

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA

**DETERMINACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE ACTINA EN
CÉLULAS DE TEJIDO PULMONAR DE CERDO CON
PLEURONEUMONÍA PORCINA CRÓNICA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MORFOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. CARLOS ALBERTO BAUTISTA VILLALPANDO

TUTOR:

DRA. EN C. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

AGUASCALIENTES, AGS. DICIEMBRE DE 2008.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

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

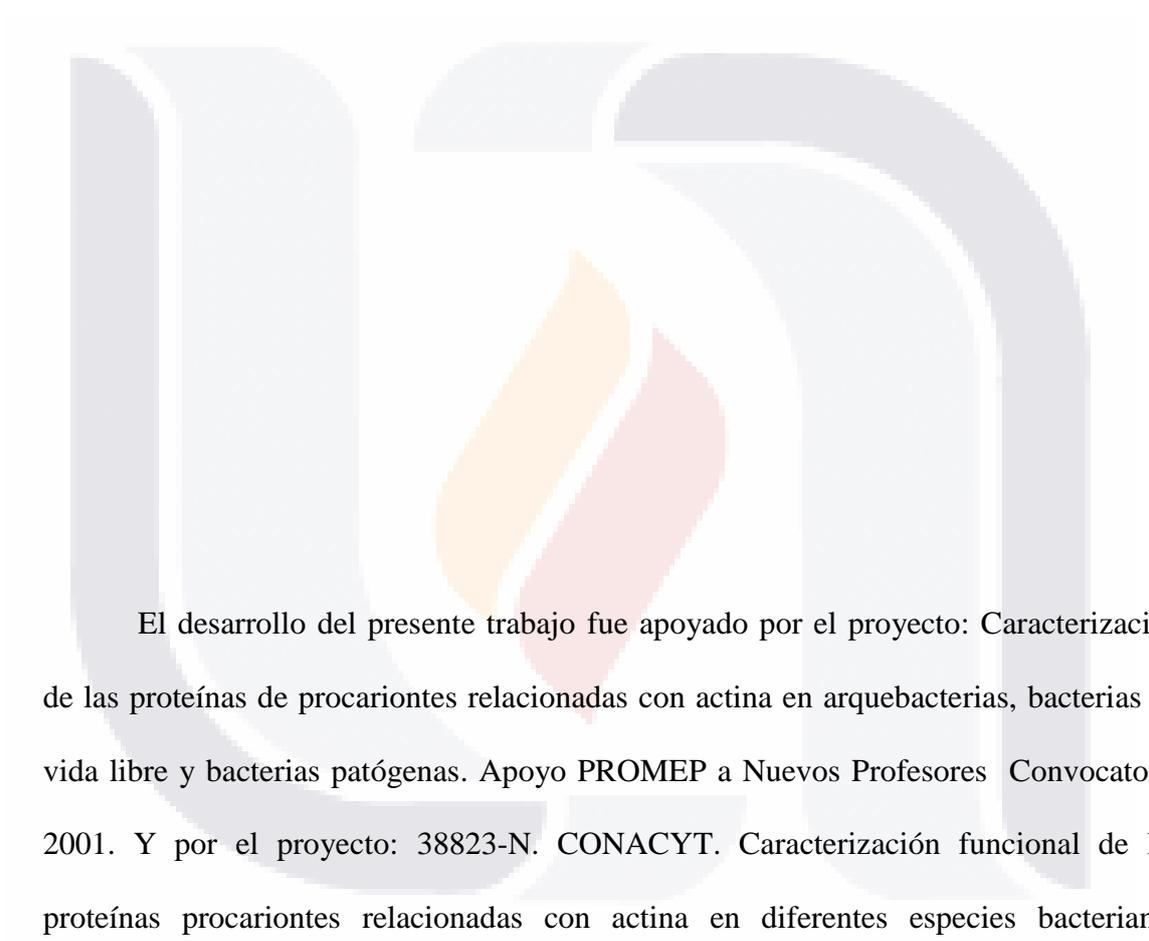
A través de este conducto le informamos que el Biol. **Carlos Alberto Bautista Villalpando**, ha cumplido con todos los requisitos de escritura y revisión de tesis, por lo cual se puede proceder a la impresión de la tesis "Determinación de la Distribución de Actina en células de tejido pulmonar de cerdo con pleuroneumonía porcina crónica", así como a la programación del examen de grado de Maestro en Ciencias Morfológicas.

ATENTAMENTE,
"SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, Ags., 9 de diciembre de 2008.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'ALMAGB'.

Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera
Tutora





El desarrollo del presente trabajo fue apoyado por el proyecto: Caracterización de las proteínas de procariontes relacionadas con actina en arqueobacterias, bacterias de vida libre y bacterias patógenas. Apoyo PROMEP a Nuevos Profesores Convocatoria 2001. Y por el proyecto: 38823-N. CONACYT. Caracterización funcional de las proteínas procariontes relacionadas con actina en diferentes especies bacterianas (Arquea y Bacteria).

DEDICATORIAS

Primeramente a Dios por darme la vida, por darme la capacidad de amar, ser amado y darme la fuerza de seguir adelante.

A mi padre Luis Bernabé Bautista Bobadilla y mi madre Martha Alicia Villalpando Cuevas por su gran enseñanza de lucha ante la vida, por sus palabras de amor, y su sabiduría como padres.

A mis hermanos Eduardo, Liliana, Cristian y Erika por su amor y apoyo incondicional en todos los sentidos y en todo momento.

A todos mis amigos que me acompañaron en este proceso, por sus risas, sus regaños y palabras de aliento.

A todos mis amigos, maestros y compañeros de investigación y docencia que con sus palabras de apoyo me ayudaron a concluir este trabajo.

A la M. en C. Guadalupe Cornejo y a la M. en C. Claudia Prieto por ser parte de este equipo de trabajo, su amistad y consejos

AGRADEZCO ESPECIALMENTE A:

A la Dra. en C. Alma Lilian Guerrero Barrera, por haber guiado este trabajo, por sus consejos, por su paciencia y por haberme impulsado en el mundo de la ciencia.

A la Dra. en C. María Consolación Martínez Saldaña, por su apoyo en todo el transcurso de la Maestría en Ciencias Morfológicas y su asesoría en el área morfológica.

Al M. en C. Ramón Rosales Gutiérrez por impulsarme a seguir a delante y creer en mi.

A TODOS USTEDES LES ESTOY MUY AGRADECIDO

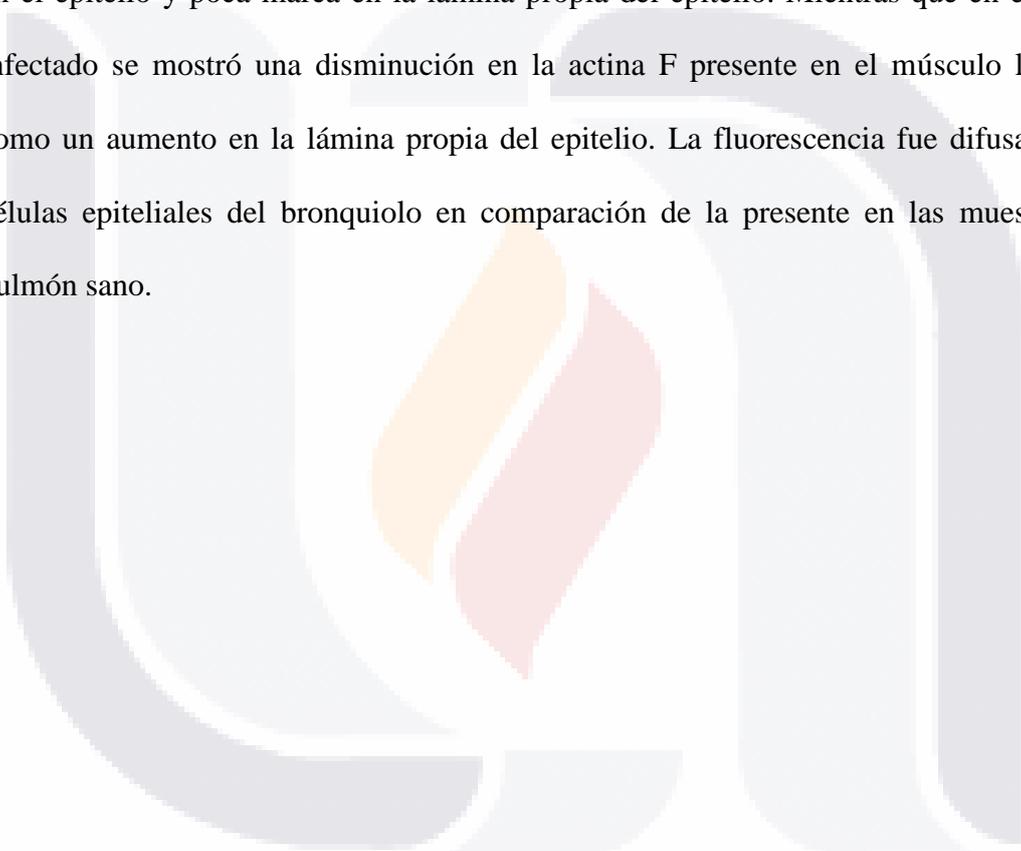
RESUMEN

A través de un muestreo aleatorio realizado en el Rastro Municipal de San Francisco de los Romo, Aguascalientes, se detectó pleuroneumonía porcina crónica en el 60% de los cerdos. Las lesiones pulmonares encontradas fueron empleadas para determinar los cambios morfológicos producidos por la enfermedad, la presencia de fibrosis debida a colágena, así como la distribución de actina filamentosa y no filamentosa. Para lo anterior se emplearon muestras provenientes de 22 animales con lesiones características de la enfermedad así como muestras provenientes de pulmones de 3 cerdos sanos, empleados como control. De las lesiones necróticas se aisló el agente causal de la enfermedad: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, empleando como cepa nodriza *Staphylococcus aureus*, una vez aislada la bacteria se le realizó tinción negativa y caracterización bioquímica empleado galerías Api NE. Las cepas así aisladas no requirieron NAD para crecer, por lo que se clasificaron como biotipo 2.

Se realizó técnica histológica en muestras de las lesiones y muestras control. Para determinar los cambios morfológicos se empleó tinción H-E, y tinción tricrómica de Masson para determinar la presencia de fibras de colágena. Se encontró infiltrado linfático asociado al engrosamiento de los tabiques interalveolares, hemorragia intersticial y daño en epitelio bronquial. También se encontró aumento de fibras de colágena asociado con el engrosamiento de los tabiques interalveolares. La presencia de la bacteria en las lesiones fue hecha empleando técnica inmunohistoquímica usando tanto sueros de cerdos convalecientes de la enfermedad, como un anticuerpo policlonal dirigido contra las proteínas totales de *A. pleuropneumoniae*. La bacteria se observó asociada al epitelio bronquiolar, en la lámina propia de los bronquiolos, en los intersticios de los tabiques interalveolares, así como en el interior de neutrófilos y macrófagos. Utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra actina de cerebro de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

rata mediante técnica inmunohistoquímica, se observó un fuerte reconocimiento del músculo liso de bronquios y vasos sanguíneos, en algunas células alveolares y en las zonas de ruptura de tabiques interalveolares. Adicionalmente se realizó el marcaje de actina-F con faloidina Alexa 594, los resultados de este marcaje fueron observados por microscopía láser confocal. En los pulmones sanos se mostró una mayor cantidad de actina F asociada a el músculo liso de bronquiolos y vasos sanguíneos, marcaje difuso en el epitelio y poca marca en la lámina propia del epitelio. Mientras que en el tejido infectado se mostró una disminución en la actina F presente en el músculo liso, así como un aumento en la lámina propia del epitelio. La fluorescencia fue difusa en las células epiteliales del bronquiolo en comparación de la presente en las muestras de pulmón sano.



LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Ap</i>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
F-Actina	Actina Filamentosa
IL-1	Interleucina-1
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-13	Interleucina-13
LPS	Lipopolisacárido
LTH2	Linfocitos T ayudadores tipo 2
NAD	Nicotina Adenina Dinucleotido
PARP	Actina Procariote de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
PP	Pleuroneumonía porcina
TGB- β 1	Factor de crecimiento- β 1
TGF- β 2	Factor de crecimiento- β 2
TIF	Tipo Inspección Federal
TNF- α	Facto de necrosis tumoral- α

INDICE

Antecedentes.....1

 Antecedentes Generales.....1

 Antecedentes Directos.....3

Planteamiento del Problema.....7

Hipótesis.....7

Objetivos.....8

 Objetivo General.....8

 Objetivos Particulares.....8

Material y métodos.....9

 Obtención de la muestra.....9

 Procesamiento de la muestra.....9

 Caracterización morfológica de las lesiones.....9

 Aislamiento de *Ap* a partir de las lesiones pulmonares.....10

 Identificación de *Ap* en las lesiones de pleuroneumonía porcina.....10

 Reconocimiento de actina no filamentosa10

 Detección de citoesqueleto de actina empleando
 faloidina fluorescente.....12

Resultados.....13

Discusión.....24

Conclusiones.....28

Bibliografía.....30

ANTECEDENTES

Antecedentes generales

Actinobacillus pleuropneumoniae (Ap) es el agente causal de la pleuroneumonía porcina (PP). Enfermedad respiratoria exclusiva de cerdos (Frey, 1995), que puede ser híperaguda, aguda, o crónica. Las fases híperaguda y aguda ocasionan la muerte del animal en 24 a 35 horas siguientes a la infección; suele ser bilateral, extensiva, fibrinohemorrágica, necrosante y asociada a pleuritis. Los signos que se presentan en esta fase de la enfermedad son: anorexia, fiebre, estrés respiratorio con cianosis, ataxia, vómito, disnea y epistaxis. En la fase crónica, el animal presenta baja conversión alimenticia, con tos esporádica. Esta fase se caracteriza por la presencia de tejido pulmonar necrosante mas pequeño, consolidado, infartado y encapsulado (Enríquez-Verdugo, 2004., Enríquez-Verdugo *et al*, 2003-2004., Frey, 1995., Gottshalk, 2002). La enfermedad se transmite por contacto directo o a través de aerosoles. Provoca grandes perdidas económicas en la industria porcícola (Enríquez-Verdugo *et al*, 2004). La fase más importante para la dispersión de la enfermedad es la crónica, pues los cerdos no presentan signos clínicos (Jensen, 1999) y por lo tanto estos casos solo se detectan cuando los animales son sacrificados en el rastro.

A. pleuropneumoniae es una bacteria Gram negativa, pleomórfica (coco, bacilo o cocobacilo), anaerobia facultativa, no forma esporas, móvil con flagelo (Negrete-Abascal *et al*, 2003). Es ureasa positiva fermenta manitol, xilosa, ribosa y tiene fermentación variable de lactosa (Enríquez-Verdugo, 2004., Enríquez-Verdugo *et al*, 2003-2004). Presenta 2 biotipos de acuerdo a los requerimientos de NAD (nicotina adenin dinucleotido) para su crecimiento. El biotipo 1 depende de NAD y el biotipo 2 es independiente de este cofactor. El biotipo 1 presenta 15 serotipos (Frey, 2003) y el

biotipo 2 los serotipos 1 y 2 (Enríquez-Verdugo, 2004., Haesebrouck *et al*, 1997). En México el biotipo 1 serotipos 1,5 y 7 son los más ampliamente distribuidos (Negrete-Abascal, 1994), mientras que los primeros reportes de la presencia del biotipo 2 en el país se han registrado en el laboratorio por nuestro grupo de investigación (Prieto, en prensa).

En infecciones clínicas y subclínicas se ha encontrado a *Ap* en cavidades nasales, amígdala, oído medio, traquea y lesiones pulmonares (Chiers *et al*, 2001., Enriquez-Verdugo, 2004). Chiers y colaboradores (1999), encuentran que el biotipo 1 serotipo 9, pueden aislarse de amígdala de cerdos infectados en el laboratorio, en donde la bacteria se asocia principalmente al epitelio escamoso estratificado, observándose la vacuolización y descamación del mismo, acompañado por una gran trasmigración de neutrófilos. Se ha reportado que en infecciones controladas, *Ap* puede causar septicemia en cerdos muy jóvenes y como consecuencia de la pleuroneumonía se ha descrito endocarditis, pericarditis y artritis serosa ocasional (Jensen *et al*, 1999).

A. pleuropneumoniae posee varios mecanismos de virulencia, los cuales junto con la respuesta de los cerdos, son los responsables de la reacciones que ocurre durante la enfermedad (Gottschalk, 2002., Haesebrouck, 1997., Enríquez-Verdugo, 2004., Enríquez-Verdugo *et al*, 2003-2004). Estos factores de virulencia se resumen en la tabla 1.

Factor de virulencia	Propiedad biológica	Referencia
Cápsula	Protección contra fagocitosis por neutrófilos y lisis por el complemento	Enríquez-Verdugo, 2004. Hasebrouck, 1997.
Lipopolisacárido	Actividad endotoxica, pirógeno, induce la liberación de mediadores proinflamatorios activa macrófagos y neutrófilos. No causa lesiones típicas de la enfermedad pero contribuye a su formación. Sinergiza las Apx en la fagocitosis. Contribuye en la adhesión de la bacteria a la mucosa traqueal y pulmonar.	Enríquez-Verdugo, 2004. Hasebrouck, 1997.
Exotoxinas	Apx, citotóxicas, letales: eritrocitos y leucocitos. Formadoras de poros en	Enríquez-Verdugo, 2004.

Apx I	membrana, provocan exposición oxidativa y producción excesiva de radicales oxígeno. Desarrollo de lesiones, tóxicas para el endotelio vascular y muerte en las células epiteliales alveolares tipo II.	Hasebrouck, 1997. Kamp. <i>et al.</i> , 1997. Van De Kerkhof <i>et al.</i> , 1996.
Apx II	Fuertemente hemolítica y citotóxica	
Apx III	Débilmente hemolítica y citotóxica	
Apx IV	No hemolítica y fuertemente citotóxica	
Apx IV	Actividad citotóxica. Específica de especie	
Proteasas	Hidrolizan proteínas del hospedero, facilitan la infección, degradan hemoglobina, IgA, gelatina porcina y actina. Facilitan la invasión de las mucosas del tracto respiratorio	Enríquez-Verdugo, 2004. Hasebrouck, 1997. Negrete-Abascal <i>et al.</i> , 1998 García-Cuellar, <i>et al.</i> , 2000. García-González <i>et al.</i> , 2004.
Adhesinas	Anclaje de la bacteria a fibronectina, células bucoepiteliales, cartílago traqueal, células endotelial es y fibras colágenas, todo como primer paso para la colonización al cerdo y evitando su eliminación por mecanismos de limpieza del huésped.	Enríquez-Verdugo <i>et al.</i> , 2004. Hasebrouck, 1997. Hamer-Barrera <i>et al.</i> , 2004. Provost <i>et al.</i> , 2003
Proteínas de membrana externa	Receptor para elementos para el crecimiento bacteriano e induce cierta respuesta inmune.	Enríquez-Verdugo, 2004. Hasebrouck, 1997.
Vesículas de secreción	Contienen proteasas y toxinas Apx	Negrete-Abascal <i>et al.</i> , 2000.
Sideróforos	Mecanismo de adquisición de hierro del hospedero para el crecimiento de la bacteria.	Diarra <i>et al.</i> , 1996.
Receptor a transferrina	Transfiere hierro del hospedero a la bacteria para su crecimiento	Beddek <i>et al.</i> , 2004

Tabla 1. Factores de virulencia de *A. pleuropneumoniae*.

Antecedentes directos

Entre los mecanismos de defensa que el cerdo muestra para combatir la infección están las células que participan en el proceso inflamatorio (neutrófilos, macrófagos, células endoteliales, linfocitos, fibroblastos y plaquetas) y sus respectivos mediadores (citocinas) que son producidos por éstos como se ve en las inflamaciones aéreas por *Mycoplasma pneumoniae* (Martín *et al.*, 2001). Choi y colaboradores (1999),

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

empleando cerdos naturalmente infectados, determinan que existe una fuerte expresión de IL-1 en células endoteliales dañadas dentro de los límites de las zonas de necrosis coagulativa, con una expresión simultánea de IL-1, TNF- α e IL-6 asociadas a las lesiones pulmonares, sugiriendo que estas citocinas del sistema inmune, juegan un papel crucial en la medición y regulación de la inflamación celular durante la infección por *Ap* serotipos 2, 5 y 6. Sin embargo no son capaces de eliminar al patógeno.

Jensen (1999) menciona que una de las manifestaciones patológicas de la infección causada por los factores de virulencia de *Ap*, así como las células del proceso inflamatorio y sus citocinas, es caracterizado por fibrosis debida al aumento en la cantidad de fibras elásticas en su fase aguda. Cornejo (2006) demuestra que en la infección crónica existe un daño en tejido pulmonar a nivel del epitelio alveolar, observándose engrosamiento del tejido conectivo y engrosamiento de los tabiques interalveolares, debido al aumento en las fibras de colágena, causando fibrosis. También muestra el rasurado del endotelio vascular debido a la PP crónica. Prieto muestra además que el principal tipo de colágena asociado con las lesiones es el tipo III (2007). Probablemente también existan factores que promuevan la formación de fibroblastos (Saito, 2003). Esto puede estar ocasionado por un proceso inflamatorio crónico en el cual se perpetúa la liberación de citocinas mediadoras de la inflamación produciendo desgranulación externa de neutrófilos, liberando enzimas que dañan los tejidos en los cuales se trata de reparar el tejido con procesos de cicatrización (Rojas, 2001), pero por algún motivo aun no descrito este proceso no puede concluir, causando más acúmulo de colágena e indirectamente la adhesión de la bacteria y su colonización al huésped. Prieto muestra la formación de granulomas de tipo no tuberculoso en la pleuroneumonía crónica, ocasionada en Aguascalientes por *A. pleuropneumoniae* biotipo 2 (Cornejo, 2006; Prieto, 2007; en prensa). Estos granulomas están formados por células gigantes,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

células epitelioides, macrófagos, linfocitos T y B, pero no neutrófilos y están rodeados por un anillo delgado de fibras de colágena tipo III (Prieto *et al.*, en prensa).

Wang y colaboradores (2000) observan que aproximadamente el 30 % de neutrófilos responden contra la infección aguda por *Ap. Jo* (1999) menciona que las citocinas TNF- α , IL-1, IL-8 producen una respuesta inflamatoria por lo tanto una infiltración de macrófagos, neutrófilos y leucocitos .

Algunos patógenos respiratorios como *Pasteurella multocida*, tienen capacidad de adherirse e invadir diferentes tipos de células epiteliales, estas endocitan a la bacteria sin formar fagosomas, si no que modifica el citoesqueleto, la producción y distribución de F-actina de las células epiteliales asociándola con el patógeno para facilitar su movimiento dentro de la célula y su llegada al intersticio pulmonar extracelular (Rabier *et al*, 1996).

Bogatkvivh y colaboradores (2003) mencionan que la actividad de fibroblastos o miofibroblastos juegan un papel crucial en la remoción de tejido dañado en la fibrosis pulmonar humana. En estado inactivo el fibroblasto solo contiene las isoformas β -actina y γ -actina, pero en estado activo con influencia del inductor trombina expresa también α -actina, cambiando su fenotipo típico a miofibroblasto y por lo tanto presentan dos de las características fundamentales del miofibroblasto: organización α -actina y contracción en gel de la colágena. Batra y colaboradores (2003) mencionan que en problemas de asma los factores de crecimiento como TGB- β 1 y TGF- β 2 presentes en fibrosis subepitelial en bronquios, induce el cambio de fibroblastos a miofibroblastos independientemente del aumento en síntesis de colágena mientras que el aumento en síntesis de α -actina y colágena II en miofibroblastos es por causa de la IL-4. Los mediadores Th2 y IL-13 también están implicados en la transformación fenotípica del

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fibroblasto, incrementando la expresión de α -actina y la proliferación de miofibroblastos (Saito, 2003., Batra, 2004).

Bogatkovich y colaboradores (2003) sugieren que en la fibrosis pulmonar humana, el factor Rho incrementa la actividad y expresión de α -actina en células musculares lisas como las que se encuentran en los vasos sanguíneos. En el asma, los mecanismos de estrés causa cambios fenotípicos de citoesqueleto en células musculares de las vías aéreas y por lo tanto modifican su contractibilidad (Deng *et al*, 2004). En el asma las células de músculo liso en bronquios expuestas a 33°C muestran hipertrofia e incremento en la expresión de las proteínas contráctiles del músculo liso como α -actina y cadenas ligeras de miosina (Zhou *et al*, 2003).

En células eucariotes existe una red de filamentos de naturaleza proteica que conforman el citoesqueleto, el cual tiene como función principal el movimiento intracelular para llevar a cabo la mayor parte de los procesos celulares (mitosis, citocinesis, transporte de organelos y vesículas, secreción, mantenimiento de la integridad celular, entre otras funciones). Entre los filamentos que conforman al citoesqueleto en células eucarióticas se encuentran los filamentos delgados formados por actina globular, la cual es la proteína intracelular más abundante en eucariotes (De la Garza, *et al*. 2001).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fase de la PP más estudiada y documentada es la aguda, pues merma la producción porcícola en 48 horas como máximo. En el laboratorio de Biología Celular y Tisular de la UAA se ha iniciado el estudio de la PP crónica. Debido a que al ser los cerdos en esta etapa portadores de *Actinobacillus pleuropneumoniae* asignológicos representan una fuente potencial de diseminación del patógeno, que junto al estrés del manejo del animal puede transformarse de inmediato en fase aguda (Cornejo, 2006., Prieto, 2007). Entre los daños histológicos mas evidentes reportados en la etapa crónica, se encuentra fibrosis por un incremento en fibras colágenas, destrucción del epitelio alveolar y del endotelio vascular, así como la formación de granulomas no tuberculoides (Cornejo, 2006; Prieto 2007; Prieto, en prensa). En otras enfermedades respiratorias como la fibrosis quística, se ha reportado que tanto el incremento en las fibras colágenas como los cambios en el citoesqueleto de actina en las células del tejido pulmonar, contribuyen a la fibrosis (Kawai *et al.*, 2003).

Por lo tanto el propósito del presente trabajo fue el estudio la distribución de actina en el tejido pulmonar, lo cual permitirá el entendimiento de la patofisiología de la pleuroneumonía porcina en su estado crónico y la relación probable existente entre sus manifestaciones clínicas.

HIPÓTESIS

La distribución de actina está relacionada con el infiltrado celular producido por la pleuroneumonía crónica y varía en las células epiteliales del tejido pulmonar infectado.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la distribución de actina en células de tejido pulmonar de cerdo con pleuroneumonía porcina crónica.

Objetivos particulares

- Detectar cerdos portadores que no presenten signos de la enfermedad pleuroneumonía porcina.
- Aislar *A. pleuropneumoniae* de las lesiones pulmonares de los cerdos portadores asintomáticos.
- Determinar el daño general presente con cortes de tejido pulmonar de cerdo.
- Localizar actina filamentosa con faloidina fluorescente en cortes de tejido pulmonar de cerdo.
- Determinar la presencia de *A. pleuropneumoniae* utilizando anticuerpos o marcadores específicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las muestras.

La obtención de pulmones infectados se realizó en el rastro Municipal de San Francisco de los Romos, Aguascalientes. Los pulmones sanos empleados como control fueron obtenidos del Rastro tipo TIF (Inspección Federal) de la Ciudad de Durango, Durango. En forma aleatoria se tomaron 22 muestras de pulmones de cerdo con lesiones de pleuroneumonía y las 3 muestras de cerdos sanos. Las muestras tomadas comprendieron lesiones necrosantes bilaterales sugerente de pleuroneumonía porcia (Williams, 2000).

Procesamiento de las muestras

Las muestras se depositaron en bolsas de plástico nuevas, las cuales fueron identificadas y conservadas en refrigeración a 4 °C. Parte de las muestras fue utilizada para aislar el agente causal y otra parte para ser fijadas. De cada muestra se obtuvieron secciones de 1 cm³ aproximadamente y se fijaron en formalina neutra al 10%. Estos bloques de tejido fueron incluidos en parafina, para posteriormente obtener cortes histológicos de entre 3 y 4 µm de espesor (Cornejo Amador, 2006; Prieto Macías, 2007) tanto de pulmón infectado como de los pulmones sanos. Finalmente los cortes fueron procesados para teñir con Hematoxilina y Eosina, ser tratados con faloidina fluorescente y para realizar la inmunodetección con anticuerpos específicos.

Caracterización morfológica de las lesiones.

Los cortes realizados fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina (Brancrof y Gamble, 2002) para observar las diferencias morfológicas generales producidos por la enfermedad. También se realizó tinción tricrómica de Masson para determinar la presencia de fibrosis debida a fibras de colágena.

Aislamiento de *Ap* a partir de las lesiones pulmonares.

A. pleuropneumoniae fue aislado por estría a partir de las lesiones necróticas presentes. Las muestras se sembraron en cajas de agar sangre con cepa nodriza de *Staphylococcus aureus*, incubadas en anaerobiosis a 37°C durante 24 hrs (Willams *et al.*, 2000). Se realizaron varias resiembras en medio agar Infusión Cerebro Corazón para el aislamiento de *Ap*. La pureza de las cepas aisladas fue corroborada por tinción Gram (Flores-Tena *et al.*, 2007) y posteriormente se confirmó la identidad del patógeno mediante pruebas bioquímicas utilizando galería Api (Biomériéux) y usando el sistema Api-Lab Plus para interpretar los resultados obtenidos.

Identificación de *Ap* en las lesiones de pleuroneumonía porcina.

Se realizó la identificación de la bacteria mediante técnica inmunohistoquímica en las lesiones, usando un suero de cerdo convaleciente de pleuroneumonía, donado por el Dr. Tenorio del CENID Microbiología del INIFAP Palo Alto, México. También se empleó para este fin un anticuerpo policlonal dirigido en contra de las proteínas totales de *Ap* (Prieto, 2007).

Las observaciones fueron realizadas con microscopio Zeiss Axioscop 40/40Fl y las imágenes fueron capturadas con el software Cool Snap Pro, Image pro Plus (Media-Cybernetics).

Reconocimiento de actina no filamentosa

La inmunodetección de antígenos específicos utilizando inmunohistoquímica, se realizó empleando como anticuerpos primarios anticuerpo monoclonal anti-actina de cerebro de rata, lo anterior con el fin de marcar tanto actina muscular como actina no muscular.

Los tejidos fueron fijados en porta objetos tratados con solución fresca de silano (Sigma) al 2 %. Los cortes histológicos fueron desparafinados en estufa a 45°C durante

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

24 h y posteriormente sumergidos 2 veces en xileno absoluto durante 10 min. Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena usando metanol absoluto adicionado con peróxido de hidrógeno al 1% durante 30 min. Posteriormente los tejidos se hidrataron en sucesivos baños de etanol en concentraciones crecientes (100, 96 y 70 %) de 3 min. cada uno y después fueron lavados en amortiguador salino de fosfatos PBS 1X ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.1 M pH 7.6) durante 5 min. Se realizó la recuperación antigénica con solución amortiguadora de citrato de sodio a 0.01 M pH 6.0 calentando en olla de presión a 15 lb de presión durante 1 min. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween al 0.05% durante 5 min. cada uno y se bloquearon las proteínas inespecíficas con albúmina serica bovina al 1% diluido en 1 ml de PBS, durante 45 min. Se incubó con el primer anticuerpo anticuerpo monoclonal anti-actina de cerebro de rata toda la noche a temperatura ambiente. La dilución fue 1:100 en PBS. Después de 3 lavados con PBS-Tween al 0.05% de 5 min cada uno, las laminillas se incubaron con el segundo anticuerpo chivo anti ratón peroxidado diluido en PBS 1X (1:10000) una hora a 37 °C. El tejido fue lavado tres veces con PBS-Tween 0.05 % por 5 min cada uno. El revelado se realizó con Diamino-bencidina (Sigma) al 0.06% en Tris 0.05 M pH 7.6. Después se hicieron 2 lavados con PBS-Tween al 0.05%. Finalmente las laminillas fueron enjuagadas con agua destilada durante 5 minutos y se contrastó con hematoxilina de Harris. Los tejidos fueron deshidratados en pasos secuenciales de etanol del 96 al 100 %, aclarados en dos baños de xileno absoluto y finalmente montados con Entellan ® (Merck).

Detección de citoesqueleto de actina filamentosa empleando faloidina fluorescente.

La realización de marcaje específico de actina con faloidina Alexa 594 (Molecular Probes) en tejido de pulmón fue realizada primeramente desparafinando los tejidos en dos baños xileno absoluto durante 10 min cada uno. Posteriormente los tejidos fueron hidratados en pasos secuenciales de etanol del 100 % al 70% y lavados durante 5 minutos en PBS. Los tejidos fueron permeabilizados con metanol absoluto durante 30 min y posteriormente se incubados con faloidina Alexa 594 (50ng/ml en PBS-formol 3.7%) durante toda la noche a 4°C en cámara oscura, para marcar actina filamentosa. Posteriormente los tejidos se lavaron 5 veces con PBS durante 5 min. Las laminillas fueron montadas en presencia de 5 µl de Vecta Shield (Vector) y cubiertos con cubreobjetos. Las observaciones fueron realizadas y las imágenes capturadas con el Confocal Scanning System Leica TPS P52 de la Unidad de Biomedicina UBIMED de la FES-Iztacala, UNAM con la asistencia técnica de la Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro.

RESULTADOS

Procesamiento de las muestras y aislamiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a partir de las lesiones pulmonares.

Se detectaron casos de pleuroneumonía porcina provenientes del rastro Municipal de San Francisco de los Romos, Aguascalientes. Se obtuvieron 22 muestras de pulmón infectados y 3 muestras de pulmón sano (Figura 1). Se aisló *Ap* de las muestras con pleuroneumonía porcina crónica. Se confirmó la identidad de la bacteria mediante su caracterización bioquímica y su pureza por tinción Gram (Williams *et al.*, 2000, Flores-Tena *et al.*, 2007). Los pulmones considerados con lesiones crónicas fueron aquellos que presentaban daño necrótico bilateral (Ajito, *et al.*, 1996; Baarsch *et al.*, 2000). Las cepas aisladas de las lesiones fueron independientes de NAD para su crecimiento, pertenecientes al biotipo 2 (Figura 2).



Figura 1. Pulmón con lesiones necróticas de pleuroneumonía porcina crónica, detectada en el Rastro de San Francisco de los Romo.

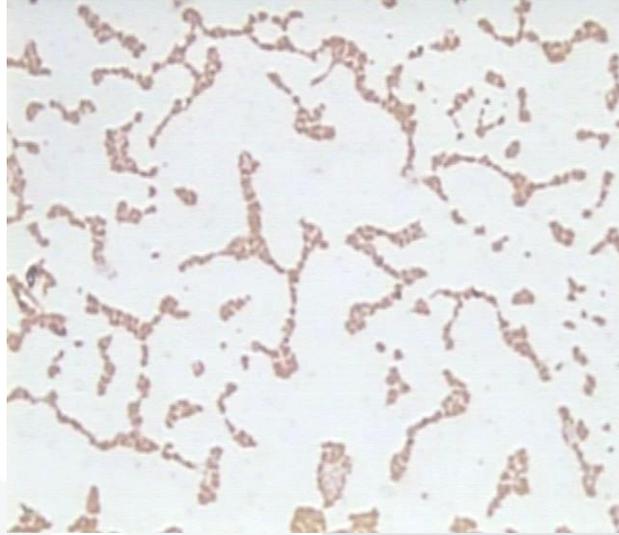


Figura 2. Microscopía óptica de la Tinción Gram de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
Objetivo 100X.

Caracterización morfológica de las lesiones.

Para determinar los cambios morfológicos generales presentes en el tejido pulmonar infectado, con respecto al tejido sano, se usaron la tinción Hematoxilina-Eosina y la tinción tricrómica de Masson. El pulmón de cerdo infectado presenta daño a nivel del epitelio alveolar, con respecto a lo obtenido en las muestras de pulmones de cerdo sano (Figuras 3-5). También se observa engrosamiento de los tabiques interalveolares (Figura 4), aumento en fibras colágenas (Figuras 6 y 7) e infiltración de células del sistema inmune por una respuesta inflamatoria así como hemorragia intersticial (Figura 5). El epitelio bronquial se muestra discontinuo, daño que también es observado por Choi y colaboradores (1999). Se observa una fibrosis intersticial.

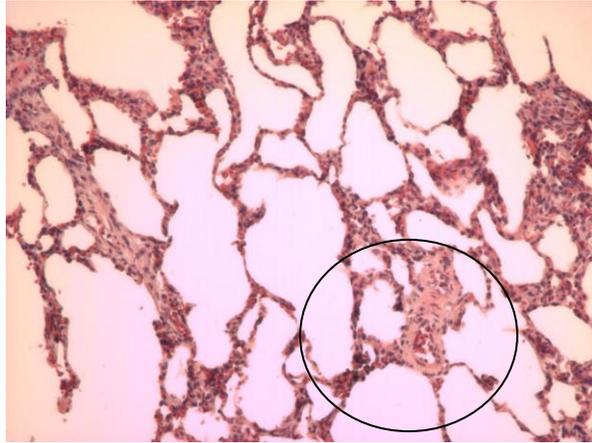


Figura 3. Tejido de pulmón sano teñido con Hematoxilina y Eosina, la cual muestra la morfología histológica típica, encerrada en el círculo, sin engrosamiento de los tabiques interalveolares. Fotografía en microscopio óptico 40X.

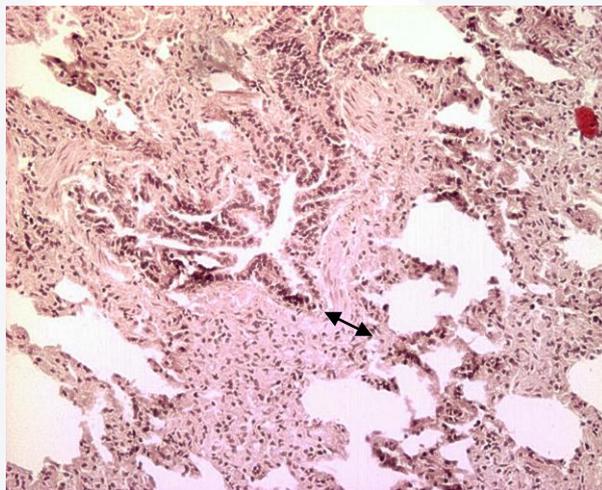


Figura 4. Microscopía óptica del tejido pulmonar con pleuroneumonía porcina crónica, teñido con Hematoxilina y Eosina, en el cual se muestra el daño a nivel de epitelio alveolar, y engrosamiento de los tabiques interalveolares. Objetivo 10X.

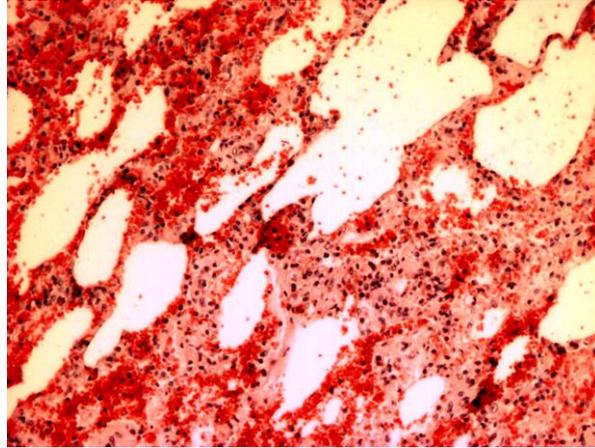


Figura 5. Corte de pulmón con pleuroneumonía porcina crónica. Tinción Hematoxilina y Eosina. Se observa hemorragia intersticial. Objetivo 40X.

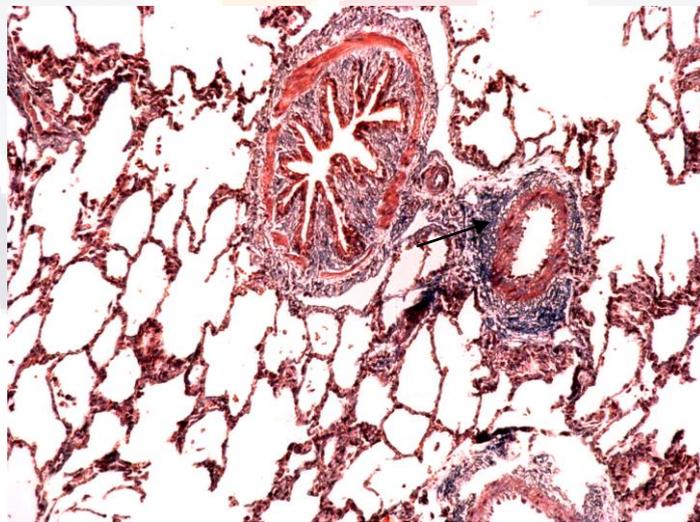


Figura 6. Detección de fibras colágenas en el tejido pulmonar sano. Tinción tricrómica de Masson. Objetivo 10X.

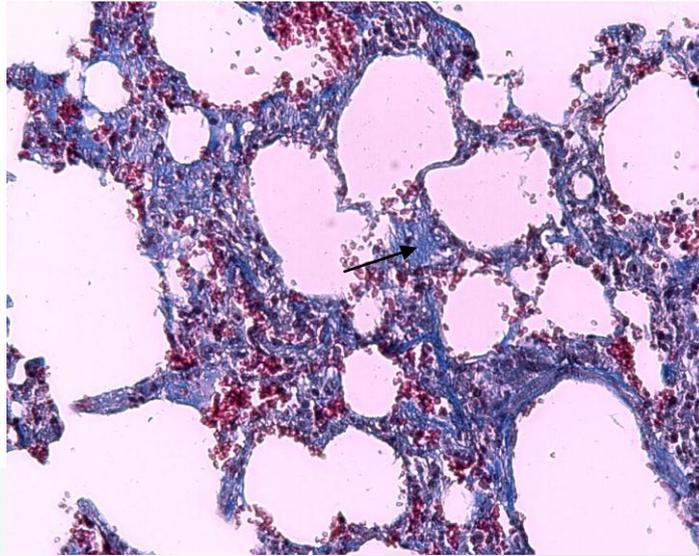


Figura 7. Detección de fibras colágenas en el tejido conectivo de pulmón con pleuroneumonía crónica. Tinción tricrómica de Masson. Objetivo 10 X.

Reconocimiento de actina con anticuerpos específicos

Se realizó el marcaje de actina con técnica inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal de cerebro de rata. Este anticuerpo reconoce todas las isoformas de actina (Guerrero-Barrera *et al.*, 1996; 1999). Se observó marcaje positivo tanto en músculo liso de bronquios, vasos sanguíneos, células alveolares y en las zonas de ruptura de tabiques interalveolares que coinciden con la formación de vastos (Figuras 8-10) [Rubin-Farder., 2000].

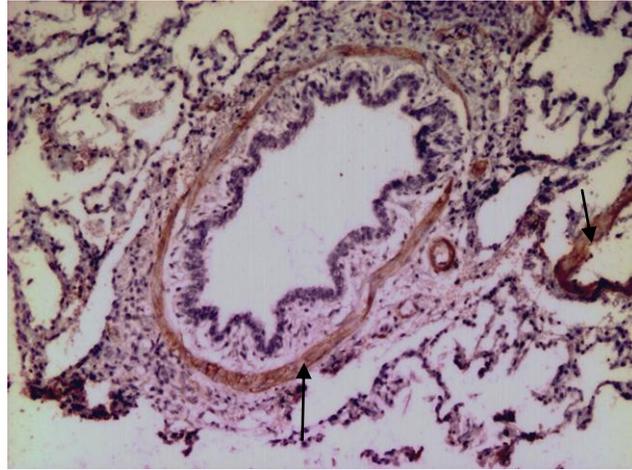


Figura 8. Pulmón sano reconocido con anticuerpo monoclonal dirigido en contra de la actina de cerebro de rata. Se observa positividad en músculo liso de bronquios y vasos sanguíneos. En los tabiques interalveolares se muestran algunas células marcadas positivamente. Técnica inmunohistoquímica. Objetivo 10X

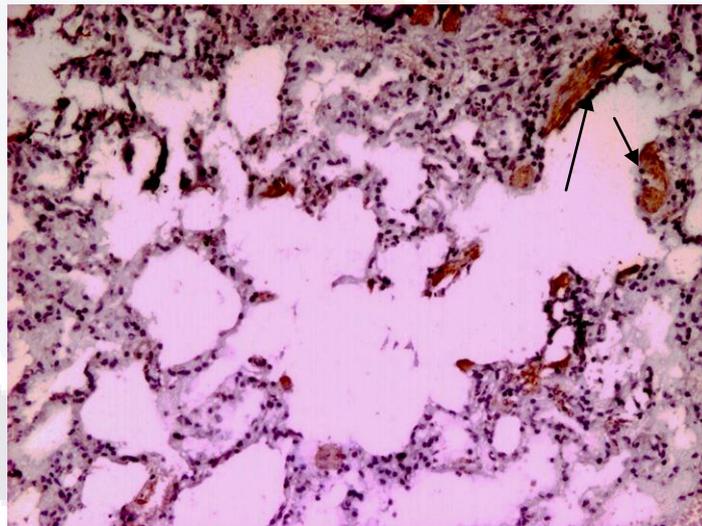


Figura. 9. Corte de pulmón con pleuroneumonía crónica marcado con el anticuerpo monoclonal anti actina de cerebro de rata. Se observa marcaje de actina en los tabiques interalveolares y en zonas de ruptura de los tabiques interalveolares, las formaciones tipo vasto. Objetivo 40X.

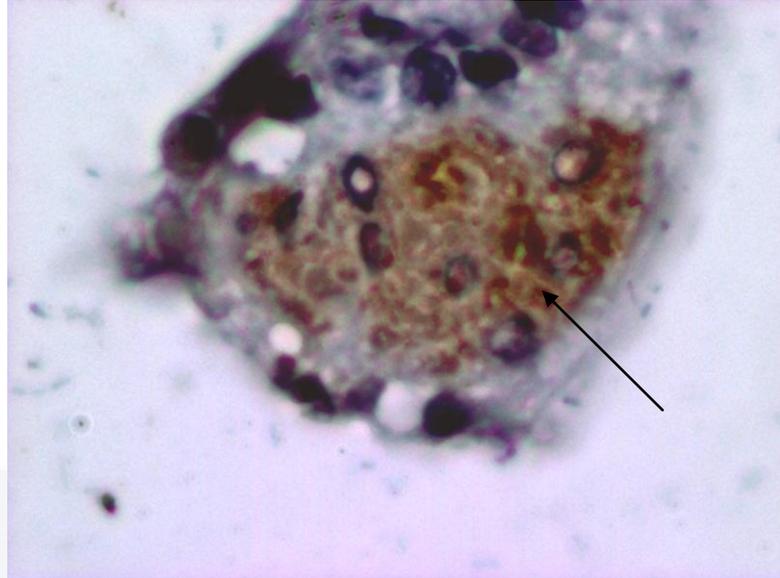


Figura. 10. Marcaje de actina con el anticuerpo monoclonal anti-actina de cerebro de rata en las zonas de ruptura de los tabiques interalveolares que coincide con la formación tipo vasto. Objetivo 40X

Detección de citoesqueleto de actina-F empleando faloidina fluorescente.

Con respecto al marcaje de actina-F con faloidina Alexa 594, se observa un marcaje difuso en la zona del epitelio bronquial, con zonas de un marcaje brillante, marcaje escaso en la lámina propia y un buen marcaje en el músculo liso (Figura 11). En comparación, en el pulmón infectado se encontró un marcaje más disperso y difuso en el epitelio bronquial, desaparecieron las zonas brillantes encontradas en el epitelio de pulmones no infectado, disminución en el marcaje del músculo liso, así como un aumento de actina F en la zona de la lámina propia. Al parecer asociado con el infiltrado de células del sistema inmune desatado por la presencia del agente causal de la enfermedad (Figura 12), datos no mostrados en la presente tesis muestran que el anticuerpo monoclonal anti actina de cerebro de rata tuvo el mismo comportamiento que la faloidina en los pulmones infectados. En los tabiques interalveolares del pulmón

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

con pleuroneumonía crónica se ve una evidente disminución en el marcaje de actina F, con respecto al pulmón sano (Figuras 13 y 14).

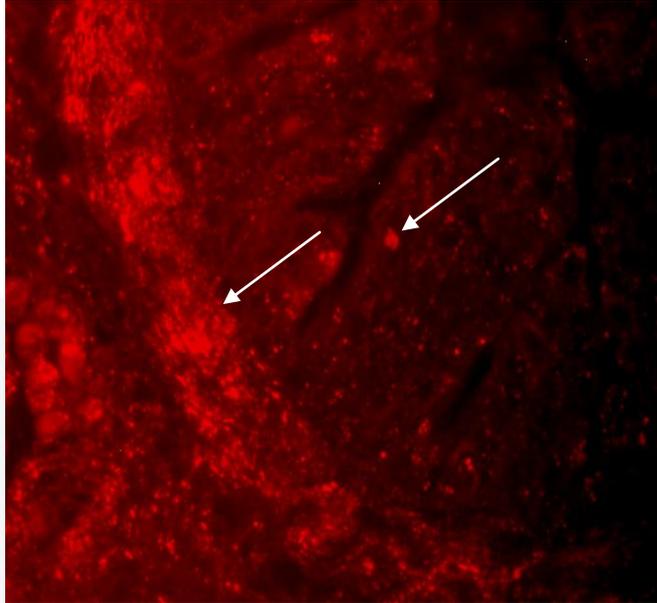


Figura 11. Detección de actina-F en pulmón sano, empleando microscopía confocal. Las flechas señalan el marcaje a nivel del epitelio bronquial y en el músculo liso. Actina marcada con Faloidina Alexa 594. Objetivo 40X.

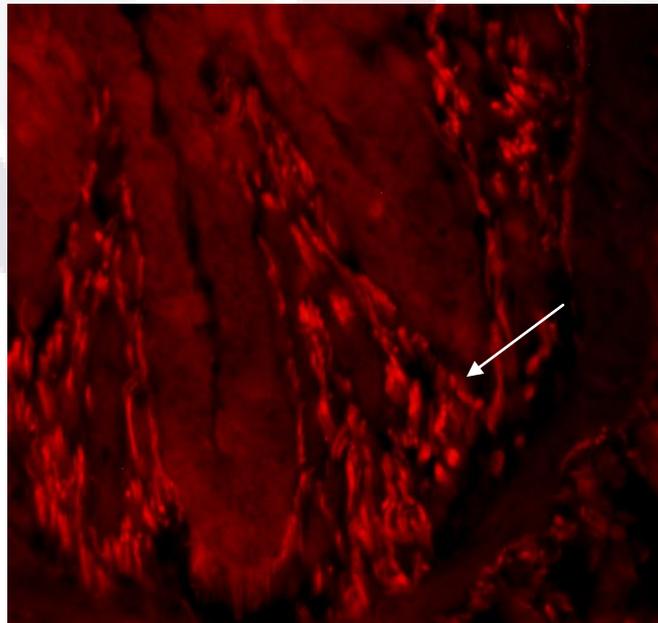


Figura. 12. Detección de actina-F en pulmón con pleuroneumonía crónica, empleando microscopía confocal. Se muestra poco marcaje en el epitelio bronquial y músculo liso, pero en la lamina propia hay marcaje evidente señalado con la flecha. Actina marcada con Faloidina Alexa 594. Objetivo 40X.

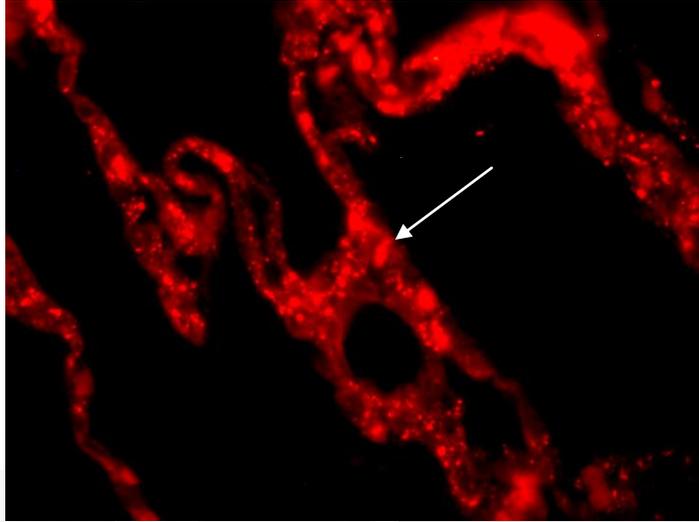


Figura. 13. Pulmón sano en el cual se observa marcaje de actina F en el tabique interalveolar. Marcaje con faloidina Alexa 594 observado por microscopía confocal. Objetivo 40X.

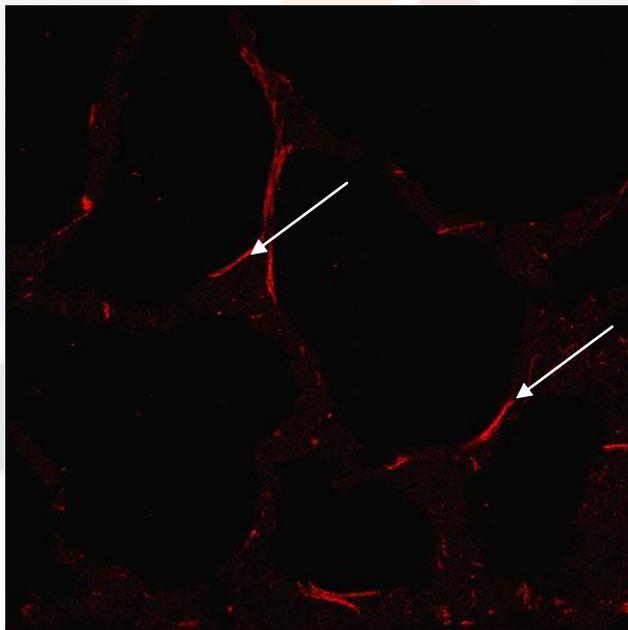


Figura. 14. Pulmón infectado en el cual se observa marcaje de actina F en el tabique interalveolar. Marcaje con faloidina Alexa 594 observado por microscopía confocal. Objetivo 40X.

Identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en las lesiones de pleuroneumonía porcina.

Asociado con este daño se demostró la presencia de *A. pleuropneumoniae* empleando sueros positivos de cerdos convalecientes de pleuroneumonía porcina. En la figura 15 se muestra el reconocimiento de la bacteria adentro de macrófagos alveolares o de neutrófilos. En la figura 16 se muestra el inmunorreconocimiento de la bacteria en el interior de las células del infiltrado linfático presentes en el engrosamiento de los tabiques interalveolares, así como en las células epiteliales bronquiales. Mientras que en la figura 17 se observa el inmunomarcaje de las bacterias asociadas al epitelio bronquial detectadas con el anticuerpo policlonal dirigido en contra de las proteínas totales de *Ap*. Con este anticuerpo inclusive se ven asociadas a los cilios bronquiolares.

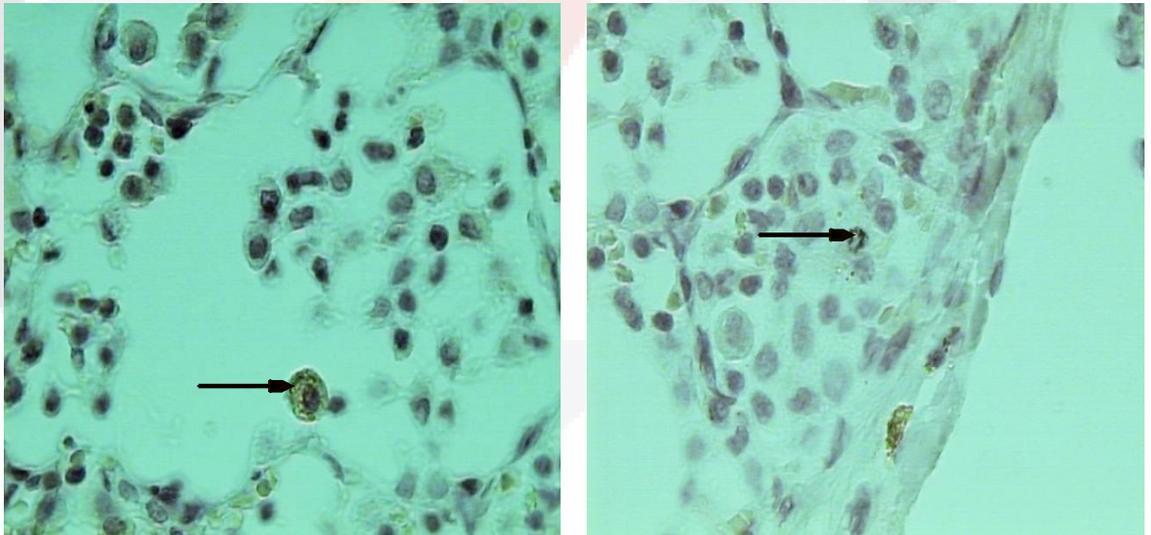


Figura 15. Inmunotinción de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en el interior de macrófagos (izquierda) y neutrófilos (derecha), empleando sueros de cerdos convalecientes de pleuroneumonía porcina. Objetivo 40 X.

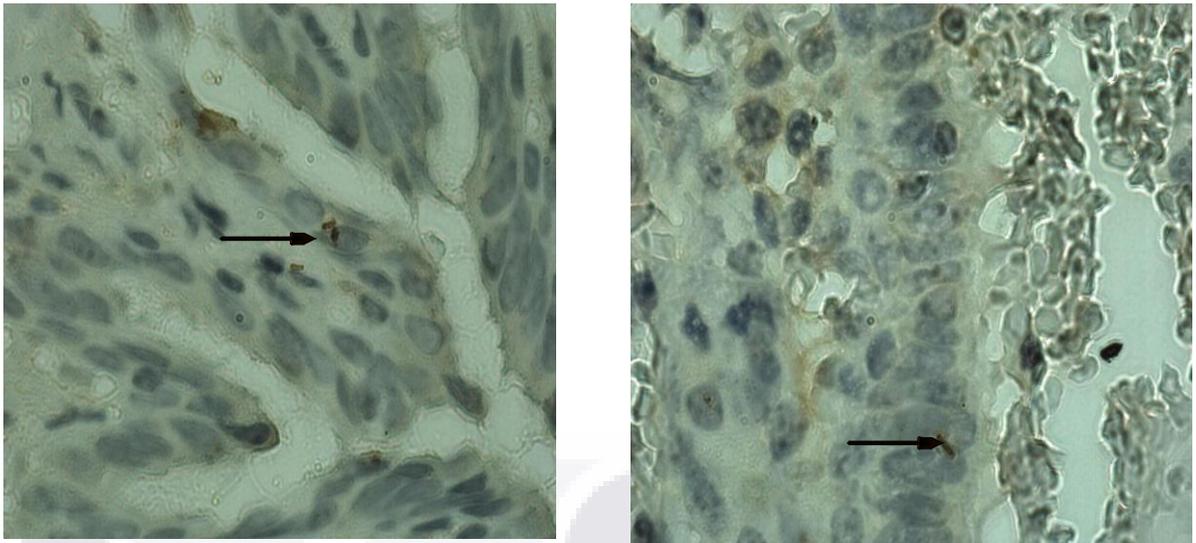


Figura 16. Inmunolocalización de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en el interior de las células asociadas al tejido conectivo del infiltrado linfático en los tabiques ineralveolares (izquierda), así como asociadas al epitelio bronquiolar (derecha), empleando el suero de animales convalescientes de pleuroneumonía porcina. Objetivo 100 X.

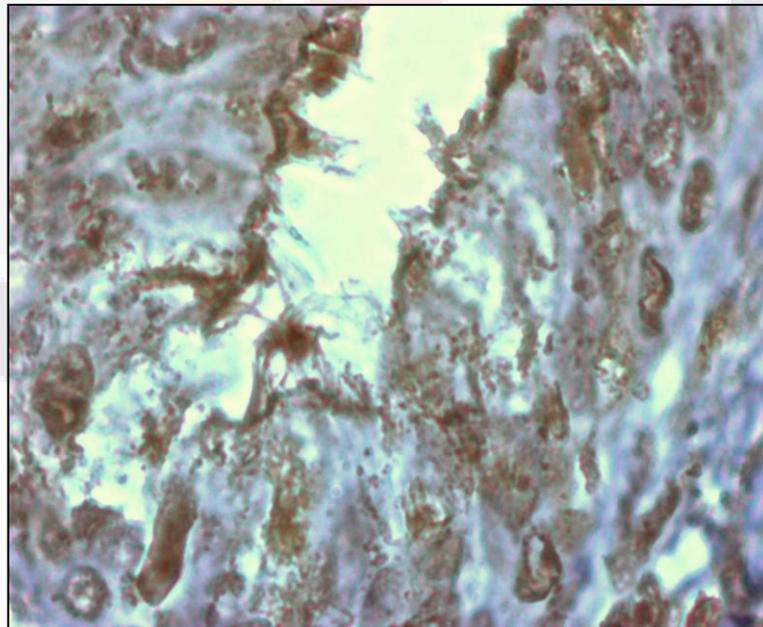


Figura 17. Inmunolocalización de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en el interior de las células del epitelio bronquiolar, así como a los cilios bronquiolares, reconocidas por el anticuerpo policlonal dirigido en contra de las proteínas totales de la bacteria. Objetivo 100 X.

DISCUSIÓN

Las enfermedades en el cerdo principalmente las que competen al sistema respiratorio pueden producirse como consecuencia de un mal manejo de la piara, ya sea por una mala alimentación, hacinamiento de los animales, falta de higiene en las granjas porcícolas, así como factores de estrés como el modo en que se transportan de un lugar a otro (Prieto, 2007). En el rastro municipal de San Francisco de los Romo se detectó pleuroneumonía crónica en el 60% de los cerdos sacrificados en diferentes fechas a lo largo de un año (Prieto 2007). Se obtuvieron muestras pulmones de cerdos que en apariencia externa no presentaban algún signo de enfermedad, pero que postmortem presentaban lesiones necróticas bilaterales, indicativas de pleuronemonía (Figura 1) [Ajito, *et al.*, 1996; Baarsch *et al.*, 2000].

De las lesiones obtenidas se aisló el biotipo 2 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Figura 2), encontrado en otras investigaciones realizadas en el laboratorio (Cornejo 2006; Prieto 2007), el cual no requiere NAD para su crecimiento (Herrera, 2002). En México el biotipo 1 serotipos 1,5 y 7 ha sido reportado como el más común (Negrete-Abascal, 1994), mientras que los primeros reportes de la presencia del biotipo 2 en el país se han registrado en el laboratorio por nuestro grupo de investigación (Prieto, en prensa).

Jensen (1999) Menciona que una de las manifestaciones patológicas de la infección por *A. pleuropneumoniae* es caracterizado por fibrosis (aumento en la cantidad de fibras elásticas) en su fase aguda. En la fase crónica se ha reportado fibrosis por aumento de fibras colágenas (Cornejo, 2006; Prieto, 2007). Al igual que Cornejo, en la presente tesis se observó daño a nivel epitelio alveolar y el engrosamiento de los tabiques interalveolares por un incremento en fibras de colágena. También se observó infiltración celular del sistema inmune y hemorragia intersticial, esto puede deberse al

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

un proceso inflamatorio crónico que daña el tejido de las estructuras respiratorias así como vasculares (Rojas, 2001). Otro factor importante considerado en la fibrosis se debe a la alteración en la distribución en la actina. En los resultados obtenidos en la presente tesis se observa un tanto con el anticuerpo monoclonal anti actina de cerebro de rata, como con la faloidina Alexa 594 un buen marcaje asociado al músculo liso tanto de alveolos como de bronquiolos, lo cual nos permite concluir que el anticuerpo tiene gran afinidad por la isoforma característica de las células musculares, la α actina (Guerrero-Barrera et al., 1996). El anticuerpo anti actina de cerebro de rata marca también algunas células alveolares del pulmón sano. Al realizar el marcaje en pulmón infectado, observamos que hay abundante marcaje entre los tabiques interalveolares, debido a infiltrado linfático y en las zonas de ruptura de los tabiques interalveolares que forman los vastos (Rubin-Farder., 2000). Este en los vastos podría estar relacionado con el cambio fenotípico del los fibroblastos a miofibroblastos, debido a que los fibroblastos cuando están en estado inactivo solo expresan las isoformas β y γ de la actina, pero cuando se activan por los mediadores del proceso inflamatorio (factores de crecimiento, interleucina, citocinas en general) comienzan a expresar la actina α , la isoforma muscular, cambiando su fenotipo de fibroblasto a miofibroblasto, esto con el fin de ayudar en el proceso de reparación del tejido (Saito. 2003., Batra *et al*, 2003; Batra, 2004., Bogatkovich, et al, 2003; Deng *et al*, 2004; Martin *et al*, 2001; Mireille *et al*, 1997; Saito *et al*, 2003; Wang *et al*, 2001; Zhou *et al*, 2004).

El marcaje de la actina filamentosa con faloidina Alexa 594 muestra focos de actina F asociados al epitelio bronquiolar, una clara distribución de actina filamentosa en el músculo liso y no se ve marcaje en la lámina propia del epitelio bronquiolar (Figura 11). En la zona de los alveolos se ve un claro marcaje asociado tanto a los neumocitos como a las células de tejido conectivo subyacente y las células de los

capilares sanguíneos, este marcaje muestra también focos de actina polimérica (Figura 12). Sin embargo, el marcaje de actina-F en un pulmón infectado por *Ap*, muestra un cambio en la distribución de actina filamentosa en el epitelio bronquiolar, en donde los focos de actina estructurada desaparecen, se muestra una clara desaparición de actina filamentosa en el músculo liso bronquiolar y la estructuración de actina filamentosa en las células de la lámina propia del bronquiolo (Figura 13). García-Cuéllar y colaboradores muestran que las proteasas de *Ap* rompen actina γ , a pesar de que no muestran si esas proteasas son capaces de romper otras isoformas de actina, nuestros resultados sugieren que hay una pérdida de esta proteína en la capa muscular. Pues el anticuerpo anti-actina de cerebro de rata puede marcar no solamente la α actina, sino también otras isoformas estructuradas o no en filamentos (Guerrero-Barrera et al., 1996; 1999), y resultados obtenidos en el laboratorio, no mostrados en la presente tesis, demuestran que el marcaje de músculo liso también disminuye al usar este anticuerpo. El aumento en el marcaje de actina filamentosa asociado a las células de la lámina propia puede marcar la actividad de las células del infiltrado linfático, que puede incluir células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos, o bien al igual en los resultados obtenidos en el marcaje de actina no filamentosa, pueden estar asociados a un cambio fenotípico en los fibroblastos presentes en los tabiques interalveolares a miofibroblastos, así como en la lámina propia, tal y como se observa en fibrosis subepitelial en bronquios en el asma (Batra, 2003). En la zona de los alveolos pulmonares, en el pulmón infectado se observa disminución de marca con faloidina, con respecto al marcaje observado en el pulmón sano (Figuras 13 y 14). Sin embargo, en la figura 14 se muestra la presencia de marcaje en células alargadas, que se asemejan a los miofibroblastos presentes en afecciones como el asma (Batra, 2003).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Asociado a este daño también identificamos a *Ap* en el interior de células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), tal y cómo se ha reportado por otros investigadores (Haesebrouck et al., 1997). *Ap* se localizó en células del tejido conectivo y células epiteliales de bronquiolos. Estudios previos realizados *in vitro* han demostrado la capacidad de *A. pleuropneumoniae* para adherirse tanto a epitelio estratificado de amígdalas, epitelio bucoepitelial o traqueal (Hamer-Barrera et al., 2004., Boekema et al., 2003., Van et al., 2002., Domp et al., 1994., Jacques et al., 1991), en el presente trabajo se muestra adhesión a células ciliares de broquiolos (Figura 17). *Ap* utiliza mecanismos parecidos a los que usa *Pasteurella multocida* para conquistar el intersticio celular, el cual hace que las células epiteliales de bronquiolos lo fagociten, y ya estando dentro de la célula epitelial utiliza el citoesqueleto para poder emigrar de un polo a otro polo y así poder colonizar al tejido (Rabier et al, 1996).

CONCLUSIONES

Se detectó pleuroneumonía porcina crónica en el Rastro Municipal de San Francisco de los Romo, Aguascalientes, México. De los casos detectados se confirmó la identidad de la bacteria mediante pruebas bioquímicas. El agente causal fue identificado como *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 2.

El daño provocado a nivel tisular debido a la pleuroneumonía crónica fue engrosamiento de los tabiques interalveolares, incremento en fibras colágenas, infiltración de células del sistema inmune así como hemorragia intersticial. Se detectaron cambios en el citoesqueleto de microfilamentos de actina con el marcaje de faloidina fluorescente. En pulmones infectados se observó un aumento en marcaje de actina-F en la lámina propia de bronquiolos y un marcaje en forma fibrilar en a nivel de los tabiques interalveolares, a comparación con los pulmones sanos, donde se observó un marcaje mas focal en células epiteliales de bronquios y su capa muscular, y muy poco marcaje en la lamina propia. Todo esto como consecuencia de los cambios en la forma y función de los fibroblastos a miofibroblastos y por los procesos inflamatorios.

En el marcaje con el anticuerpo contra actina de cerebro de rata, se observó en pulmón sano reconocimiento principalmente de actina α tanto filamentosa como no filamentosa a nivel de la capa muscular de bronquiolos y vasos sanguíneos y muy poco en el resto del tejido los tabiques interalveolares, en pulmón infectado se observó en zonas de ruptura tipo vastos y en algunas regiones de los tabiques interalveolares.

Utilizando sueros de cerdos convalecientes se localizó *Ap* en células del epitelio bronquiolar y del tejido conectivo lo cual nos indica que *Ap* entra por el epitelio bronquial hasta llegar a las células de tejido conectivo tal y como lo hacen algunos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

miembros de la familia *Pasteurella*. Se localizó *Ap* dentro de células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos.

El incremento en fibras colágenas en inflamaciones agudas y crónicas, puede estar asociado con el cambio en la distribución de actina, debido a la infiltración de células del sistema inmune al tejido infectado, modificación del citoesqueleto en células del epitelio alveolar, transformación de fibroblastos a miofibroblastos y crecimiento celular del músculo liso en bronquios y vasos sanguíneos, tal como sucede en daño pulmonar crónico en otros sistemas pulmonares. Ambos criterios, el incremento de colágena y el cambio en la distribución de actina, son considerados característicos de fibrosis. Deben de hacerse más estudios para profundizar acerca de la naturaleza de las células que presentan polimerización de actina en el pulmón con pleuroneumonía crónica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ajito, T., Haga, Y., Homma, S., Goryo, M., Okada, K. 1996. Immunohistological evaluation on respiratory lesions of pigs intranasally inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. J Vet Med Sci 58(4): 297-303.
2. Bancroft, J.D. & Gamble, M. 2002. Theory and Practice of Histological Techniques. Chapter 8. The Hematoxilina and eosin. Fifth Edition. Churchill Livingston Editorial. London. pp 125-138.
3. Batra, V., Khurana, S., Musani, A.I., Hastie, A.T., Carpenter, K.A., Zangrilli, J.G., Peters, S.P. 2003. Concentration of cytokines and growth factors in BAL fluid after allergen challenge in asthmatics and their effect on α -smooth muscle actin and collagen III synthesis by human lung fibroblasts. CHEST. 123: 398S-399S.
4. Batra, V., Musani, A., Hastie, A., Khurana, S., Carpenter, K., Zangrilli, J., Peters, S. 2004. Bronchoalveolar lavage fluid concentrations of transforming growth factor (TGF)-beta1, TGF-beta2, interleukin (IL)-4 and alpha-smooth muscle actin and collagen III synthesis by primary human lung fibroblasts. Clin Exp Allergy. 34(3): 437-44.
5. Beddek, A.J., Sheehan, B.J., Bosse, J.T., Rycroft, A.N., Kroll, J.S., Lanford, P.R. 2004. Two TonB system in *Actinobacillus pleuropneumoniae*: their roles in iron acquisition and virulence. Infect Immun. 72(2): 701-8.
6. Bogatkevich, G.S., Tourkina, E., Abrams, C.S., Harley, R.A., Silver, R.M., Ludwicka-Bradley, A. 2003. Contractile activity and smooth

- muscle α -actin organization in thrombin-induced human lung myofibroblast. *Cell Mol Physiol.* 285: L334-L343.
7. Chiers, K., Haesebrouck, F., Van Overbeke, I., Charlier, G., Ducatelle, R. 1999. Early in vivo interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with tonsils of pigs. *Vet. Microbiol.* 68: 301-306.
 8. Chiers, K., Van, O.I., Donn e, E., Baele, M., Ducatelle, R., De, B.T., Haesebrouck, F. 2001. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in cultures from nasal and tonsillar swabs of pigs, by a PCR assay based on the nucleotide sequence of a *dsbE*-like gene. *Veterinary Microbiology.* 83: 147-159.
 9. Cho, W. S. & Chae, C. 2002. Express of Nitric Oxide Synthase 2 and Tumor Necrosis Factor α in Swine Naturally Infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Pathol.* 39: 27-32.
 10. Choi, C., Kwon, D., Min, K., Chae, C. 1999. In-situ Hybridization for the Detection of Inflammatory Cytokines (IL-1, TNF- α and IL-6) in Pigs Naturally Infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Comparative Pathology.* 121: 349-356.
 11. Cornejo-Amador, M.G. 2007. Descripci n del daño estructural en pulmón de cerdo portadores cr nicos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Tesis de Maestría en Ciencias Morfológicas. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México.
 12. Deng, L., Fairbank, N., Fabry, B., Smith, P., Maksym, G. 2004. Localized mechanical stress induces time-dependent actin cytoskeletal remodeling and stiffening in cultures airway smooth muscle cells. *Cell Physiol.* 287(2): C440-8.

13. Diarra, M.S., Dolence, J.A., Dolence, E.K., Darwish, I., Miller, M.J., Malouin, F., Jacques, M. 1996. Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is promoted by exogenous hydroxamate and catechol siderophores. *Appl Environ Microbiol.* 62(3): 853-9.
14. Enriquez-Verdugo, I. 2004. Adhesión “in vitro” de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a colágena de pulmón de cerdo: caracterización y secuenciación de la adhesina. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias en la especialidad de Biología Celular. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. México.
15. Enriquez-Verdugo, I., Godinez, V.D., Martínez, Z.R., Serrano, L.J., De la Garza, M., Hamer, B.R., Guerrero, B.A. 2003-2004. Adhesión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a componentes de matriz extracelular de cerdo. *Ciencia Veterinaria. Universidad Nacional Autónoma de México. México.* 9: 271-287.
16. Enriquez-Verdugo, I., Guerrero, A.L., Serrano, J.J., Godinez, D., Rosales, J.L., Tenorio, V., de la Garza, M. 2004. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine-lung collage. *Microbiology.* 150: 2391-400.
17. Flores-Tena, F.J., Guerrero-Barrera, A.I., Avelar-González, F.J., Ramírez-López, E.M., Martínez-Saldaña, M.C. 2007. Pathogenic and opportunistic Gram-negative bacteria in soil, leachate and air in San Nicolás landfill at Aguascalientes, México. *Revista latinoamericana de microbiología.* 49: 25-30.
18. Frey, J. 1995. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends in Microbiology.* 3: 257-261.

19. Frey, J., 2003. Detection, Identification, and Subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Methods in Molecular Biology, Ed. Humana Press, USA, 216: 87-95.
20. García-Cuellar, C., Montañés, C., Tenorio, V., Reyes-Esparza, J., Duran, M.J., Negrete, E., Guerrero, A., De la Garza, M., 2000. 24 kDa cloned zinc metalloprotease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* is common to all serotypes and clones actin in vitro. *Con J Vet.* 64(2): 88-95.
21. García-González, O., García, R.M., de la Garza, M., Vaca, S., Paniagua, G.L., Mejía, R., Tenorio, V.R., Negrete-Abascal, E. 2004. *Actinobacillus pleuropneumoniae* metalloprotease: cloning in vivo expresión. *FEMS Microbiol Lett.* 234(1): 81-6.
22. Guerrero-Barrera, A.L., García, C.M., Villalba, J.D., Segura-Nieto, M., Gómez-Lojero, C., Reyes, M.E., Hernández, J.M., García, R.M., and De la Garza, M. (1996). Actin-related proteins in *Anabaena spp* and *Escherichia coli*. *Microbiology* 142:1133-1140.
23. Guerrero-Barrera, A.L., De la Garza, M., Mondragón, R. García-Cuellar, C. and Segura-Nieto, M. 1999. Actin-related proteins in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and their interactions with actin-binding proteins. *Microbiology* 145: 3235- 3244
24. Haesebrouck, F., Chiers, K., Van Overbeke, I., Ducatelle, R. 1997. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet. Microbiol.* 58: 239-249.
25. Hamer-Barrera, R., Godínez, D., Enríquez, I., Vaca-Pacheco, s., Martínez-Zuñiga, R., Talamás-Rohana, P., Suárez-Güemez, F., De la Garza, M. 2004. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*

- serotype 1 to swine bucal epithelial cells involves fibronectin. *Can J Vet Res.* 68: 33-41.
26. Jensen, T.K., Boye, M., Hagedorn-Olsen, T., Riising, J., Angen, O. 1999. *Actinobacillus pleuropneumoniae* Osteomyelitis in Pigs Demonstrated by Fluorescent In Situ Hybridization. *Vet. Pathol.* 36: 258-261.
27. Jo, B.M., Foss, D.L., Murtaugh, P.M. 2000. Pathophysiologic correlates of a acute porcine pleuropneumonia. *Annual Journal of Veterinary Research.* 61(6): 684-90.
28. Kawai S, Enzan H, Hayashi Y, Jin YL, Guo LM, Miyazaki E, Toi M, Kuroda N, Hiroi M, Saibara T, Nakayama H. 2003. Vinculin: a novel marker for quiescent and activated hepatic stellate cells in human and rat livers. *Virchows Arch.* 2003 Jul;443(1):78-86
29. Kamp, E.M., Stockhofe-Zurwieden, N., Van, L.L., Smits, M. 1997. Endobronchial inoculation with Apx Toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. *Infection and Immunity.* 65(10): 4350-4.
30. Martin, J.R., Wei, C.H., Honour, M.J., Harbeck, J. 2001. Airway inflammation and Bronchial Hyperresonsiveness after *Mycoplasma pneumoniae* infection in murine model. *Cell Mol Biol.* 24: 577- 582.
31. Negrete, E., Reyes, M.E., Garcia, R.M., Vaca, S., Giron, J.A., García, O., Zenteno, E., De la Garza, M. 2003. Flagella and Motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *J Bacteriol.* 185(2): 664-8.
32. Negrete-Abascal, E. Tenorio, V. F., Reyes, M.E. García, R.M., Guerrero, A.L. and De la Garza M. (1998). Purification of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen present by all

- the serotypes and detected in pigs with pleuropneumonia. *Can. J. Vet. Res.* 62: 183-190.
33. Negrete-Abascal, E., García, R.M., Reyes, M.E., Godinez, D., de la Garza, M. 2000. Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and Apx toxins. *FEMS Microbiol Lett.* 191(1): 109-113.
34. Prieto-Macías, C. K. 2007. Detección y caracterización de estructuras tipo granulomas en la pleuroneumonía porcina crónica. Tesis de Maestría en Ciencias Morfológicas. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México.
35. Prieto Macías, CK., Alvarado Estrada, K.N., Avelar González, F. J., Victoria Hernández, J. A., Martínez Guerrero, R., Garcidueñas Piña, C., Loera Muro, V. M. y Guerrero Barrera, A. L. Detección y caracterización de granulomas no tuberculoides en la pleuroneumonía porcina crónica causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 2. *Técnica Pecuaria*, En prensa.
36. Provost M, Harel J, Labrie J, Sirois M, Jacques M. 2003. Identification, cloning and characterization of rfaE of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, a gene involved in lipopolysaccharide inner-core biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett.* 223 (1):7-14.
37. Rabier, M.J., Tyler, N.K., Walker, N.J., Hansen, L.M., Hirsh, D.C., Tablin, F. 1997. *Pasteurella multocida* enters polarized epithelial cells by interacting with host F-actin. *Veterinary Microbiology.* 54: 343-355.

38. Rojas, M.W. 2001. Inmunología. Capítulo 7. Inflamación. Duodécima edición. Editorial Corporación para investigaciones biológicas. Colombia. pp 81-95.
39. Saito, A. Okazaki. H., Sugawara I, Yamamoto, K., Takizawa H. 2003. Potential action of IL-4 and IL-13 as fibrogenic factors on lung fibroblasts in vitro. *Allergy Immunol.* 132(2): 168-76.
40. Van, K.A., Haesebrouck, F., Chiers, K., Ducatelle, R., Kamp, M.E., Smits, M.A. 1996. Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites on porcine alveolar epithelial cells. *Infection and Immunity.* 64(9): 3905-7.
41. Wang, F., Yang, J., Hung, S.Y., Pan, I. 2007. In vitro migratory responses of swine neutrophils to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Exp Anim.* 50(2): 139-145.
42. Zhou. L., Li, J., Goldsmith, A., Newcomb, D., Giannola, D., Vosk, R., Eves, E., Rosner, M., Solway, J., Hershenson, M. 2004. Human bronchial smooth muscle cell lines show a hypertrophic phenotype typical of severe asthma. *Respir Crit Care Med.* 169(6): 703-11.