos raza Landrace (*Sus scrofa*) del rastro de la localidad e inmediatamente fueron colocados en un frasco conteniendo solución salina balanceada de Hanks (HBSS, Invitrogen, Grand Island, NY) adicionada de 50 mg/L de gentamicina y 2.5 mg/L anfotericina B (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo.); posterior a su traslado al laboratorio, se removió el tejido conectivo circundante del exterior del vaso, seguido de lavados con la misma solución. Enseguida, se disectaron pequeños fragmentos de 0.5 cm² de aorta los cuales se colocaron sobre su superficie luminal en cajas de cultivo (Nunc, Rochester NY) previamente cubiertas con factor de adhesión de células endoteliales (ECAAF, Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo.) en medio 199 (Gibco BRL, Grand Island, NY) adicionado de gentamicina 50 mg/L, anfotericina B 2.5 mg/L, 10% suero fetal de bovino (FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY), factor de crecimiento vascular endotelial 2µg/mL (VEGF, Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo.) y heparina 50 µg/mL (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo) a 37°C en una cámara humidificada conteniendo 5 % CO₂/95% aire. Después de 48 h de incubación, se retiraron los fragmentos de tejido y se cambió el medio de cultivo por medio fresco. Se incubó durante dos semanas más, tiempo en el que se estableció el cultivo primario con crecimiento en pequeñas colonias en monocapa, con morfología típica de pavimento o empedrado. Posteriormente las

células se removieron de la caja de cultivo con solución de tripsina/EDTA (0.05/0.02%) (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo.) y se resembraron en una caja nueva precubierta con factor de adhesión de células endoteliales incubándose nuevamente en las mismas condiciones. Las células se resembraron tres veces más con aproximadamente 21 días entre cada resiembra hasta lograr un aumento en la población. La viabilidad de las células entre cada resiembra se determinó por exclusión de azul trípano (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo.).

2.2. Caracterización del fenotipo endotelial

2.2.1. Captación de Ac-LDL-Dil. Cultivos a confluencia de células endoteliales de aorta de cerdo fueron incubadas con 5 µg/mL de Ac-LDL-Dil (perclorato de 1,10-dioctadecil-3,3,30,30-tetrametilindocarbocianina-LDL-Acetilada) [Invitrogen, Grand Island, NY] en medio de cultivo durante 4 h a 37°C; posteriormente, se lavaron las células tres veces, se fijaron con formaldehído al 4% en PBS y se observaron por microscopia de fluorescencia con filtro de excitación/emisión para rodamina (540/625 nm) (Voyta,1984).

2.2.2. Inmunofluorescencia con anti CD-31 (PECAM). Para confirmar el fenotipo de las células aisladas como endoteliales, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia directa del marcador de superficie específico de fenotipo endotelial CD-31. Cultivos de células endoteliales a confluencia fueron lavados con HBSS, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 min a temperatura ambiente seguido de tres lavados con PBS; enseguida, se incubaron

por 30 min con albúmina al 1% en PBS para bloquear unión inespecífica y posteriormente se incubaron con anticuerpo monoclonal anti ratón CD31-FITC (Biosource, Camarillo, CA) a 4°C durante toda la noche, se lavaron 3 veces con PBS y se observaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX41.

2.2.3. Inmunocitoquímica con anti CD-54 (ICAM). La expresión de CD-54 en células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo se detectó utilizando como anticuerpo primario anti CD-54 de ratón, (Calbiochem, La Jolla CA) en una dilución 1:200 y como anticuerpo secundario un anticuerpo policlonal de cabra conjugado a peroxidasa (Calbiochem, La Jolla CA). Cultivos a confluencia de células endoteliales de aorta de cerdo se lavaron para eliminar el medio de cultivo, enseguida se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS, posteriormente se lavaron tres veces con PBS y se incubaron 5 minutos con metanol absoluto en frío, después fueron incubadas con anticuerpo primario anti CD-54 (1:50) durante 1h a 37 °C. Después se realizaron tres lavados con PBS y después se incubaron con anticuerpo secundario anti IgG marcado con peroxidasa durante 1 h a 37°C, luego las células se lavaron 3 veces con PBS. La observación fue a través de microscopía de luz. El revelado de la inmunoperoxidasa se realizó con tetrahidroxiclórulo de 3,3 diamino benzidina al 0.004% (DAB; Sigma) en amortiguador 0.05 M Tris buffer pH 7.6 (16).

2.2.4. Migración celular. La migración y proliferación de células endoteliales es un proceso clave en la formación y reparación de vasos sanguíneos. Para

determinar la propiedad migratoria de las células endoteliales, cultivos a confluencia de las mismas en cajas de poliestireno fueron raspados intencionalmente con una punta de micropipeta estéril eliminando una franja de células; posteriormente se lavaron para eliminar las células despegadas y se fotografiaron inmediatamente en microscopio invertido con objetivo 10x; enseguida, se incubaron en medio de cultivo 199 adicionado de 10% SFB, 50 mg/L de gentamicina, 2.5 mg/L de anfotericina B y 50 µg/mL de heparina a 37 °C, en una cámara humidificada conteniendo 5%CO₂, 95% aire durante 4, 8 y 12h tiempos en los que se efectuaron nuevamente registros fotográficos (Reyes y Lazalde., 2004).

2.3. Curva de crecimiento

Cultivos a confluencia de células endoteliales fueron lavados dos veces con PBS; enseguida, se adicionó 1 mL de solución de tripsina/EDTA y se incubaron a 37 °C. Una vez que las células se despegaron de la caja de cultivo se agitaron suavemente en presencia de 3 mL de medio con suero para neutralizar la tripsina. Se recolectaron las células y se resuspendieron en un volumen total de 5 mL; el medio conteniendo la tripsina se centrifugó y se eliminó por aspiración. Enseguida, las células se resuspendieron en un volumen de 5 mL de medio y se tomó una alícuota de 0.5 mL para su conteo en un hemacitómetro. Finalmente, se adicionó medio de cultivo hasta alcanzar una proporción de 10,000 células por mL. Un mL de la suspensión celular (10^4 células) fue colocado en cada pozo de una caja de cultivo de 24 pozos de 1.88 cm² correspondiendo a cultivos por triplicado de 5h, 1,

2, 3, 4, 5, 6 y 7 días. Se cambió el medio de cultivo de las cajas por medio fresco conteniendo 5% de suero fetal de bovino cada dos días. Se seleccionaron al azar tres cultivos a cada tiempo a partir de cual se disgregaron las células por tripsinización para su posterior conteo el cual se realizó por quintuplicado de cada muestra. Se graficaron los valores promedio del número de células \pm desviación estándar.

2.4. Bacteria y condiciones de crecimiento

A. pleuropneumoniae biotipo 1, serotipo 1, cepa 4074 (ATCC) fue cultivada en agar de infusión de cerebro y corazón (BHI, Difco, Detroit, Mich.) suplementado con 10 μ g/mL de β -NAD e incubada 18-24h a 37°C. Se inoculó una colonia de *A. pleuropneumoniae* en infusión BHI-NAD y se incubó toda la noche a 37°C en aerobiosis; enseguida, 1 mL de la suspensión bacteriana fue inoculada en 50 mL de infusión BHI-NAD fresco y se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento la cual se determinó por medición de su densidad óptica a 600nm. Para los experimentos de adhesión se utilizaron bacterias recuperadas por centrifugación y lavadas con solución salina amortiguada de fosfatos (PBS, pH 7.2) ajustando su concentración a 2×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por mL en PBS (Guerrero Barrera y cols., 1999). Las UFC se determinaron por siembra en agar BHI-NAD de diluciones seriadas de la suspensión bacteriana.

A fin de obtener un sobrenadante (SN) de cultivo bacteriano (toxina cruda) la suspensión bacteriana fue centrifugada 30 min a 10,000 xg y el sobrenadante se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

filtró a través de un filtro de 0.45 μm seguido de otro de 0.22 μm de poro.; el filtrado fue congelado a -50°C hasta su uso en el ensayo de citotoxicidad (Van de Kerkhof, 1996).

2.5. Ensayo de citotoxicidad

Cultivos de células endoteliales a confluencia se incubaron con diluciones seriadas (1, 1:10, 1:100, 1:1000 Y 1:10000) del sobrenadante bacteriano preparado previamente, enseguida se incubaron durante 2 h a 37°C en una atmósfera de 5% CO_2 ; posteriormente se determinó el efecto citotóxico del sobrenadante sobre las células endoteliales en cultivo y el tipo de muerte celular (apoptosis-necrosis) inducida.

2.6. Cuantificación de muerte celular por tinción con rojo neutro

La citotoxicidad de la bacteria *A. pleuropneumoniae* y del sobrenadante bacteriano se determinó por tinción con rojo neutro; este método se basa en la captación por transporte activo del colorante y su incorporación dentro de los lisosomas por las células vivas. Las células en cultivo tratadas con diluciones del sobrenadante bacteriano así como cultivos control sin tratamiento se incubaron durante 2 horas con medio de cultivo conteniendo 0.033% de rojo neutro (Sigma-Aldrich St. Louis MO), enseguida se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con 0.1% de CaCl_2 en 0.5% de formaldehído y el colorante fue extraído con una solución de ácido acético al 1% en etanol al 50%. Se determinó la densidad óptica del extracto a 540

nm y la viabilidad fue expresada como % del control. Los controles consistieron de cultivos de células endoteliales sin el sobrenadante de cultivo bacteriano

2.7. Detección de muerte celular por tinción con YO-PRO-1 - yoduro de propidio

Con la finalidad de determinar el tipo de muerte celular (apoptosis-necrosis), los cultivos tratados con el sobrenadante de cultivo bacteriano se tiñeron utilizando el juego de reactivos Vybrant Apoptosis Assay Kit (Invitrogen-Molecular Probes Eugene, OR, USA) compuesto por los colorantes YO-PRO-1 y yoduro de propidio. El fluorocromo YO-PRO-1 es un marcador de etapas iniciales de muerte por apoptosis, atraviesa la membrana celular y tiñe el núcleo; ambos fluorocromos tienen la capacidad de intercalarse entre las bases del ADN pero el YO-PRO-1 únicamente tiñe las células apoptóticas mientras que el yoduro de propidio solo tiñe las células muertas por necrosis; ninguno de los colorantes puede teñir las células viables. Mediante esta tinción fluorescente se pueden visualizar tanto las células que mueren por apoptosis (fluorescencia verde: 491/509 nm, absorción/emisión) como las que mueren por necrosis (fluorescencia roja 535/617 nm, absorción/emisión). Las células en cultivo tratadas con el sobrenadante bacteriano así como cultivos control sin tratamiento se incubaron por 30 min a 0-2 °C en la oscuridad con una solución conteniendo 5.6 µg/mL YO-PRO 1, 20 µg/mL de yoduro de propidio y 0.9% DMSO in PBS. Al término de la incubación se lavaron los cultivos con PBS, se les adicionó Antifade™ para retardar el apagamiento de la fluorescencia (ó fotoblanqueo) y se observaron bajo microscopia de fluorescencia.

Se contaron las células con fluorescencia verde y con fluorescencia roja y se calculó la relación apoptosis/necrosis con la fórmula: número de células en apoptosis/número de células en necrosis (Wronski y cols., 2002).

2.8. Ensayo de adherencia

Cultivos a confluencia de células endoteliales fueron incubados con una suspensión bacteriana conteniendo 2×10^6 UFC/mL (multiplicidad de infección, MDI 25:1) en medio 199 adicionado de 10% de SFB sin antibióticos, sin antimicóticos y sin heparina a 37 °C, 5% CO₂, 95% aire y humedad a saturación durante 3h; posteriormente se lavaron 5 veces con PBS estéril, se fijaron con formaldehído al 4% en PBS y se tiñeron con azul de metileno. Se hicieron controles sin bacterias y con bacterias previamente fijadas con formaldehído al 4% y bloqueadas con albúmina al 1% así como controles con bacterias inactivadas por ebullición durante 5 min.

2.9. Microscopia electrónica de barrido (MEB)

Células endoteliales cultivadas sobre cubreobjetos colocados en cajas multipozos (24 pozos) fueron inoculadas con una suspensión bacteriana conteniendo 2×10^6 UFC de *A. pleuropneumoniae* e incubadas durante 3h a 37°C; enseguida, las células fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5% en PBS durante 1h a temperatura ambiente, posfijadas con tetraóxido de osmio (OsO₄) al 1%, deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol de 50-100% y secadas a punto crítico con etanol al 100% (secadora Samdri 780A, Tousimis); finalmente, las células se

cubrieron con oro (Ionizadora de oro, Desk-II, Vacuum Denton) y se observaron en un microscopio electrónico de barrido JSM 35C, Jeol. Se incluyeron controles con bacterias previamente fijadas con formaldehído y previamente inactivadas por ebullición.

2.10. Reconocimiento específico de actina. Con el propósito de probar si el citoesqueleto de actina está involucrado o sufre alguna modificación estructural ocasionada por la incubación de células endoteliales con *A. pleuropneumoniae*, se realizó una doble tinción fluorescente con faloidina-Alexafluor 488 y anticuerpos anti *A. pleuropneumoniae* reconocidos por anticuerpo secundario de chivo anti IgG marcado con AlexaFluor-594 de la siguiente forma: células endoteliales cultivadas sobre cubreobjetos fueron incubadas con una suspensión de *A. pleuropneumoniae* (2×10^6 UFC) durante tres horas; enseguida, se lavaron tres veces con PBS, se fijaron durante 5 min con formaldehído al 3.7%, se permeabilizaron con Tritón-X100 (Sigma) al 0.1% por 5 min y se bloquearon con albúmina sérica de bovino (Sigma) en PBS; posteriormente, se incubaron durante 3 horas a 37°C con anticuerpo policlonal de conejo anti *A. pleuropneumoniae* (suero de conejo inmunizado diluído 1:25) seguido de incubación con anticuerpo secundario de chivo anti IgG marcado con Alexa-594, las células fueron lavadas con PBS tres veces y posteriormente fueron incubadas con faloidina marcada con AlexaFluor-488 (Invitrogen) en PBS por 30 min; las células se lavaron tres veces con PBS, se montaron y se observaron en un microscopio confocal Leica.

2.11. Cuantificación de adherencia

Para determinar el efecto del tiempo de incubación y de la densidad bacteriana sobre la adherencia de *A. pleuropneumoniae* a células endoteliales, cultivos a confluencia en cajas multipozos fueron incubados con una suspensión bacteriana conteniendo 2×10^6 UFC/mL en medio 199 adicionado de 10% de SFB sin antibióticos, sin antimicóticos y sin heparina a 37 °C, 5% CO₂, 95% aire y humedad a saturación durante 0.5, 1, 2 y 3 h; posteriormente se lavaron 5 veces con PBS estéril y se lisaron las células con 1 mL de agua desionizada fría estéril para liberar las bacterias asociadas a las células endoteliales (Vanier y cols., 2007); diluciones de los lisados fueron cultivados en placas de agar BHI-NAD incubadas 24h a 37°C y enseguida se contaron las colonias; el número de UFC se dividió entre el número de células por pozo para determinar las bacterias adheridas por célula endotelial. En un ensayo similar, cultivos a confluencia de células endoteliales fueron incubados por 2h a 37 °C con 10^4 , 10^6 , y 10^8 UFC de *A. pleuropneumoniae*, las bacterias adheridas fueron cuantificadas como se mencionó anteriormente. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Los controles consistieron de ensayos sin células y sin bacterias en pozos por separado. Ensayos previos no mostraron bacterias libres al final de los lavados con PBS ni afectación de la viabilidad de las bacterias por el tratamiento con agua desionizada.

2.12. Internalización de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a células endoteliales

Cultivos de células endoteliales a confluencia en cajas de cultivo de 35mm de diámetro se incubaron con 5×10^6 UFC (MDI 25:1) de *A. pleuropneumoniae* como se describió previamente; posterior a la incubación, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron las células cinco veces y se adicionó medio de cultivo fresco conteniendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina. La incubación se continuó durante 2 h más para matar las bacterias viables extracelulares residuales, enseguida se lavaron 3 veces las células con medio fresco para eliminar antibióticos y se lisaron con 1 mL de agua desionizada fría estéril por 3 min. Varias diluciones del lisado se sembraron en agar BHI-NAD, se incubaron a 37 °C por 24 horas y se contaron las UFC de las bacterias sobrevivientes al tratamiento con gentamicina las cuales fueron consideradas como intracelulares. (Benga y cols., 2005; Wells y cols., 1999). Se hicieron los siguientes controles: A) caja de cultivo sin células endoteliales + bacterias; B) células endoteliales + gentamicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + bacterias.

Capítulo 3

Resultados

3.1. Aislamiento y caracterización de células endoteliales de aorta de cerdo

Los fragmentos de aorta fueron removidos de la caja de cultivo a las 48 h de incubación tiempo en el que pudieron observarse pequeñas colonias de células emergiendo del área de contacto del tejido del vaso con el sustrato de la caja; las células cultivadas mostraron la morfología típica de fenotipo endotelial en cultivo con apariencia de pavimento o empedrado y con crecimiento en monocapa (Figura 1a); a fin de incrementar la población cultivos subsecuentes se realizaron por remoción de las células con tripsina-EDTA. Los cultivos obtenidos dieron positiva la prueba funcional de captación de LDL acetiladas marcadas con un fluorocromo (Ac-LDL-Dil); este rasgo es típico de fenotipo endotelial (Figura 1b) (Voyta,1984). Los resultados de la tinción inmunocitoquímica con el marcador de superficie específico de fenotipo endotelial CD54 (ICAM) y por inmunofluorescencia con anti CD-31 se muestran en las Figuras 1c y 1d respectivamente; el reconocimiento de antígenos de superficie con estos anticuerpos específicos demuestran asimismo el fenotipo endotelial.

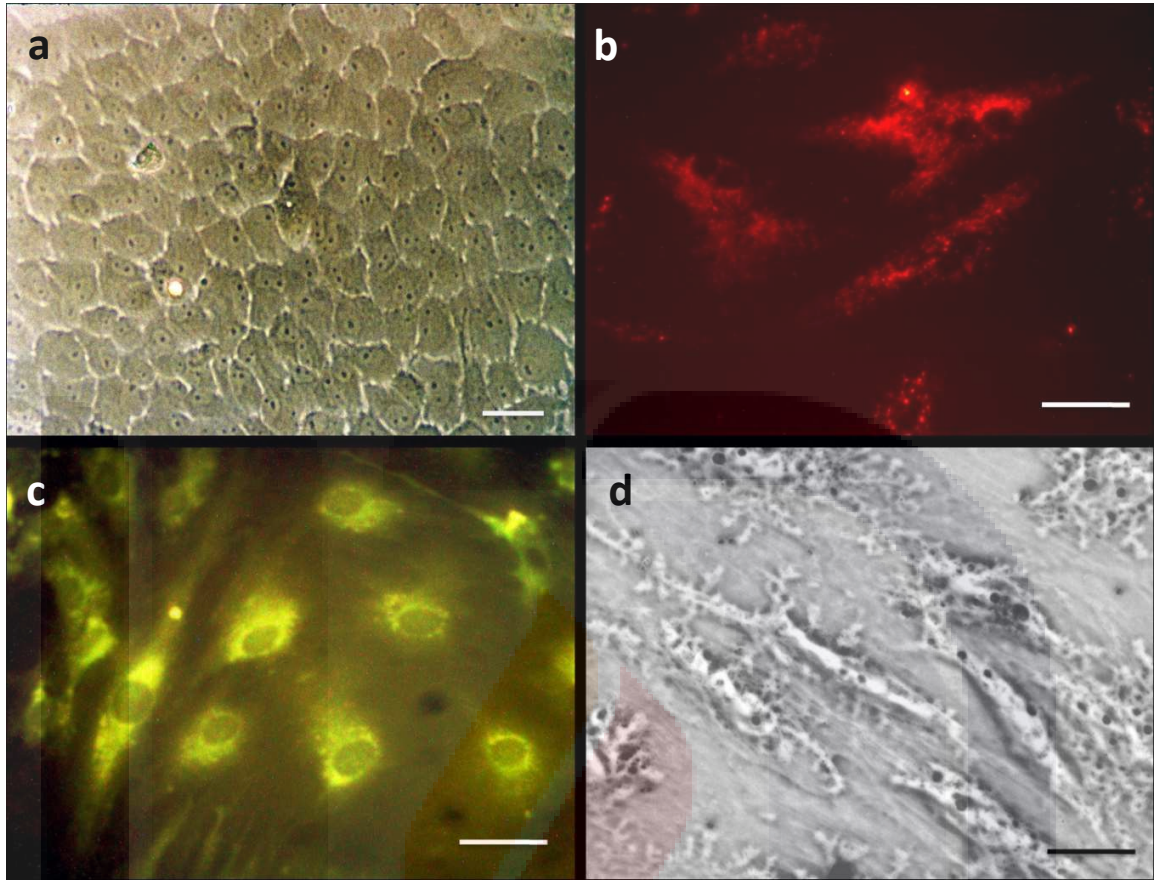


Figura 1. Caracterización fenotípica de células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo; a) cultivo a confluencia después de 7 días en cultivo, fotomicrografía por contraste de fases; b) captación de Ac-LDL-Dil visualizado por microscopia de fluorescencia; c) inmunoreconocimiento con anti-CD31-FITC detectado por inmunofluorescencia directa; y, d) inmunomarcaje indirecto de CD54 detectado con anti-CD54 y anti IgG conjugado a peroxidasa (Barra = 50 µm).

Migración. La migración de células endoteliales es un proceso crítico para la neovascularización y la reparación de vasos lesionados; dicho proceso puede ser replicado *in vitro* ya sea con la utilización de materiales especiales como Matrigel[®], gelatina y fibronectina entre otros pero también puede replicarse sobre la superficie de poliestireno de las cajas de cultivo (Reyes y Lazalde, 2004); en este estudio se demuestra que las células obtenidas de aorta de cerdo presentan movimiento y proliferación ya que desde el inicio de la lesión comenzaron a migrar hacia la superficie denudada de células hasta cubrirla totalmente a las 24h de efectuada la lesión (Figura 2).

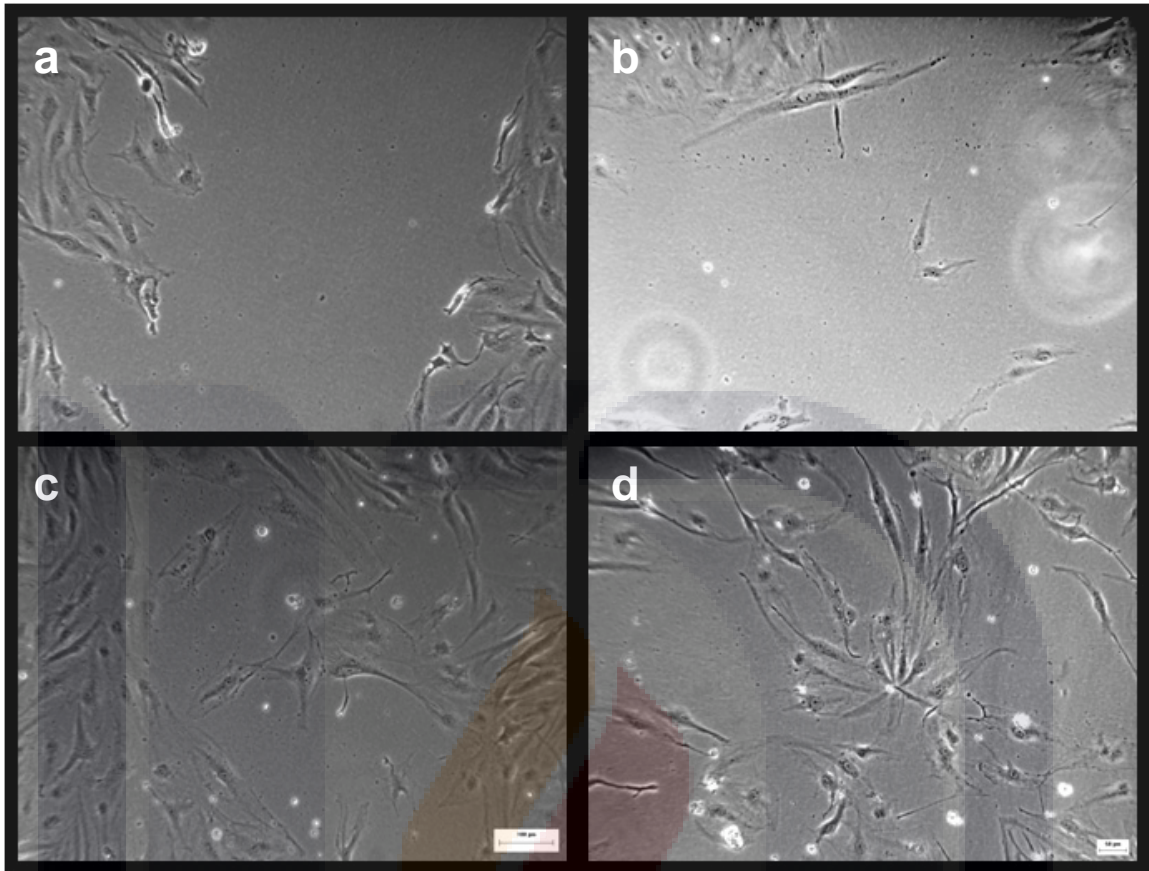


Figura 2. Migración de células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo de acuerdo al modelo de lesión de monocapa; a) 0, b) 4, c) 8 y d) 12 horas. La herida fue completamente cerrada a las 24 horas. Observación por microscopía de contraste de fases.

3.2. Curva de crecimiento

La densidad poblacional de las células endoteliales en cultivo fueron monitoreados durante 7 días como se muestra en la Figura 3. A las cinco horas de iniciado el cultivo el 99% de las células mostró adherencia a la superficie de la caja y el número de células creció exponencialmente al segundo día ($18,166 \pm 763$) y hasta al cuarto día ($63,666 \pm 8051$). Posteriormente, el crecimiento se mostró más lento probablemente por el estado quiescente de las células al alcanzar la confluencia (saturación); al séptimo día en cultivo la densidad poblacional fue de 83000 células por pozo.

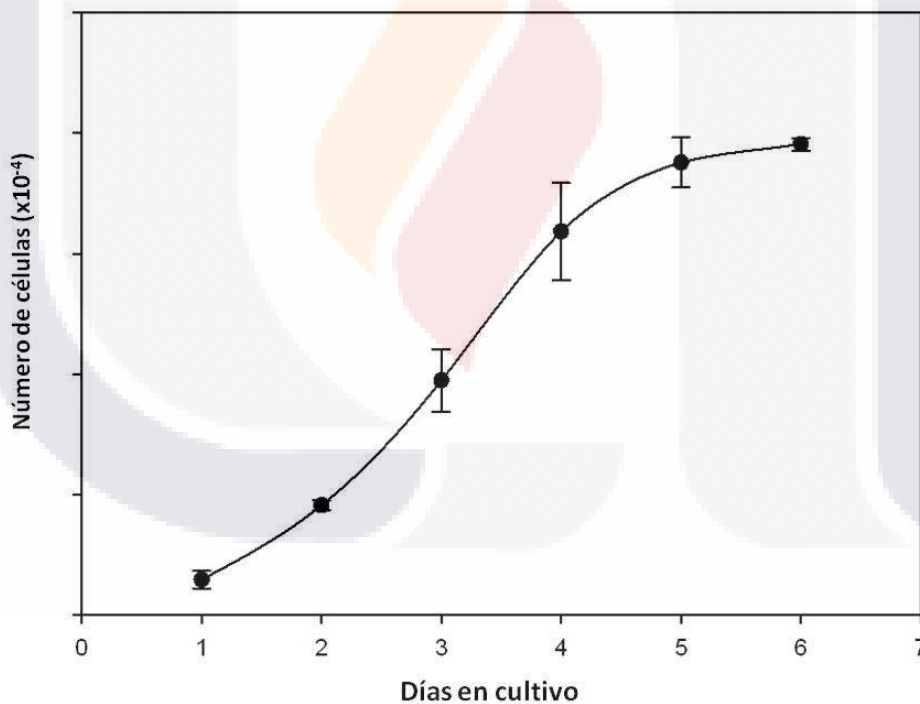
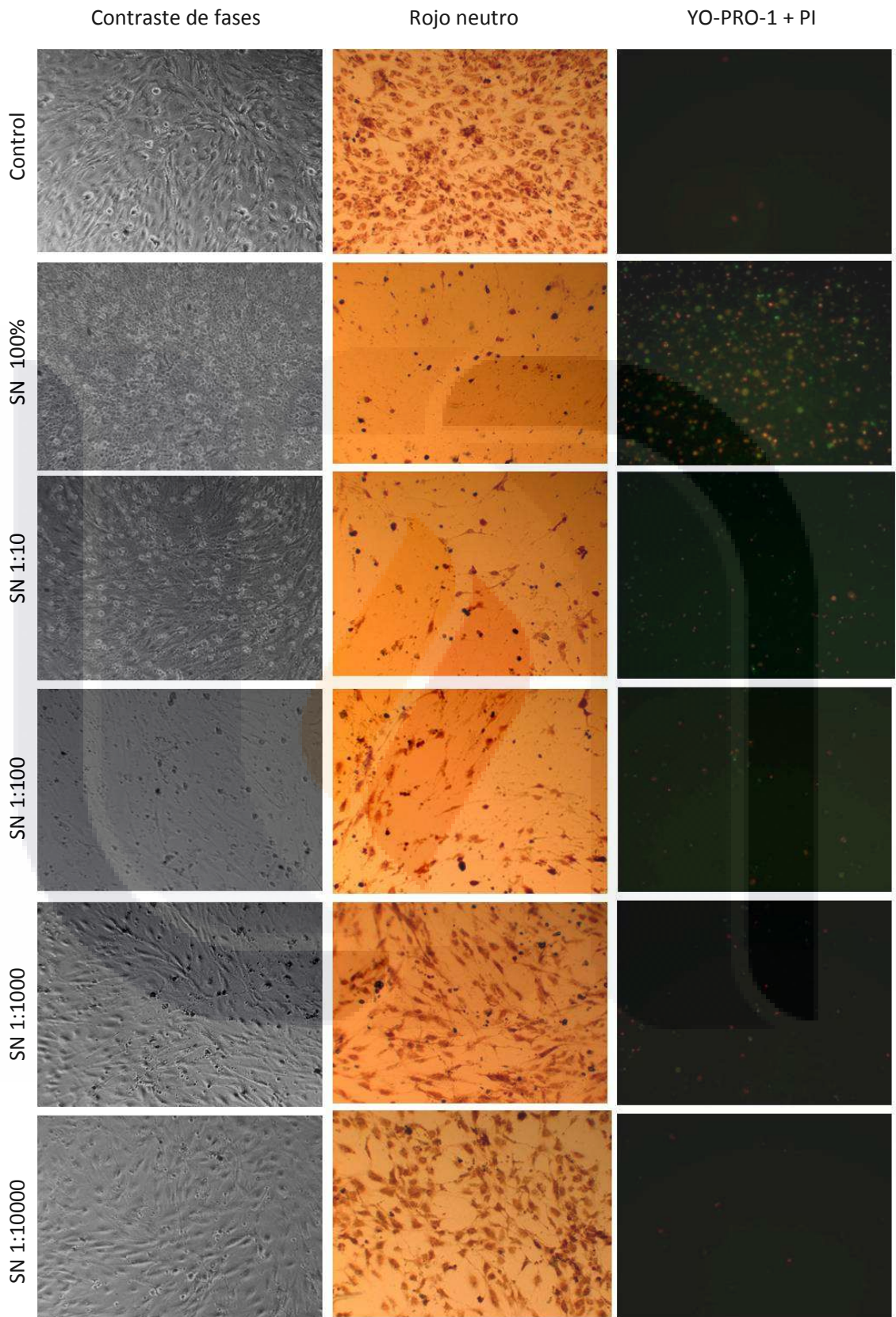


Figura 3. Curva de crecimiento de células endoteliales de aorta de cerdo. Los ensayos se realizaron por triplicado, se muestra el promedio de cada conteo celular con sus respectivas desviaciones estándar.

3.3. Citotoxicidad del sobrenadante de cultivo de *A. pleuropneumoniae* y tipo de muerte inducida.

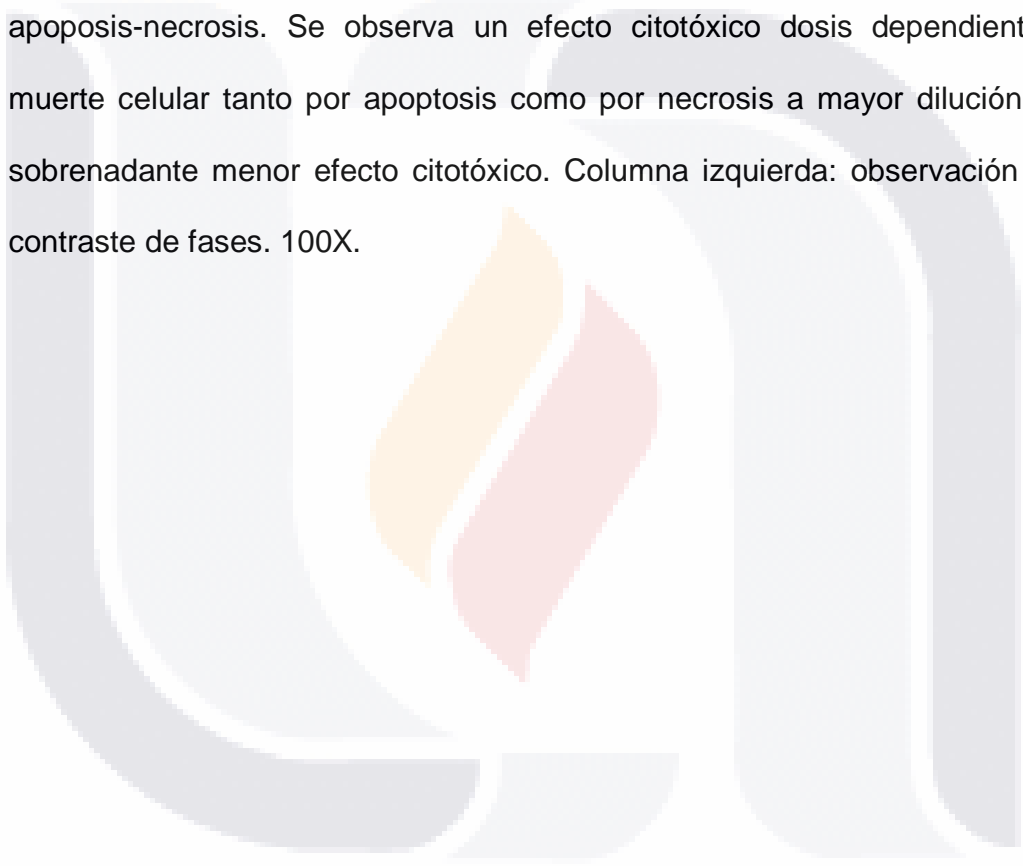
La incubación de las células endoteliales con el sobrenadante de cultivo bacteriano mostró un efecto citotóxico del mismo en forma dosis dependiente ya que a mayor dilución del sobrenadante el número de células que permanecieron viables fue mayor (Figura 4) lo cual fue detectado mediante tinción con el colorante Rojo neutro y posterior cuantificación por colorimetría (Figura 5).

El tipo de muerte inducida por el SN de cultivo bacteriano fue tanto por apoptosis como por necrosis (relación apoptosis/necrosis: 1.13 ± 0.081), como se observa en la Figura 6; las células que fluorescen en rojo denotan muerte por necrosis mientras que las que fluorescen de verde por apoptosis. Las células en apoptosis mostraron las características morfológicas típicas tales como condensación y fragmentación nuclear, desprendimiento de la caja de cultivo con formación de cuerpos apoptóticos. El efecto citotóxico fue dosis dependiente (Figuras 4 y 5) observándose que a mayor dilución del sobrenadante el efecto citotóxico fue menor, tal efecto o fue reversible. Mediante observación por contraste de fases, las células mostraron alteraciones morfológicas y desprendimiento de la caja de cultivo lo cual es característico de muerte celular; tal desprendimiento pudo corroborarse mediante tinción con rojo neutro en el que pudo observarse menor población celular adherida a la superficie de la caja.



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Figura 4. Efecto citotóxico del sobrenadante de cultivo de *A. pleuropneumoniae* sobre células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo. Posterior a la incubación de las células con diluciones del sobrenadante de cultivo bacteriano, las células fueron teñidas con rojo neutro para cuantificar la viabilidad celular (columna central) y con tinción fluorescente con YO-PRO + ioduro de propidio (columna derecha) para determinar el tipo de muerte apoptosis-necrosis. Se observa un efecto citotóxico dosis dependiente y muerte celular tanto por apoptosis como por necrosis a mayor dilución del sobrenadante menor efecto citotóxico. Columna izquierda: observación por contraste de fases. 100X.



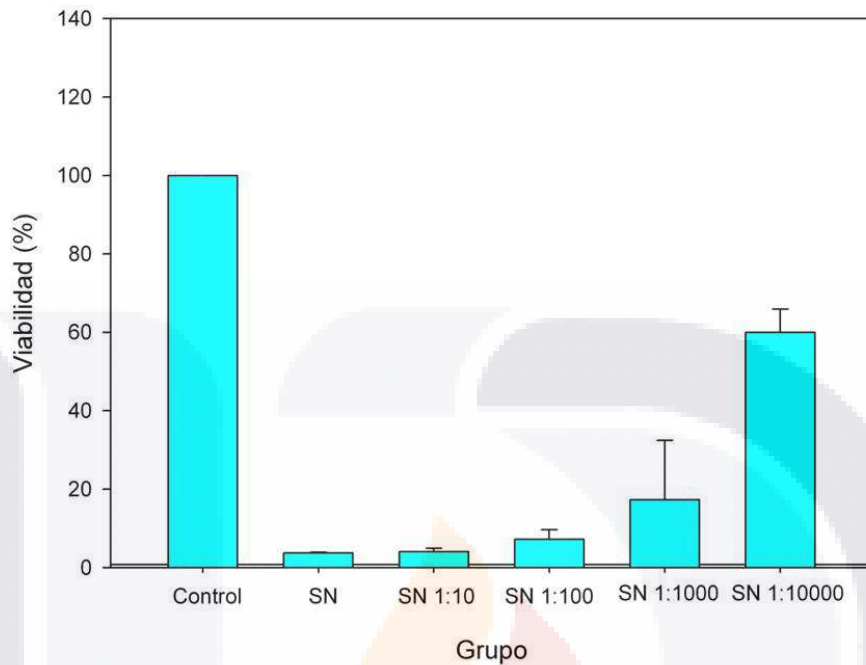


Figura 5. Cuantificación del efecto citotóxico del sobrenadante de cultivo de *A. pleuropneumoniae* sobre células endoteliales en cultivo. Las células posterior a la incubación con diluciones del sobrenadante se tiñeron con el colorante Rojo Neutro, se lavaron, se fijaron y posteriormente se eluyó el colorante al cual se le determinó la densidad óptica a 540 nm. La viabilidad está expresada como % del control (control sin tratamiento con la toxina 100% viabilidad).

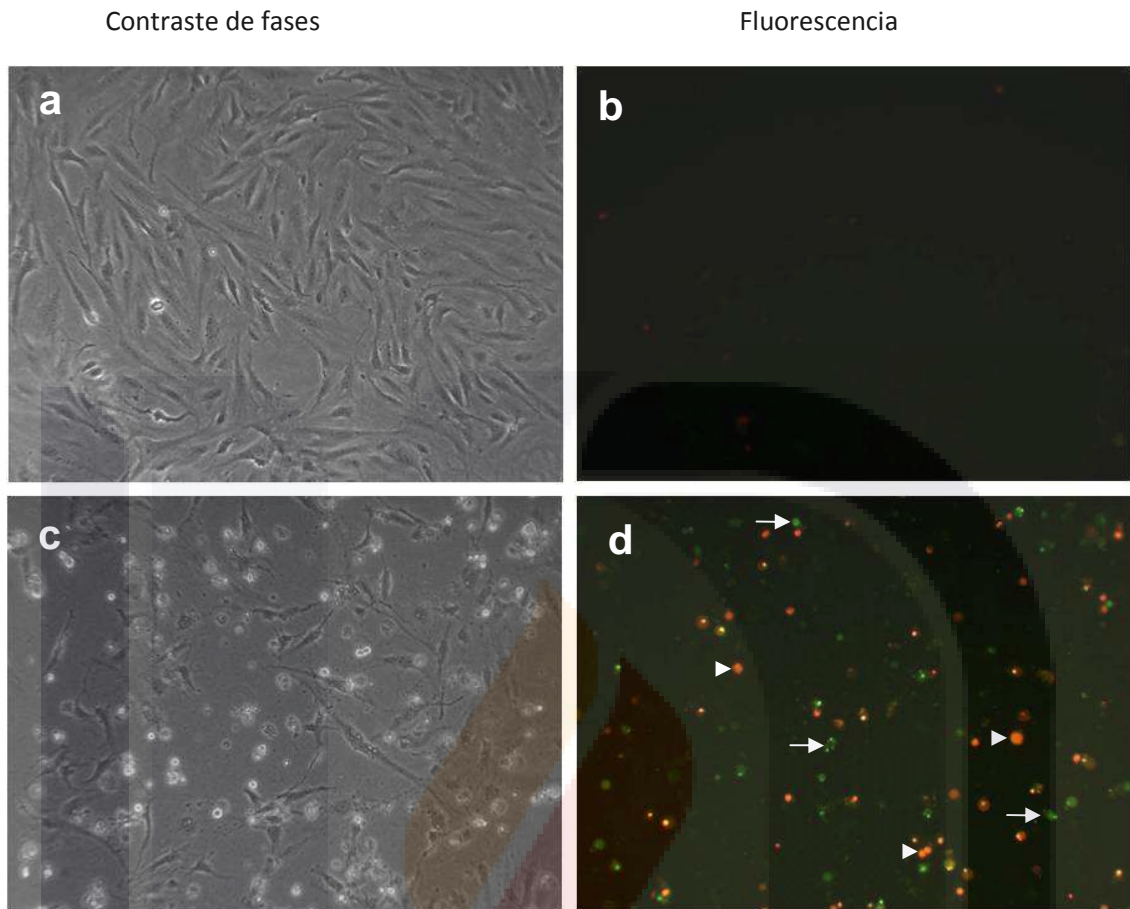


Figura 6. Tipo de muerte celular inducida por el sobrenadante de cultivo bacteriano de *A. pleuropneumoniae*. Las células a confluencia fueron incubadas con una dilución 1:10 del sobrenadante por 12 h y posteriormente teñidas con YO-PRO-1 y yoduro de propidio. Las células incubadas con la toxina cruda mostraron desprendimiento de la caja de cultivo además de fluorescencia verde (apoptosis) y roja (necrosis): la ausencia de fluorescencia en el control indicó que las células permanecen viables. a) y b) control sin toxina; c) y d) células con toxina. Las flechas indican células en apoptosis (fluorescencia verde) y las puntas de flecha indican células en necrosis (fluorescencia roja). 100 X.

3.4. Adherencia de *A. pleuropneumoniae* a células endoteliales

Los ensayos de adherencia se realizaron utilizando cultivos de células endoteliales a confluencia y la remoción total de bacterias no adherentes se realizó por medio de lavados con PBS corroborándose la ausencia de bacterias libres en los mismos por cultivo en agar BHI-NAD. La adherencia de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 a células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo pudo ser detectada morfológicamente por tinción con azul de metileno (Figura 7a) y confirmada por microscopia electrónica de barrido (Figura 7b). La observación por microscopia confocal mediante el reconocimiento de la actina filamentosa con faloidina-AlexaFluor 488 y el marcaje de las bacterias por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos marcados con AlexaFluor 594 (Figura 8) denotó la presencia de bacterias adheridas a las células endoteliales, internalización de las bacterias y adhesión a los microfilamentos de actina (Figura 8 c-j). Al realizar las observaciones a diferentes profundidades, se observó la presencia de bacterias en el interior de las células endoteliales asociadas con los microfilamentos de actina. En algunos casos, se observaron células redondeadas, con un citoesqueleto de actina no estructurado en microfilamentos (datos no mostrados), denotando la modificación en la estructura del citoesqueleto de actina. El tratamiento previo de la bacteria por fijación con formaldehído y por ebullición inhibió la adherencia indicando que la misma pudiera estar relacionada con interacciones específicas mediadas por proteínas tanto de la bacteria (adhesinas) como de la célula endotelial (receptores) ya que en experimentos por separado la bacteria fue incapaz de adherirse a células endoteliales previamente fijadas con formaldehído.

El número de bacterias adheridas por célula endotelial se incrementó en función del tiempo de incubación (Figura 9) y de la densidad bacteriana (Figura 10).

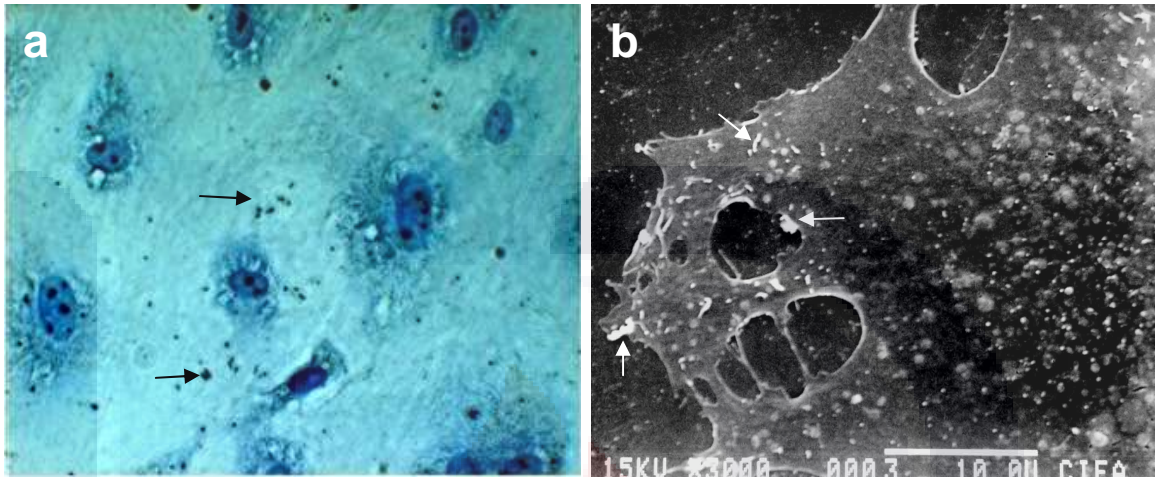
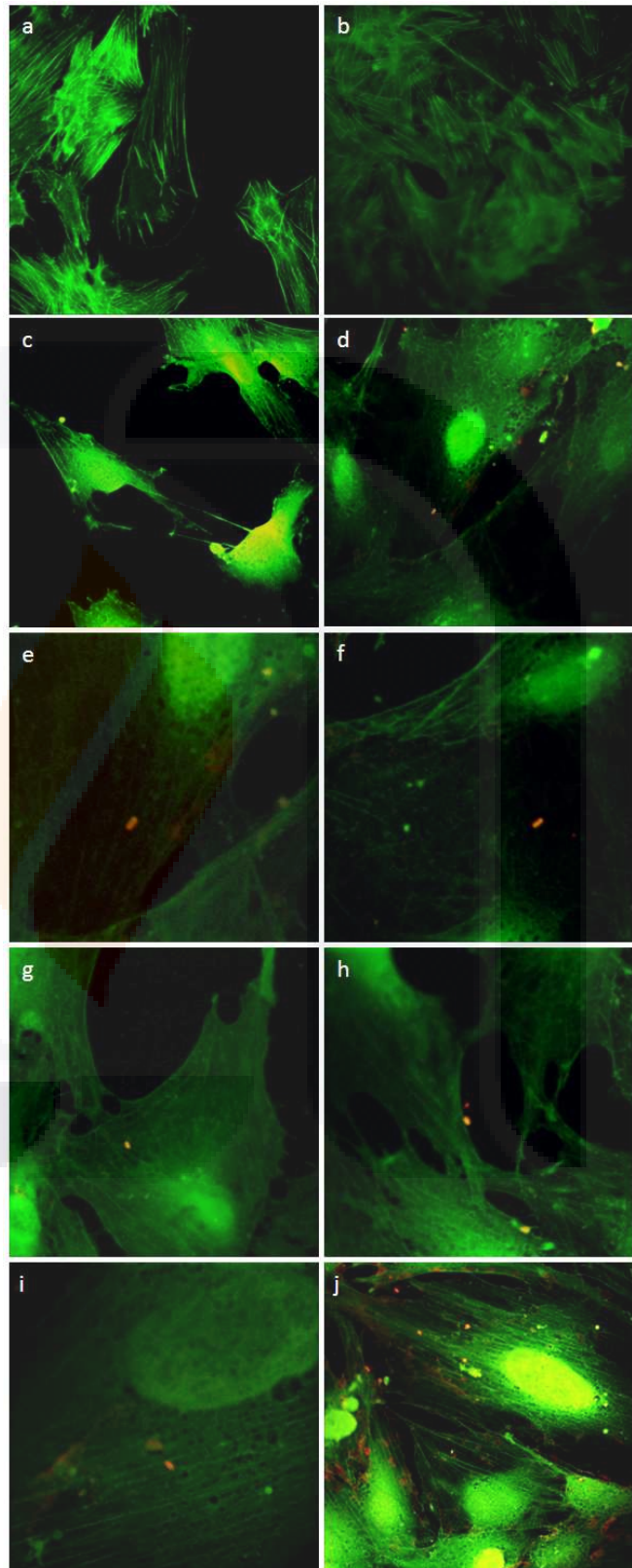


Figura 7. Adherencia de *A. pleuropneumoniae* a células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo. a) tinción con azul de metileno; b) Observación por microscopía electrónica de barrido.

Fig. 8. Células endoteliales en cultivo incubadas con *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 1, serotipo 1, cepa 4074. Tinción con faloidina Alexa Fluor 488 y anticuerpo policlonal anti-Ap reconocido por un anticuerpo secundario IgG anti conejo Alexa Fluor 594. a) Células endoteliales, b) células endoteliales marcadas con faloidina, incubadas con Ap pero sin anticuerpo secundario. c- j) Células endoteliales marcadas con faloidina y con el anticuerpo primario y secundario para Ap. Las bacterias presentan marcaje en color rojo (400 X).



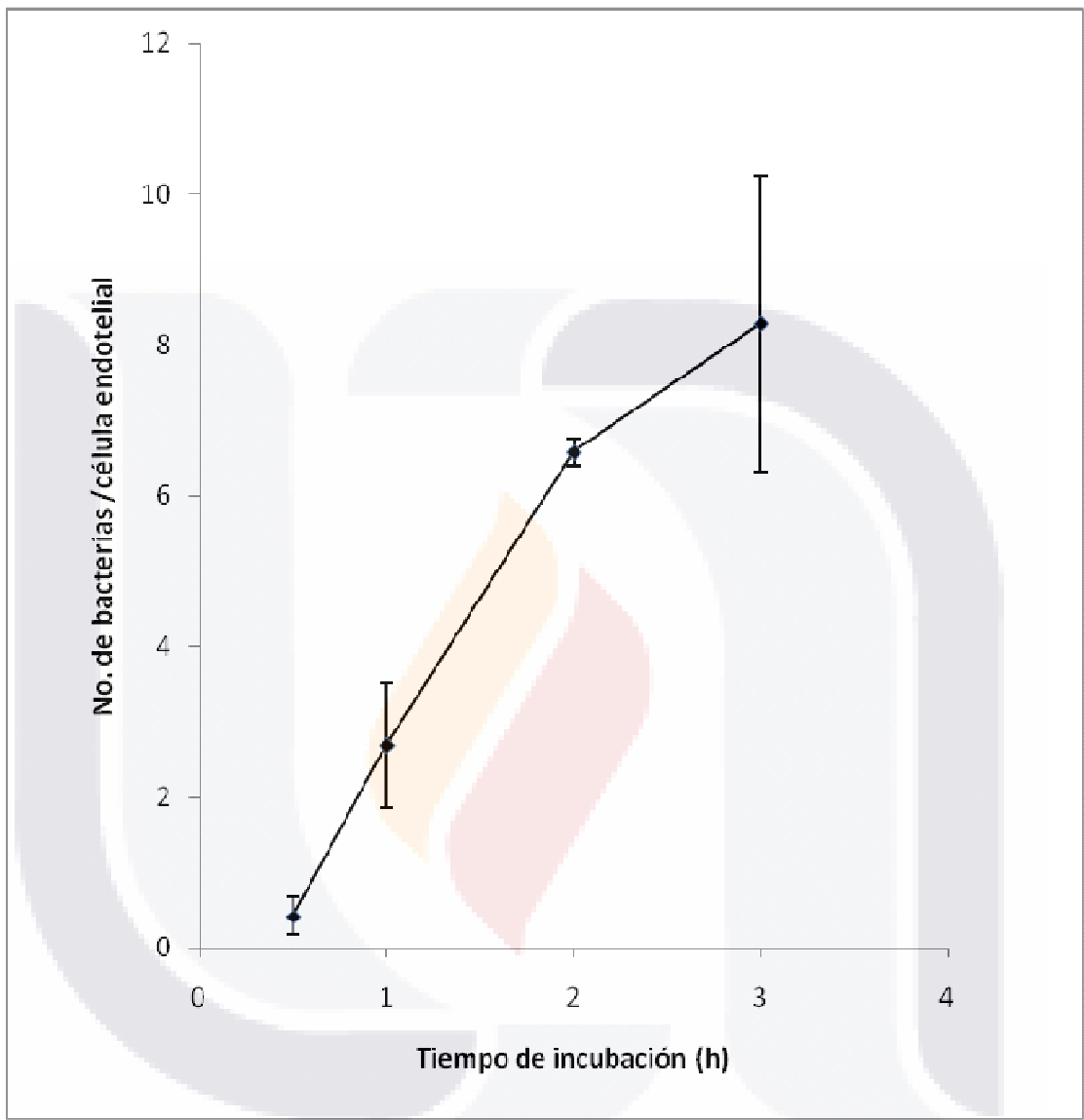


Figura 9. Efecto del tiempo de incubación sobre la adherencia de *A. pleuropneumoniae* a células endoteliales. La adherencia fue determinada a los 30 min, 1, 2 y 3 h. los puntos expresan el número de bacterias por célula endotelial a distintos tiempos y son el resultado de determinaciones por triplicado (media \pm 1 desviación estándar).

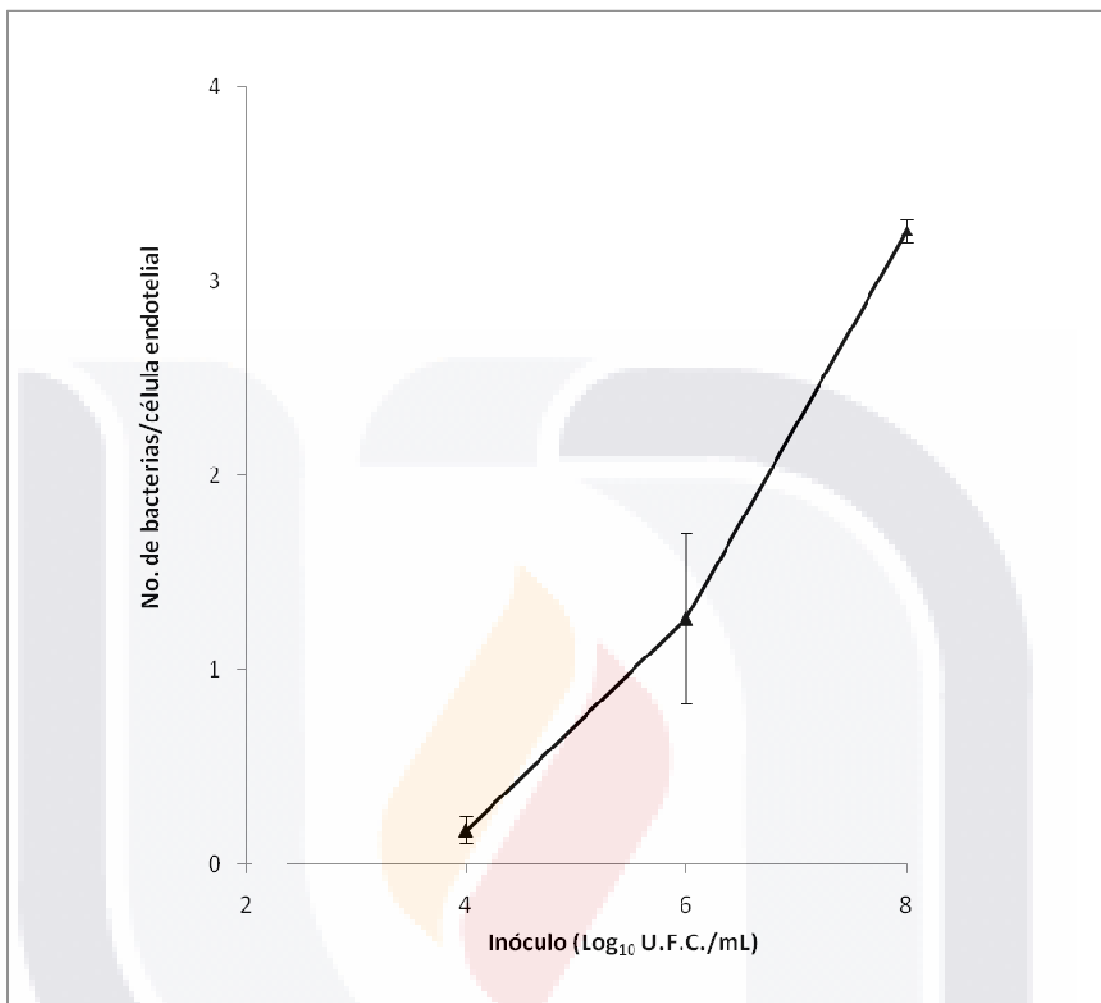


Figura 10. Efecto de la densidad bacteriana sobre la adherencia de *A. pleuropneumoniae* a células endoteliales. La adherencia fue determinada a densidades de 10^4 , 10^6 y 10^8 UFC/mL y 2h de incubación. Cada punto representa la media \pm 1 desviación estándar de tres determinaciones

3.5. Internalización de *A. pleuropneumoniae* a células endoteliales

La capacidad de *A. pleuropneumoniae* para internalizarse en las células endoteliales fue probada utilizando un ensayo de protección por antibiótico previamente utilizado para estudios de invasión de células endoteliales por *Streptococcus suis* (Benga y cols., 2005). Las bacterias se incubaron con las células endoteliales durante 2h para permitir la adherencia e invasión de las células, enseguida las monocapas fueron lavadas cinco veces e incubadas por otras dos horas con antibióticos para matar las bacterias extracelulares residuales enseguida se lavaron 3 veces las células con medio fresco para eliminar antibióticos y se lisaron con 1 mL de agua desionizada fría estéril por 3 min. Varias diluciones del lisado se sembraron en agar BHI-NAD, se incubaron a 37 °C por 24 horas y se contaron las UFC de las bacterias sobrevivientes al tratamiento con gentamicina las cuales fueron consideradas como intracelulares los resultados se muestran en el cuadro 1. Los controles sin células (control A) y los que fueron incubados simultáneamente con gentamicina (control B) no mostraron supervivencia de bacterias ante el tratamiento con el antibiótico indicando que la concentración utilizada y el tiempo de incubación fueron suficientes para matar las bacterias libres, no así en los cultivos (Experimental) en los que la supervivencia de las bacterias posterior a los lavados y al tratamiento con antimicrobiano es indicativo de protección contra el antibiótico lo cual sugiere una ubicación intracelular de la bacteria.

Cuadro 1. Internalización de *A. pleuropneumoniae* a células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo

260,000 ± 18,000 células endoteliales/caja			
1.06 x 10 ⁷ UFC de <i>A. pleuropneumoniae</i> ^a			
	Control A*	Control B**	Experimental***
UFC sobrevivientes a la gentamicina	0	0	60 ± 36 UFC
No. De bacterias internalizadas x10000 células	0	0	2.3 ± 1.38 UFC

^a Conteo al final de la incubación

* Caja de cultivo sin células endoteliales + bacterias

** Células endoteliales + gentamicina 100 µg/mL + bacterias.

*** Cellas endoteliales + bacterias

Capítulo 4

Discusión y conclusiones

Como parte de este trabajo, se reporta el aislamiento de células endoteliales de aorta de cerdo por un método de fácil ejecución y reproducibilidad; con el uso de esta técnica se reemplaza el tratamiento enzimático o de raspado de la superficie endotelial los cuales, resultan más laboriosos y con una recuperación menor de células en condiciones viables (Burciaga et al., 2008). Se ha reportado la necesidad de transfectar cultivos de células endoteliales con un plásmido conteniendo el genoma completo del virus de simio SV-40 a fin de lograr su inmortalización (Carrillo y cols., 2002). El cultivo desarrollado en este trabajo se ha subcultivado por más de dos años manteniendo sus características fenotípicas sin necesidad de transfectarse con SV-40. A la fecha, los cultivos no muestran signos aparentes de senescencia ni de pérdida de su función endocítica de LDL acetilada lo cual pudiera ser sugerente de que han adquirido inmortalización. El contar con modelos *in vitro* de células endoteliales permitirá estudiar el comportamiento de dichas células ante agresiones por factores tales como infecciones bacterianas y virales, toxinas, radicales libres, hormonas, etc. (Kvietys y Granger, 1997), además de que representará una herramienta valiosa para estudiar la participación del endotelio en enfermedades hemorrágicas que afectan a los cerdos tales como la pleuroneumonía porcina o como la fiebre clásica porcina.

A. pleuropneumoniae produce vesículas formadas por lipopolisacáridos, fosfolípidos y lipoproteínas las cuales contienen los principales factores de virulencia como toxinas, proteasas y ureasa entre otros (Negrete-Abascal y cols., 2000). Tales vesículas otorgan a la bacteria la habilidad para acceder a múltiples ambientes dentro del hospedero encontrándose tanto en medios extracelulares como intracelulares.

Las toxinas producidas por *A. pleuropneumoniae* pueden formar poros en las células blanco (Maier y cols., 1996), resultando en un desbalance osmótico que provoca hinchamiento y muerte celular; también, las toxinas pueden provocar un incremento en la producción de radicales libres de oxígeno por macrófagos y neutrófilos resultando en daño a las células vecinas y provocando daño tisular y destrucción (Cho y Chae, 2003). Tal efecto sobre las células del hospedero puede ser el responsable de las lesiones características de la infección como son la aparición de edema y de lesiones hemorrágicas y necróticas.

Diversos microorganismos han demostrado la capacidad para inducir apoptosis de células endoteliales la cual puede atribuirse al lipopolisacárido (LPS) [Bannerman y Goldblum, 2003], a la producción de citolisinas, a la generación de radicales libres de oxígeno por las mismas células endoteliales o por los macrófagos circulantes y la formación de poros en la membrana celular (Maier y cols., 1996). Tales factores pueden provocar la activación de señales que provocan la activación de caspasas o provocar apoptosis por influjo masivo de calcio, o por liberación de citocromo c mitocondrial inducida por toxinas que son translocadas hasta la mitocondria (Bannerman y Goldblum, 2003; Florentini y cols., 2003).

En este trabajo se reporta el efecto citotóxico de las toxinas de *A. pleuropneumoniae* sobre células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo, tal efecto, fue primeramente demostrado por Serebrin y cols. (Serebrin y cols., 1991); sin embargo, este es el primer reporte que demuestra que el tipo de muerte celular inducido es tanto por apoptosis como por necrosis aunque se requieren más estudios tendientes a cofirmar tal fenómeno así como a dilucidar la vía apoptósica inducida; esto último, sería de especial interés a fin de establecer las bases de intervención farmacológica dirigida a evitar la afectación del endotelio y la diseminación sistémica de la bacteria en el hospedero.

La adherencia de bacterias patógenas a células endoteliales ha sido demostrada en casos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Bartonella henselae*, *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia trachomatis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella bovis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Ofek y cols., 2003); igualmente, se ha reportado la adherencia de *A. pleuropneumoniae* a células bucoepiteliales (Hamer-Barrera y cols., 2004), a células pulmonares (Boekema y cols., 2003), a células traqueales (Jacques y cols., 1991) y a células epiteliales alveolares (Van Overbeke y cols., 2002). Previo a la interacción de bacterias con el endotelio vascular, ocurre diseminación de las mismas desde los sitios de lesión tisular a la circulación sanguínea lo cual es una característica de la pleuroneumonía porcina en la que ha sido descrita la bacteremia y la presencia de *A. pleuropneumoniae* en tejidos extrapulmonares como pericardio, endocardio y hueso. En este trabajo, se reporta

por primera vez la adherencia de *A. pleuropneumoniae* a una línea de células endoteliales derivadas de aorta de cerdo establecida en nuestro laboratorio para tal propósito. No existe un criterio general para designar cepas adhesivas en base al número de bacterias adheridas a una célula o tejido, sin embargo, la sola presencia de una bacteria adherida por célula endotelial puede ser suficiente para iniciar la fase de colonización y la alteración del endotelio ya sea por la bacteria misma o por sus toxinas. Las células endoteliales tanto *in vivo* como *in vitro* producen proteínas de matriz extracelular cuya participación en la adherencia a bacterias ha sido descrita, tales como colágena, fibronectina, vitronectina (Enriquez-Verdugo y cols., 2004; Hammer-Barrera y cols., 2004; Valentin-Weigan y cols., 1988), moléculas de adhesión celular (CAM), etc.; tales moléculas interactúan con adhesinas bacterianas tales como lipopolisacáridos, proteínas de membrana externa, fimbrias, etc. Este reporte es un primer acercamiento al estudio de la interacción entre *A. pleuropneumoniae* y células endoteliales.

Algunas bacterias tales como *Rickettsiae*, *Bartonella henselae*, *Chlamydia pneumoniae* y *Listeria* tienen capacidad para internalizarse, persistir y replicarse en el endotelio y otras más, como *S. pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* pueden entrar de manera transitoria a la célula endotelial (Hippenstiel y cols., 2003); en este trabajo, reportamos la internalización de *A. pleuropneumoniae* a células endoteliales demostrado esto, por un método ampliamente utilizado (Stins y cols., 1999; Charland y cols., 2000; Benga y cols, 2005; Tenenbaum y cols, 2005; Vanier y cols., 2007; Vanier y cols., 2006; Vanier y cols., 2004) el cual se basa en la protección intracelular de la bacteria al efecto antimicrobiano de la gentamicina la

cual no es captada por la célula endotelial y además posee fuerte poder antimicrobiano contra *A. pleuropneumoniae* (Concentración mínima inhibidora ₉₀ of 2 µg/ml) (Nadeau y cols., 1988; Chang y cols., 2002).

En este reporte, se cuantificó el total de las bacterias asociadas a las células endoteliales y se determinó la posibilidad de su localización en el nicho intracelular mediante el ensayo de protección contra antibióticos. El presente estudio muestra la invasión de dichas células por *A. pleuropneumoniae*; su internalización y asociación con el citoesqueleto de microfilamentos. Falta realizar más estudios para determinar los mecanismos mediante los cuales la bacteria se internaliza y modifica el citoesqueleto de actina, así como para determinar las moléculas involucradas en la producción de muerte celular programada tanto por la presencia de la bacteria, como por la acción de sus exotoxinas.

Conclusiones

1. Se logró el establecimiento y la caracterización de cultivos de células endoteliales de aorta de cerdo
2. Se demostró el efecto citotóxico y el tipo de muerte celular inducida por el sobrenadante de cultivo de *A. pleuropneumoniae* sobre células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo.
3. Se demostró la adherencia y la internalización de *A. pleuropneumoniae* a células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo.

Perspectivas

El modelo establecido de células endoteliales en cultivo nos permitirá realizar otros estudios relacionados con la interacción hospedero-patógeno que afectan al endotelio así como estudiar el efecto de diversos factores sobre el mismo.

Los datos aquí mostrados podrán servir como punto de partida para mayores investigaciones relacionadas con la interacción bacteria-célula endotelial que afectan a animales y a los humanos.

Referencias

Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007;100:158-173.

Ajito T, Haga Y, Homma S, Goryo M, Okada K. Immunohistological evaluation on respiratory lesions of pigs intranasally inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J Vet Med Sci* 1996;58:297-303.

Altman E, Brisson JR, Perry MB. Structural studies of the capsular polysaccharide from *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 1. *Biochem Cell Biol* 1986;64:707-716.

Baarsch MJ, Foss DL, Murtaugh MP. Pathophysiologic correlates of acute porcine pleuropneumonia. *Am J Vet Res* 2000;61:684-690.

Baarsch MJ, Scamurra RW, Burger K, Foss DL, Maheswaran SK, Murtaugh MP. Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* 1995;63:3587-3594.

Baldwin AL, Thurston G. Mechanics of endothelial cell architecture and vascular permeability. *Crit Rev Biomed Eng* 2001; 29:247-278.

Baltes N, Hennig-Pauka I, Gerlach GF. Both transferrin binding proteins are virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection. *FEMS Microbiol Lett* 2002;209:283-287.

Baltes N, Tonpitak W, Gerlach GF, Hennig-Pauka I, Hoffmann-Moujahid A, Ganter M, Rothkotter HJ. *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport and urease activity: effects on bacterial virulence and host immune response. *Infect Immun*. 2001;69:472-478.

Bandara AB, Lawrence ML, Veit HP, Inzana TJ. Association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* capsular polysaccharide with virulence in pigs. *Infect Immun* 2003;71:3320-3328.

Bannerman DD, Goldblum SE. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284:899-914,

Beudet R, McSween G, Boulay G, Rousseau P, Bisailon JG, Descoteaux JP, Ruppanner R. Protection of mice and swine against infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* by vaccination. *Vet Microbiol* 1994;39:71-81.

Beddek AJ, Sheehan BJ, Bossé JT, Rycroft AN, Kroll JS, and Langford PR. Two TonB Systems in *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Their Roles in Iron Acquisition and Virulence. *Infection and Immunity* 2004; 72:701-708.

Belanger M, Dubreuil D, Harel J, Girard C, Jacques M. Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect Immun* 1990; 58:3523-3530.

Belanger M, Dubreuil D, Jacques M. Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* 1994;62:868-873.

Belanger M, Rioux S, Foiry B, Jacques M. Affinity for porcine respiratory tract mucus is found in some isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 1992;76:119-125.

Benga L, Friedl P, Valentin-Weigand P. Adherence of *Streptococcus suis* to porcine endothelial cells. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2005; 52:392-395.

Bertram TA. Quantitative morphology of peracute pulmonary lesions in swine induced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet Pathol* 1985;22:598-609.

Bhakdi S, Grimminger F, Suttorp N, Walmrath D, Seeger W. Proteinaceous bacterial toxins and pathogenesis of sepsis syndrome and septic shock: the unknown connection. *Med Microbiol Immunol* 1994;183:119-144.

Blackall PJ, Klaasen HL, van den Bosch H, Kuhnert P, Frey J. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet Microbiol* 2002;84:47-52.

Boekema BK, Stockhofe-Zurwieden N, Smith HE, Kamp EM, van Putten JP, Verheijden JH. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to primary cultures of porcine lung epithelial cells. *Vet Microbiol* 2003;93:133-144.

Boekema BK, Van Putten JP, Stockhofe-Zurwieden N, Smith HE. Host cell contact-induced transcription of the type IV fimbria gene cluster of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* 2004;72:691-700.

Bosse JT, Janson H, Sheehan BJ, Beddek AJ, Rycroft AN, Kroll JS, Langford PR. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect* 2002;4:225-235.

Bosse JT, MacInnes JI. Urease activity may contribute to the ability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to establish infection. *Can J Vet Res* 2000;64:145-150.

Buttenschøn J, Friis NF, Aalbæk B, Jensen TK, Iburg T, Mousing J: Microbiology and pathology of fibrinous pericarditis in Danish slaughter pigs. *J Vet Med* 1997;44:271–280.

Bryant AE. Biology and pathogenesis of thrombosis and procoagulant activity in invasive infections caused by group A streptococci and *Clostridium perfringens*. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:451-462.

Byrd W, Kadis S. Structures and sugar compositions of lipopolysaccharides isolated from seven *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. *Infect Immun* 1989;57:3901-3906.

Carrillo A, Chamorro S, Rodríguez-Gago M, Alvarez B, Molina MJ, Rodríguez-Barbosa JI *et al.* Isolation and characterization of immortalized porcine aortic endothelial cell lines. *Vet. Immunol Immunopathol* 2002; 89:91-98.

Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect Immun* 2000;68:6511-6518.

Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun* 1999;67:3703-3713.

Chang CF, Chang LC, Chang YF, Chen M, Chiang TS. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Salmonella choleraesuis* recovered from Taiwanese swine. *J Vet Diagn Invest* 2002;14:153–157.

Charland N, Nizet V, Rubens CE, Kim KS, Lacouture S, Gottschalk M. Streptococcus suis serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun*. 2000;68:637-643.

Chiers K, Donne E, Van Overbeke I, Ducatelle R, Haesebrouck F. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. *Vet Microbiol* 2002;85:343-352.

Cho WS, Chae C. In vitro effects of *Actinobacillus pleuropneumoniae* on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in porcine alveolar macrophages. *Am J Vet Res*. 2003;64:1514-1518

Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91:3527-3561.

Coleman ML and Olson MF. Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death Differ* 2002;9:493–504.

Cornejo-Amador MGC. Descripción del daño estructural pulmonar en cerdos portadores crónicos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Maestría en Ciencias Morfológicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Ags., México. 2006 (Tesis).

Crujisen TLM. Phagocytosis and Killing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by Alveolar Macrophages and Polymorphonuclear Leukocytes Isolated from Pigs. *Infect Immun* 1992;60:4867-4871.

Cruz WT, Nedialkov YA, Thacker BJ, Mulks MH. Molecular characterization of a common 48-kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* 1996;64:83-90.

Dame TM, Orenzoff BL, Palmer LE, Furie MB. IFN-gamma alters the response of *Borrelia burgdorferi*-activated endothelium to favor chronic inflammation. *J Immunol*. 2007;178:1172-1179.

Deneer HG, Potter AA. Identification of a maltose-inducible major outer membrane protein in *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae*. *Microb Pathog* 1989;6:425-432.

Deneer HG, Potter AA. Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae*. *Infect Immun*. 1989 Mar;57(3):798-804.

Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:334-350.

Dom P, Haesebrouck F, Ducatelle R, Charlier G. In vivo association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs. *Infect Immun* 1994;62:1262-1267.

Dom P, Haesebrouck F, Kamp EM, Smits MA. Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and its cytotoxins on porcine neutrophil chemiluminescence. *Infect Immun* 1992;60:4328-4334.

Dom P, Haesebrouck F, Kamp EM, Smits MA. NAD-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains: production of RTX toxins and interactions with porcine phagocytes. *Vet Microbiol* 1994;39:205-218.

Dubreuil JD, Jacques M, Mittal KR and Gottschalk M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Animal Health Research Reviews* 2000;1:73-93.

Enríquez-Verdugo, I., Godínez, D., Martínez Zúñiga, R., Hamer Barrera, R., De la Garza, Serrano-Luna, J.J. y Guerrero-Barrera, A.L. 2003-4. Adhesión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a componentes de matriz extracelular de cerdo. *Ciencia Veterinaria*, México. 9:269-293.

Enríquez-Verdugo I, Guerrero AL, Serrano JJ, Godínez D, Rosales JL, Tenorio V, de la Garza M. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine-lung collagen. *Microbiology* 2004; 150:2391-2400.

Felnerova D, Kudela P, Bizik J, Haslberger A, Hensel A, Saalmuller A, Lubitz W. T cell-specific immune response induced by bacterial ghosts. *Med Sci Monit* 2004;10:BR362-370.

Fenwick BW, Osburn BI, Olander HJ. Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am J Vet Res* 1986;47:1433-1441.

Finlay BB, Cossart P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 1997;276:718-25.

Florentini C, Falzano L, Travaglione S and Fabbri A. Hijacking Rho GTPases by protein toxins and apoptosis: molecular strategies of pathogenic bacteria *Cell Death and Differentiation* 2003;10:147–152.

Frey J, Beck M, Van Den Bosch JF, Segers RP, Nicolet J: Development of an efficient PCR method for toxin typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Mol Cell Probes* 1995;9:277-282.

Frey J, Bosse JT, Chang YF, Cullen JM, Fenwick B, Gerlach GF, Gygi D, Haesebrouck F, Inzana TJ, Jansen R, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. *J Gen Microbiol* 1993;139:1723-1728.

Gerlach GF, Anderson C, Klashinsky S, Rossi-Campos A, Potter AA, Willson PJ. Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (OmlA) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect Immun* 1993;61:565-572.

Gordon AH, Hart PD, Young MR. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* 1980;286:79-80.

Greiffenberg L, Goebel W, Kim KS, Daniels J, Kuhn M. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: an electron microscopic study. *Infect Immun* 2000;68:3275-3279.

Guerrero-Barrera AL, de la Garza M, Mondragón R, García-Cuéllar C, Segura-Nieto M. Actin-related proteins in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and their interactions with actin-binding proteins. *Microbiology* 1999;145:3235-3244.

Hall A. Small GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998; 279:509–514.

Hamer-Barrera R, Godínez D, Enríquez VI, Vaca-Pacheco S, Martínez-Zúñiga R, Talamás-Rohana P, Suárez-Güemez F, de la Garza M. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 to swine buccal epithelial cells involves fibronectin. *Can J Vet Res* 2004;68:33-41.

Hippenstiel S, Suttorp N. Interaction of pathogens with the endothelium. *Thromb Haemost* 2003;89:18-24.

Hitchcock PJ, Leive L, Makela PH, Rietschel ET, Strittmatter W, Morrison DC. Lipopolysaccharide nomenclature--past, present, and future. *J Bacteriol* 1986;166:699-705.

Hoepelman AI, Tuomanen EI. Consequences of microbial attachment: directing host cell functions with adhesins. *Infect Immun* 1992;60:1729-1733.

Huang H, Potter AA, Campos M, Leighton FA, Willson PJ, Haines DM, Yates WD. Pathogenesis of porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae*, part II: roles of proinflammatory cytokines. *Can J Vet Res* 1999;63:69-78.

Idris UE, Harmon BG, Udeze FA, Kadis S: Pulmonary lesions in mice inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin and lipopolysaccharide. *Vet Pathol* 1993; 30:234-241.

Inzana TJ. Capsules and virulence in the HAP group of bacteria. *Can J Vet Res* 1990;54 Suppl:S22-7.

Ito H, Uchida I, Sekizaki T, Ooishi E, Kawai T, Okabe T, Taneno A, Terakado N. Molecular cloning of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane lipoprotein (OmlA) from serotype 5a. *Microb Pathog* 1995;18:29-36.

Jacques M, Belanger M, Roy G, Foiry B. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal epithelial cells and frozen lung sections. *Vet Microbiol* 1991;27:133-143.

Jacques M. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends Microbiol* 1996;4:408-409.

Jansen R, Briaire J, Smith HE, Dom P, Haesebrouck F, Kamp EM, Gielkens AL, Smits MA. Knockout mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 that are devoid of RTX toxins do not activate or kill porcine neutrophils. *Infect Immun*. 1995. 63(1):27-37.

Jensen TK, Boye M, Hagedorn-Olsen T, Riising HJ, Angen O. *Actinobacillus pleuropneumoniae* Osteomyelitis in Pigs Demonstrated by Fluorescent In Situ Hybridization. *Vet Pathol* 1999;36:258-261.

Jessing SG, Ahrens P, Inzana TJ, Angen O. The genetic organisation of the capsule biosynthesis region of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 6, 7, and 12. *Vet Microbiol* 2008;129:350-359.

Kamp EM, Vermeulen TM, Smits MA, Haagsma J. Production of Apx toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. *Infect Immun* 1994;62:4063-4065.

Karch H. The role of virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)--associated hemolytic-uremic syndrome. *Semin Thromb Hemost* 2001;27:207-213.

Keller TT, Mairuhu AT, de Kruif MD, Klein SK, Gerdes VE, ten Cate H *et al.* Infections and endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2003;60:40-48.

Kokotovic B, Angen Ø. Genetic diversity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* assessed by amplified fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2007;45:3921-3929.

Krull M, Dold C, Hippenstiel S, Rosseau S, Lohmeyer J, Suttorp N. *Escherichia coli* hemolysin and *Staphylococcus aureus* alpha-toxin potently induce neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J Immunol* 1996;157:4133-4140.

Kuehn MJ, Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* 2005;19:2645-2655.

Kvietys P and Granger DN. Endothelial cell monolayers as a tool for studying microvascular patho-physiology. *Am J Physiol* 1997;273:1189-1199.

Lambotin M, Hoffmann I, Laran-Chich MP, Nassif X, Couraud PO, Bourdoulous S. Invasion of endothelial cells by *Neisseria meningitidis* requires cortactin recruitment by a phosphoinositide-3-kinase/Rac1 signalling pathway triggered by the lipooligosaccharide. *J Cell Sci* 2005;118:3805-3816.

Langford PR, Loynds BM, Kroll JS. Cloning and molecular characterization of Cu,Zn superoxide dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* 1996;64:5035-5041.

Liggett, A. D., L. R. Harrison, and R. L. Farrell.. Sequential study of lesion development in experimental *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Res Vet Sci* 1987; 42:204-221.

Lione VO, Santos GS, Hirata Junior R, Mattos-Guaraldi AL, Nagao PE. Involvement of intercellular adhesion molecule-1 and beta1 integrin in the internalization process to human endothelial cells of group B *Streptococcus* clinical isolates. *Int J Mol Med* 2005;15:153-157.

Lopes Bezerra LM, Filler SG. Interactions of *Aspergillus fumigatus* with endothelial cells: internalization, injury, and stimulation of tissue factor activity. *Blood* 2004;103:2143-2149.

MacInnes JI, Rosendal S. Analysis of major antigens of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* and related organisms. *Infect Immun* 1987;55:1626-1634.

Maier E, Reinhard N, Benz R, Frey J. Channel-forming activity and channel size of the RTX toxins ApxI, ApxII, and ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* 1996;64:4415-4423.

Martin TR, Frevert CW. Innate immunity in the lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2:403-411.

Menzies BE, Kourteva I. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect Immun* 1998;66:5994-5998.

Menzies BE, Kourteva I. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000;29:39-45.

Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 2003;196:430-443.

Min K, Chae C. Detection and distribution of DNA of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the lungs of naturally infected pigs by in-situ hybridization. *J Comp Pathol* 1998;119:169-175.

Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 1995;59:451-480.

Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. an enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976;263:663-665.

Mulks MH, Moxon ER, Bricker J, Wright A, Plaut AG. Examination of *Haemophilus pleuropneumoniae* for immunoglobulin A protease activity. *Infect Immun* 1984;45:276-277.

Muro S, Wiewrodt R, Thomas A, Koniaris L, Albelda SM, Muzykantov VR, Koval M. A novel endocytic pathway induced by clustering endothelial ICAM-1 or PECAM-1. *J Cell Sci* 2003;116:1599-1609.

Myers MJ, Farrell DE, Snider TG 3rd, Post LO. Inflammatory cytokines, pleuropneumonia infection and the effect of dexamethasone. *Pathobiology* 2004;71:35-42.

Nadeau M, Lariviere S, Higgins R and Martineau GP. Minimal Inhibitory Concentrations of Antimicrobial Agents Against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can J Vet Res* 1988; 52: 315-318

Negrete-Abascal E, Garcia RM, Reyes ME, Godinez D, de la Garza M. Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and Apx. toxins. *FEMS Microbiol Lett* 2000;191:109-113.

Negrete-Abascal E, Reyes ME, Garcia RM, Vaca S, Giron JA, Garcia O, Zenteno E, De La Garza M. Flagella and Motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Bacteriol* 2003;185:664-668.

Negrete-Abascal E, Tenorio VR, Serrano JJ, Garcia C, de la Garza M. Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *Can J Vet Res* 1994;58:83-86.

Negrete-Abascal, E., Tenorio, V.R., Guerrero, A.L., Garcia, R.M., Reyes, M.E., and de la Garza, Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen common to all the serotypes. *Can J Vet Res* 1998;62:183-190.

Nicolet J: *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Diseases of Swine, ed. Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'Allaire S, and Taylor DJ, 7th ed., pp. 40–408. Iowa State University Press, Ames, IA, 1992

Ofek I, Hasty DL, Doyle RJ Bacterial Adhesion to animal cells and tissues. Washington DC: ASM Press, 2003.

Orfanos SE, Kotanidou A, Glynos C, Athanasiou C, Tsigkos S, Dimopoulou I *et al*. Angiopoietin-2 is increased in severe sepsis: correlation with inflammatory mediators. *Crit Care Med* 2007;35:199-206.

Paradis SE, Dubreuil D, Rioux S, Gottschalk M, Jacques M. High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infect Immun* 1994;62:3311-3319.

Paradis SE, Dubreuil JD, Gottschalk M, Archambault M, Jacques M. Inhibition of adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells by monoclonal antibodies directed against LPS and partial characterization of the LPS receptors. *Curr Microbiol* 1999;39:313-320.

Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 1994;48:585-617.

Plendl J. Angiogenesis and vascular regression in the ovary. *Anat Histol Embryol* 2000;29:257-266.

Pohl S, Bertschinger HU, Fredericksen W and Mannheim W Transfer of *Hemophilus pleuropneumoniae* and *Pasteurella haemolytica*-like organisms causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *Int J Syst Bacteriol* 1983;33:357-368.

Pries AR, Kuebler WM. Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 2006;(176 Pt 1):1-40.

Puolakkainen M, Kuo CC, Campbell LA. *Chlamydia pneumoniae* uses the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor for infection of endothelial cells. *Infect Immun* 2005;73:4620-4625.

Ramjeet M, Deslandes V, St Michael F, Cox AD, Kobisch M, Gottschalk M, Jacques M. Truncation of the lipopolysaccharide outer core affects susceptibility to antimicrobial peptides and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J Biol Chem* 2005;280:39104-39114.

Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000;157:1415-1430.

Reimer D, Frey J, Jansen R, Veit HP, Inzana TJ. Molecular investigation of the role of ApxI and ApxII in the virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Microb Pathog* 1995;18:197-209.

Reyes M. R.; Lazalde B. Cell growth in vitro directed by handmade patterns. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim* 40: 258–261; 2004.

Rioux S, Bégin C, Dubreuil JD, Jacques M. Isolation and characterization of LPS mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Curr Microbiol* 1997;35:139-144.

Rioux S, Galarneau C, Harel J, Kobisch M, Frey J, Gottschalk M, Jacques M. Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Microb Pathog* 2000;28:279-289.

Roth GA, Moser B, Huang SJ, Brandt JS, Huang Y, Papapanou PN *et al.* Infection with a periodontal pathogen induces procoagulant effects in human aortic endothelial cells. *J Thromb Haemost* 2006;4:2256-2261.

Rubanyi GM Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 1994;46:325-415.

Sato Y. Current Understanding of the Biology of Vascular Endothelium. *Cell Structure and Function* 2001;26:9-10.

Schaller A, Djordjevic SP, Eamens GJ, Forbes WA, Kuhn R, Kuhnert P, Gottschalk M, Nicolet J, Frey J. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene apxIVA. *Vet Microbiol* 2001;79:47-62.

Serebrin S, Rosendal S, Valdivieso-Garcia A, Little PB. Endothelial cytotoxicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Res Vet Sci* 1991;50:18-22.

Shakarj L, Mikael LG, Srikumar R, Kobish M, Coulton JW and Jacques M. Fhva and HgbA, outer membrane proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: their role as virulence determinants. *Can J Microbiol* 2006;52:391-396.

Sheehan BJ, Langford PR, Rycroft AN, Kroll JS. [Cu,Zn]-Superoxide dismutase mutants of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* are unattenuated in infections of the natural host. *Infect Immun* 2000;68:4778-4781.

Shope RE. Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology, and pathology. *J Exp Med* 1964;119:357-368.

Stins MF, Nemani PV, Wass C, Kim KS. Escherichia coli binding to and invasion of brain microvascular endothelial cells derived from humans and rats of different ages. *Infect Immun*. 1999;67:5522-5525.

Tarigan S, Slocombe RF, Browning GF, Blackall PJ. Characterisation of haemolytic RTX toxins produced by Australian isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Aust Vet J* 1996;73:164-169.

Tascon RI, Vazquez-Boland JA, Gutierrez-Martin CB, Rodriguez-Barbosa I, Rodriguez-Ferri EF. The RTX haemolysins ApxI and ApxII are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. *Mol Microbiol* 1994;14:207-216.

Tascón RI, Vázquez-Boland JA, Gutiérrez-Martín CB, Rodríguez-Barbosa JI, Rodríguez-Ferri EF. Virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiologia*. 1996;12:171-184.

Tenenbaum T, Bloier C, Adam R, Reinscheid DJ, Schroten H. Adherence to and invasion of human brain microvascular endothelial cells are promoted by fibrinogen-binding protein FbsA of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun*. 2005;73:4404-4409.

Traub O, Berk BC. Laminar shear stress: Mechanics by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:677-685.

Udeze FA, Kadis S: Effect of *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin on the viability and function of porcine phagocytes. *Proc Int Pig Vet Soc* 1988;10:64-66.

Udeze FA, Kadis S: Effects of *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin on porcine neutrophil function. *Infect Immun* 1992;60:1558-1567.

Udeze FA, Latimer KS, Kadis S: Role of *Haemophilus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide endotoxin in the pathogenesis of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am J Vet Res* 1987;48:768-773.

Valentin-Weigand P, Grulich-Henn J, Chhatwal GS, Müller-Berghaus G, Blobel H, Preissner KT. Mediation of adherence of streptococci to human endothelial cells by complement S protein (vitronectin). *Infect Immun* 1988;56:2851-2855.

van de Kerkhof A, Haesebrouck F, Chiers K, Ducatelle R, Kamp EM, Smits MA. Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites on porcine alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 1996; 64:3905-3907.

van Leengoed LA, Kamp EM. Endobronchial inoculation of various doses of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* in pigs. *Am J Vet Res*. 1989 Dec;50(12):2054-2059.

Van Overbeke I, Chiers K, Charlier G, Vandenberghe I, Van Beeumen J, Ducatelle R, Haesebrouck F. Characterization of the in vitro adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells. *Vet Microbiol* 2002;88:59-74.

Vanier G, Segura M, Friedl P, Lacouture S, Gottschalk M. Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun*. 2004;72:1441-1449.

Vanier G, Segura M, Gottschalk M. Characterization of the invasion of porcine endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Can J Vet Res*. 2007;71:81-89.

Vanier G, Szczotka A, Friedl P, Lacouture S, Jacques M, Gottschalk M. *Haemophilus parasuis* invades porcine brain microvascular endothelial cells. *Microbiology*. 2006;152:135-142.

Velthuis AG, DE Jong MC, Stockhofe N, Vermeulen TM, Kamp EM. Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs is characterized by variation in infectivity. *Epidemiol Infect* 2002;129:203-214.

Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* 1984;99:2034-2040.

Welch RA, Bauer ME, Kent AD, Leeds JA, Moayeri M, Regassa LB, Swenson DL. Battling against host phagocytes: the wherefore of the RTX family of toxins? *Infect Agents Dis* 1995; 4:254-272.

Wells C.L., Jechorek R.P., Kinneberg K.M., Debol S.M. and Erlandsen S.L.. The Isoflavone Genistein Inhibits Internalization of Enteric Bacteria by Cultured Caco-2 and HT-29 Enterocytes. *J. Nutr.* 129: 634–640, 1999.

Wronski R, Golob N, Grygar E, Windisch M. Two-color, fluorescence-based microplate assay for apoptosis detection. *Biotechniques* 2002;32:666-668.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-415.

Yasufumi S. Current Understanding of the Biology of Vascular Endothelium. *Cell Structure and Function* 2001; 26: 9-10.

Zhang Y, Tennent JM, Ingham A, Beddome G, Prideaux C, Michalski WP. Identification of type 4 fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 2000;189(1):15-18.

Zysk G, Schneider-Wald BK, Hwang JH, Bejo L, Kim KS, Mitchell TJ, et al. Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 2001;69:845-852.

Productos de la presente tesis

Ponencias en Congresos Nacionales

Establecimiento de un cultivo de células endoteliales de aorta de cerdo. Memorias del Segundo congreso Estatal "La Investigación en el Posgrado (ISSN 970-728-053-0). Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Ags. Octubre del 2006.

Establecimiento y caracterización de cultivos de células endoteliales de aorta de cerdo. Memorias del Tercer congreso Estatal "La Investigación en el Posgrado (970-728-053-0). Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Ags. Octubre del 2007.

Adherencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 a células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo. Memorias del Cuarto congreso Estatal "La Investigación en el Posgrado. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Ags. Octubre del 2008.

Ponencias en congresos Internacionales

An in vitro model of endothelial cell derived from swine aorta for the study of specie-specific host-pathogen interactions: adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. International Pasteurellaceae Society conference 2008. Sorrento, Italy. October 12-15, 2008

Publicaciones

Burciaga-Nava JA, Reyes-Romero MA, Avelar-González FJ, Guerrero-Barrera AL. Establishment and characterization of porcine aortic endothelial cell cultures with prolonged replicative lifespan by a non-enzymatic method. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2008 Oct 2.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Dr. Francisco Javier Álvarez Rodríguez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
Presente.

A través de este conducto le informamos que el **M. en C. Jorge Alberto Burciaga Nava**, ha cumplido con todos los requisitos de escritura y revisión de tesis, por lo cual se puede proceder a la programación del examen de grado.

ATENTAMENTE,
"SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, Ags., 24 de octubre de 2008.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Alma Lilián Guerrero Barrera'.

Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera
Tutora

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Miguel Arturo Reyes Romero'.

Dr. Miguel Arturo Reyes Romero
Asesor





Departamento de Bioquímica

México D.F., a 28 de noviembre del 2008

Dr. Francisco Javier Álvarez Rodríguez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
Presente.

A través de este conducto me permito informarle que después de revisar la tesis doctoral del **M. en C. Jorge Alberto Burciaga Nava**, considero que ha cumplido con los requisitos de escritura y revisión de tesis, por lo que no tengo ningún inconveniente para que proceda con los trámites correspondientes para la programación del examen de grado. Sin más por el momento aprovecho la oportunidad para enviarle mis más afectuosos saludos.

ATENTAMENTE,

Dr. Ricardo Mondragón Flores
Asesor

Profesor Titular C
Depto. Bioquímica
CINVESTAV.IPN

rmflores@cinvestav.mx

C.C.P.

M. en C. Jorge A. Burciaga Nava. Estudiante
Dra. Alma Lilian Guerrero. Tutor




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Dr. Francisco Javier Álvarez Rodríguez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
Presente.

A través de este conducto le informamos que el **M. en C. Jorge Alberto Burciaga Nava**, ha cumplido con todos los requisitos de escritura y revisión de tesis, por lo cual se puede proceder a la programación del examen de grado.


ATENTAMENTE,
"SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, Ags., 5 de diciembre de 2008.



Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña
Sinodal



Dr. Fernando Jaramillo Juárez
Sinodal



Dr. Francisco Javier Avelar González
Sinodal