

• ADHESIÓN DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* A COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR DE CERDO

IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO DELFINO

GODINEZ VARGAS RODRIGO

MARTÍNEZ ZUNIGA JOSE DE JESUS

SERRANO LUNA MIREYA DE LA

GARZA ROBERTO HAMER BARRERA

ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

I. Generalidades de *Actinobacillus pleuropneumoniae* 271

II. Pleuroneumonía porcina 271

- Proyecto apoyado por CONACyT-México, No. 28755B y G38590B. Agradecemos al Sr. Esteban Molina Alvarado y a la Biól. Magda E. Reyes López por su asistencia técnica.

| | |
|--|---------|
| III. Factores de virulencia | 272 |
| 1. Capsula | 273 |
| 2. Lipopolisacárido (LPS) | 273 |
| 3. Exotoxinas | 274 |
| 4. Proteasas | 275 |
| 5. Proteínas de membrana externa (PME) | 275 |
| 6. Adhesinas | 276 |
| IV Adhesión | 276 |
| V Matriz extracelular | 277 |
| VI. Adhesión a MEC y a proteínas plasmáticas del cerdo | 279 |
| VII. Experiencias de adhesión de <i>Actinobacillus</i> <i>pleuropneumoniae</i> a células y tejidos | 282 |
| 1. Adhesión de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> a fibronectina plasmática y células bucoepiteliales de cerdo | 282 |
| 2. Adhesión de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> a colágena de pulmón de cerdo | 284 |
| 3. Adhesión de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> a fibrinógeno de plasma de cerdo | 284 |
| VIII. Conclusiones | 286 |
| Referencias | 287 |

I. Generalidades de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Actinobacillus pleuropneumoniae (*App*) es un cocobacilo gram-negativo, pleomórfico, anaerobio facultativo, que no forma esporas y es capsulado. Se le ha considerado inmóvil, aunque en un trabajo reciente (36) han descrito flagelos y movilidad. Bioquímicamente es ureasa positivo, capaz de fermentar manitol, xilosa y ribosa y fermentación variable de lactosa. En medio artificial ocurre la transformación morfológica de colonia rugosa a lisa. Las colonias en placas de agar sangre exhiben β hemólisis y han sido identificadas fimbrias por tinción negativa (15,23, 51). En función de sus requerimientos de NAD se clasifica en dos biotipos, el biotipo 1 agrupa las cepas dependientes de NAD, y dentro de él se han reconocido 12 serotipos. El biotipo 2 agrupa las cepas NAD independientes reconociéndose los serotipos 13 y 14. Recientes estudios muestran la identificación del serotipo 15 que se agrupa dentro del biotipo 1 ya que es dependiente de NAD (4). El aislamiento inicial *de App* es con atmósfera de CO del 5-7%. Esta bacteria es positiva a la reacción de CAMP (Prueba de Christie Atkins-Munch-Petersen), que consiste en una reacción de complementación entre una cohemolisina de *App* con una esfingomielisina de *Staphylococcus aureus* (16).

Sólo los cerdos son susceptibles a *App*, no ha sido aislado de roedores, seres humanos, aves, y no persiste en el medio ambiente. Sin embargo, se puede producir la enfermedad en ratones al inocular grandes cantidades de bacterias, por vías intraperitoneal o intranasal (2, 15).

II. Pleuroneumonía Porcina

App es el agente etiológico de la Pleuroneumonía Porcina (PP), enfermedad devastadora en los cerdos de todas las edades,

produciendo alta mortalidad (20-80%) y morbilidad (100%), por consiguiente, grandes pérdidas económicas en la producción industrializada del cerdo a nivel mundial. Los animales que sobreviven a la infección presentan una pobre conversión alimenticia y permanecen como portadores crónicos, además la enfermedad representa un fuerte gasto en medidas preventivas y en antibióticos. La PP se manifiesta como hiperaguda, aguda o crónica, siendo las fases aguda e hiperaguda características de una neumonía hemorrágica necrosante asociada a pleuritis fibrinosa y la lesión crónica se distingue por tejido pulmonar necrosante mas pequeño, consolidado, infartado y encapsulado (16, 23). Recientemente se ha encontrado *App* en exámenes *postmortem* de cerdos que padecieron otitis media e interna, como un agente que participa en infecciones mixtas (9); además, mediante ensayos de hibridación de RNA ribosomal, se ha demostrado la presencia de *App* en la osteomielitis necrotizante y en artritis fibrinopurulenta (28).

En México, a partir de 1976 se observaron brotes de PP en varios estados como Distrito Federal, Tlaxcala, Michoacán y recientemente en Jalisco, Puebla, Yucatán, Guanajuato, Querétaro, Estado de México y Sonora. Los serotipos 1-8 fueron los causantes de los brotes, y el más frecuente el serotipo 1. Por lo tanto la PP está ampliamente distribuida en el país (5).

III. Factores de virulencia

Los factores de virulencia son los responsables de las reacciones que ocurren durante los procesos de una enfermedad, por tanto, el estudio de los factores de virulencia permite entender los mecanismos usados por la bacteria para causar la enfermedad. La patogénesis de *App* se considera multifactorial, ya que esta bacteria cuenta con varios factores de virulencia: cápsula, adhesinas, lipopolisacárido (LPS), proteínas de membrana

externa (PME), proteasas y exotoxinas (16, 23). Proteasas y exotoxinas son secretadas por el microorganismo (34).

1. *Capsula*

Es la responsable de la especificidad del serotipo de *App* y se reconocen 13 serotipos del biotipo 1 debido a la presencia del antígeno capsular. Los fosfatos y el ácido carboxílico le confieren una carga negativa.

Las propiedades biológicas de la capsula son: no tiene actividad tóxica, es inerte, no tiene actividad pirogénica, debido a la carga negativa hay resistencia a la fagocitosis por neutrófilos, es opsonizada por anticuerpos, e interfiere con la actividad del complemento. Los anticuerpos generados contra la capsula protegen contra la muerte, pero no contra la enfermedad o contra la infección crónica. La virulencia atribuida a la capsula es variable entre los diferentes serotipos, pero se requiere la capsula para que la bacteria sea virulenta (14).

2. *Lipopolisacarido (LPS)*

El LPS es similar al encontrado en otras bacterias gram-negativas. La cadena O específica, le confiere las características fenotípicas de cepas lisas, semirrugosas y rugosas. El antígeno O es el responsable de las reacciones cruzadas entre los serotipos.

Las propiedades biológicas del LPS son: tiene actividad de endotoxina, gelifica a los amebocitos del género *Limulus*, produce reacción de Schwartzman, actúa como un pirógeno, induce la liberación de mediadores proinflamatorios y estos mediadores activan varias células, como macrófagos y neutrófilos y juega un papel importante en la inflamación aguda. La administración

de LPS de *A. pleuropneumoniae* a cerdos induce neumonía no necrosante con infiltración de neutrófilos (14, 16).

3. Exotoxinas

Las exotoxinas bacterianas son proteínas extracelulares solubles, que al ser liberadas al medio por el organismo vivo, se activan bioquímicamente (13). Se han identificado cuatro tipos de citotoxinas en *App*, las cuales son llamadas toxinas Apx, que pertenecen a la familia de las toxinas RTX formadoras de poros (17).

- Apx I: Proteína de 105 kDa, fuertemente hemolítica y fuertemente citotóxica. Es codificada por el operón *apxI*, que tiene 4 genes: *apxIC* (activador), *apxIA* (pretoxina) *yapxIB* y *apxID* (aparato de secreción). La proteína ApxI la producen los serotipos 1, 5a, 5b, 9, 10 y 11 y por lo tanto son los más virulentos.
- Apx II: Proteína de 103-105 kDa, débilmente hemolítica y débilmente citotóxica, es codificada por el operón *apxII* y consiste de 2 genes: *apxIIC* y *apxIIA*, utiliza los productos de los genes *apxIB* y *apxID* para secretarse, la producen todos los serotipos excepto el 10.
- Apx III: Proteína de 120 kDa, es no hemolítica y fuertemente citotóxica, codificada por el operón *apxIII* y contiene 4 genes: *apxIIIC*, *apxIIIA*, *apxIIIB* y *apxIIID*. Apx III la producen los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8.
- Apx IV: recientemente descrita en *App*, tienen actividad citotóxica y la producen todos los serotipos, además de que son específicas del serotipo (6).

La actividad hemolítica de estas proteínas es probablemente la responsable de las lesiones iniciales de la PP, caracterizadas

por ser hemorrágicas y necrosantes. Las toxinas Apx son el principal factor de virulencia y en su ausencia la cepa de *App* es avirulenta (17).

4. *Proteasas*

Las proteasas de microorganismos son factores de virulencia, ya que hidrolizan componentes proteicos del huésped y facilitan su invasión. *App* secreta enzimas proteolíticas hacia el medio de cultivo y éstas tienen actividad sobre varios sustratos como son la gelatina, hemoglobina e 19A porcinas. Las proteasas son probablemente inactivas cuando están dentro de la célula y se activan cuando se secretan, deduciéndose que podría facilitar la invasión de la bacteria a las mucosas del tracto respiratorio del cerdo (21, 35).

Las proteasas de esta bacteria patógena son metaloproteasas neutras y se proponen como un factor de virulencia, ya que pueden facilitar la colonización de este microorganismo (35). Una proteasa de alto peso molecular fue purificada de sobrenadantes de cultivo y caracterizada bioquímicamente. Anticuerpos contra esta proteasa reconocen a todos los serotipos *deApp* (37). Recientemente se clonó y caracterizó un fragmento del gen que codifica para la metaloproteasa, el cual hibrida con todos los serotipos de *App*, pero no hibrida con bacterias relacionadas de la familia *Pasteurellaceae* (20).

5. *Proteínas de membrana externa (PME)*

Se han identificado varias PME en *App* y todos los serotipos contienen varias proteínas comunes, incluyendo una lipoproteína asociada al peptidoglicano llamada PalA, una proteína modificable por calor, además de una de 48 kDa que no está presente en otras especies gram-negativas, relacionada con la patogénesis del tracto

respiratorio del cerdo (7). Las PME son importantes en la regulación de proteínas de superficie en respuesta a las condiciones de crecimiento en el medio ambiente y se ha determinado su participación como receptores para elementos indispensables para su crecimiento, además de que estas proteínas son capaces de inducir cierta respuesta inmune (23).

6. *Adhesinas*

Se ha descrito que el LPS es una adhesina importante para el anclaje de la bacteria y se han propuesto algunos receptores posibles (27). Si bien se ha demostrado la presencia de fimbrias tipo IV que están localizadas en la superficie de las cepas de *App*, su papel en la adhesión no ha sido establecido, pero se piensa que funcionan en la adhesión a las células del hospedero como sucede en otras bacterias gram-negativas (55).

IV: Adhesión

Se define a la adhesión bacteriana como la asociación específica y relativamente estable entre la célula bacteriana y una superficie, la que puede ser otra célula o productos celulares. En este fenómeno participan principalmente dos moléculas: se denomina adhesina a la molécula o estructura de la superficie que participa en el proceso por parte de la bacteria y receptor a la parte complementaria en el hospedero o en el ambiente (3). La adhesión es indispensable para la bacteria como un paso inicial para un proceso de colonización, tanto para las bacterias de la flora normal como para las bacterias patógenas, las que originan un proceso infeccioso y en consecuencia una enfermedad. Para muchas bacterias la adhesión es también importante para su mantenimiento en los tractos o tejidos, ya que su capacidad de anclaje evita su eliminación por los

mecanismos propios del huésped, entre éstos se encuentran la acción de limpieza de fluidos biológicos tales como el moco entérico, la sangre, la orina, así como el transporte mucociliar, e incluso la microflora normal previamente establecida (3).

Una adhesina puede enlazar muchos ligandos como es el caso de la proteína YadA de *Yersinia enterocolitica* que puede enlazar colágena, laminina y fibronectina, o en el caso de la adhesina de *Porphyromonas gingivalis* que reconoce fibrinógeno y fibronectina. Muchos microorganismos pueden expresar varias adhesinas que reconocen la misma molécula (40).

Los receptores de células animales se encuentran formando parte de la membrana o de su superficie externa, como las glicoproteínas receptoras llamadas integrinas. Otras proteínas receptoras son las de matriz extracelular (MEC) y las presentes en el plasma (30, 39).

V. Matriz Extracelular

La MEC es un tejido biológicamente activo, compuesto de una mezcla de macromoléculas complejas. La adhesión, migración, proliferación y diferenciación celulares, son ejemplos de procesos biológicos influenciados por la composición y organización estructural de la MEC (40, 44). La MEC está compuesta de proteínas y polisacáridos que son secretados localmente y ensamblados dentro de una red con asociación cercana a la superficie de la célula (12).

La MEC está compuesta de dos clases de macromoléculas:

- *Glucosaminoglicanos (GAG)*, que son cadenas de polisacáridos, que se unen covalentemente a proteínas y forman

proteoglicanos. Existen 4 grupos de GAG los cuales tienen carga negativa y son: hialurona; condroitín-sulfato o dermatánsulfato; heparán-sulfato y heparina; queratán-sulfato.

- *Proteínas fibrosas*, las cuales tienen dos funciones, la estructural y la adhesiva. Estas proteínas fibrosas son: fibronectina; vitronectina; laminina; tenascina; trombospondina; sialoproteína del hueso; elastina; colágena.

Se describirán más adelante sólo las proteínas fibrosas de MEC que se han estudiado como sustratos, probablemente ligandos de adhesión para *App*.

- *Fibronectina*: Glicoproteína dimérica de alrededor 500 kDa, sintetizada por fibroblastos, condrocitos, células endoteliales, macrófagos y células epiteliales, entre otras. Sirve como un adhesivo general para enlazar células a varios sustratos de matriz intercelular, es importante en la migración celular. Es una estructura altamente conservada, tiene dos dominios de unión definidos, uno para heparina y fibrina y el otro para colágena y gelatina (29).
- *Colágena*: Es la proteína más abundante de las moléculas de MEC y también del organismo, su masa molecular es de 280 kDa. Es una familia de glicoproteínas que contiene un alto porcentaje de glicina (33%), prolina (10%), hidroxiprolina (10%) y 5-hidroxilisina (42). Se han identificado 25 cadenas alfa de colágena, cada una codificada por un gen distinto y sólo 19 tipos se han caracterizado, los cuales tienen motivos comunes y varían en su orden estructural, su función y su forma, así como en la longitud de los segmentos de la triple hélice, en tamaño y posición de los dominios globulares que no están en triple hélice (44).

Además de los componentes de MEC, las proteínas presentes en el plasma sirven también como receptores para bacterias, como es el caso del fibrinógeno.

- *Fibrinógeno*: Glicoproteína plasmática de 340 kDa, altamente soluble, con tres pares de cadenas polipeptídicas no idénticas (a, B, Y y 2 Y 47.5 nm de longitud, posee cuatro grupos carbohidratos, el calcio lo estabiliza contra la desnaturalización por calor, contra la digestión por tripsina Y acelera la formación de fibrina. Es un ligando para la integrina a B, que es un receptor en plaquetas. Interactúa con diferentes sustancias con consecuencias fisiológicas importantes, por ejemplo se enlaza al plasminógeno Y trombina, con fibronectina, Y tiene crucial relación con plaquetas (10).

VI. Adhesión a MEC y a proteínas plasmáticas del cerdo

Algunas bacterias patógenas tienen capacidad de adherirse a la MEC de mamíferos, lo cual les ayuda posteriormente a colonizar, dañar e invadir sitios del tejido subepitelial, promoviendo de esta manera la virulencia bacteriana (53).

Ciertas moléculas de MEC actúan como ligandos para las adhesinas en el tejido del huésped. Los componentes de la MEC son moléculas conservadas en diferentes especies animales Y las bacterias expresan adhesinas que reconocen esas estructuras, adhiriéndose a una variedad de tejidos animales, con facilidades al acceso de nutrientes (40).

App se adhiere a células traqueales Y a pulmón congelado de cerdo, la adhesión está relacionada con el LPS, es por ello que se considera a éste como una adhesina de *App* (27).

Se han descrito actividades citotóxicas y hemolíticas en *App*, sin embargo, los factores involucrados en la colonización del epitelio del tracto respiratorio no son totalmente conocidos, pero esta colonización puede ser un paso importante en la progresión de la enfermedad (27). La bacteria probablemente se adhiere vía adhesinas, las cuales tienen el potencial para interactuar con receptores en la superficie celular epitelial (27).

Debido a que la interacción de esta bacteria con el cerdo es relevante en la patogénesis, estudiamos la adhesión de esta bacteria a componentes de MEC, como colágena y fibronectina de pulmón de cerdo, ya que son proteínas abundantes y adhesivas en este órgano, y también la adhesión al fibrinógeno, ya que cubre rápidamente la superficie externa de biomateriales. Estas tres moléculas pueden servir como sustratos de adhesión, como un paso inicial en la colonización e infección en la enfermedad de la PP.

El pulmón es un órgano dinámico y delicado que depende de la MEC para mantener su estructura. El tejido conectivo del pulmón tiene tres componentes: las células, las proteínas fibrosas extracelulares y una sustancia en la cual las fibras son embebidas (1).

En un estudio completo hecho por Mills y Haworth en 1987 sobre distribución de tejido conectivo en pulmón de cerdo, demostraron con anticuerpos contra fibronectina que esta proteína está localizada en los márgenes externos de la arteria pulmonar adventicia en vasos de todos tamaños, distribuyéndose de la pared del vaso al parénquima pulmonar adyacente, por lo que está ampliamente distribuida en el tejido pulmonar del cerdo joven y del adulto. La adhesión a fibronectina ha sido descrita en diferentes microorganismos, y entre estos se encuentran bacterias gram-positivas (26, 45), gram-negativas (19, 54), y en micoplasmas (22).

La colágena es la proteína estructural más abundante, que constituye cerca del 60% del tejido conectivo del parénquima del pulmón y es de naturaleza heterogénea, ya que este órgano contiene una mezcla de colágenas (52).

En el pulmón de cerdo existen cuatro tipos de colágenas: la Tipo I se localiza en la pared alveolar del cerdo adulto pero no en la del recién nacido y en los dos se encuentra en fibras compuestas por la adventicia de las venas pulmonares. Tipo III: se localiza en fibras del tejido intersticial del pulmón, en el citoplasma del músculo liso de las células elásticas, en la arteria media pulmonar muscular, en la pared de las venas y en el músculo liso bronquial. La localización en el pulmón de cerdo del recién nacido y del adulto es idéntica. Tipo V: se localiza en fibras distribuidas en el tejido conectivo perivascular y bronquial en adultos y recién nacidos. En adulto se encuentra sólo en arteria pulmonar muscular y elástica media. Tipo IV: Se localiza en la membrana basal de capilares alveolares, de músculo liso y endotelial, tanto en cerdos adultos como en recién nacidos (32). La colágena representa un blanco de acción para los microorganismos. Adhesinas que se unen a colágena se expresan tanto en bacterias gram-positivas (46, 47, 53), como en gramnegativas (40, 49, 50, 53).

La sangre también es un tipo de tejido conectivo especializado que contiene varias sustancias, entre ellas una intercelular líquida que se denomina plasma, la cual contiene una mezcla de proteínas, entre ellas están los factores de coagulación, siendo de las más abundantes el fibrinógeno o Factor 1(8,33). También se ha identificado que el fibrinógeno sirve como un sustrato para la adhesión bacteriana y se ha descrito su unión por medio de adhesinas, tanto en bacterias gram-positivas (18, 38, 48), como en gram-negativas (40).

VII. Experiencias de adhesión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a células y tejidos

1. Adhesión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a fibronectina plasmática y a células bucoepiteliales de cerdo.

Con la intención de determinar si *App* tiene la capacidad de unirse a moléculas de fibronectina, se realizaron ensayos de adhesión a esta proteína inmovilizada en el plástico de las cajas de micro titulación. Bacterias crecidas en medio líquido fueron lavadas y expuestas a las películas de fibronectina, donde fue evaluada su adhesión usando la tinción de azul de metileno para la bacteria. El grado de adhesión fue medido por D.O. observándose que *App* se adhiere instantáneamente después de la interacción (54.6 %), y esta adhesión gradualmente se incrementa hasta un 100% a los 120 minutos. Esta unión permanece estable por más tiempo *in vitro*, por lo tanto nos sugiere que el tiempo necesario para que se lleve a cabo la interacción es muy corto y prácticamente desde la entrada de la bacteria al hospedero, lo que permite probablemente colonizar y causar daño muy rápidamente *in vivo*. Para demostrar que la fibronectina participa en la adhesión de *App*, se realizó la extracción de proteínas de membrana externa (PME) de *App* por medio de la técnica de Rapp *et al*, 1986 (43) y se identificó una PME de 40 kDa involucrada en esta adhesión por medio de anticuerpos contra fibronectina de cerdo (11).

Por otra parte, con el propósito de tener un modelo celular accesible para medir la adhesión de *App*, se probó esta propiedad *deApp* en células bucoepiteliales de cerdo (CBE). Esta bacteria se une en gran proporción a estas células (aproximadamente 100 bacterias/CBE), pudiendo diferenciarse la adhesión respecto a células humanas y de rata. La adhesión a CBE correlaciona

con la virulencia de la cepa y el serotipo de *App* (24). Cuando estas células son tratadas con tripsina o proteinasa K, que prácticamente elimina la fibronectina de la superficie, los valores de adhesión disminuyen drásticamente, como se observa en el Cuadro 1. Anticuerpos contra fibronectina también inhibieron la adhesión (25). Por tanto, fibronectina es una proteína que podría estar participando en la adhesión de *App*.

CUADRO 1
EFECTO DE INHIBICIÓN POR VARIOS TRATAMIENTOS SOBRE
LA ADHESION DE *A. pleuropneumoniae* A CÉLULAS
BUCEOPITELIALES DE CERDO

| <i>Tratamientos</i> | <i>App. * tratadas</i> <i>App./CBE % inh.</i> | <i>CBE** tratadas</i> <i>App./CBE % inh.</i> |
|---|--|---|
| Ninguno | 0 | 0 |
| <u>PROTEINAS</u> | | |
| Fibronectina de cerdo (30 µ/ml) | 76.8 | 21.5 |
| Fibrinógeno de cerdo (8 µ/ml) | 67.3 | 74.0 |
| <u>ENZIMAS</u> | | |
| Proteinasa K (1 mg/ml) | 59.3 | 82.9 |
| Tripsina (2.5 µg/ml) | 53.8 | 84.3 |
| ANTICUERPOS (dilución 1:100) | | |
| Suero de cerdo en fase convaleciente | 81.4 | 73.8 |
| <i>Anti-A. pleuropneumoniae</i> de cerdo | 70.2 | 65.9 |
| <i>Anti-A. pleuropneumoniae</i> de conejo | 82.3 | 68.7 |
| Anti-fibronectina de cerdo en conejo | 14.5 | 76.8 |
| Suero de cerdo preinmune | 33.5 | 25.3 |
| Suero de conejo preinmune | 41.8 | 27.7 |

* *A.pp.* : *Actinobacillus pleuropneumoniae*

**CBE: Células bucoepiteliales de cerdo

2. Adhesión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a colágena de pulmón de cerdo

Se purificaron colágenas tipos I, III, IV y V de pulmón de cerdo, por medio de precipitaciones a diferentes molaridades de cloruro de sodio (2.5 M para tipo I, 1.7 M para tipo III, 1.2 M para tipo IV y V), y se liofilizaron para obtener la proteína fácilmente manejable. El análisis de los diferentes tipos de colágenas, se realizó por la técnica del SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio) al 7.5%, observándose las bandas características de colágena, presentando el mismo patrón electroforético que las colágenas de placenta humana tipo I y VIII de Sigma. Se encontró que *App* se adhiere a los cuatro tipos de colágena de pulmón de cerdo, utilizando para esto el ensayo de unión antes descrito, pero con películas de colágena en placas de microtitulación y cuantificando la unión. *App* también se adhirió a colágena desde el inicio de la interacción, tomando como un 100% de unión para colágena III y 95.2, 90.3 y 96.3% para colágena I, IV y V, respectivamente. Se confirmó esta unión por la técnica de microscopía electrónica por tinción negativa. También se encontró una PME *deApp* de 60 kDa que une a todas las colágenas de pulmón de cerdo, por medio de la técnica de transferencia y reconocimiento a colágena biotinilada en papel de nitrocelulosa. Por tanto, colágena es también un substrato importante para *App* (13).

3. Adhesión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a fibrinógeno de plasma de cerdo

Debido a que el fibrinógeno de cerdo es una proteína abundante del plasma, se probó la adhesión de *App* a esta proteína. Para determinar la pureza de fibrinógeno de cerdo (Sigma) se realizó un SDS-PAGE y en condiciones no reductoras obtuvimos una banda de 300 kDa, mientras que en condiciones reductoras obtuvimos las cadenas α (67 kDa), B (58 kDa) y γ (47 kDa). Para detectar la

unión de *App* a fibrinógeno se utilizó la técnica de reconocimiento en colonia, donde se gotea al cultivo lavado y se hace el reconocimiento con fibrinógeno biotinilado, observándose gran intensidad de unión. Para corroborar esta unión se hizo una cinética de adhesión de *App* a fibrinógeno, por medio de películas de fibrinógeno inmovilizadas en placas de microtitulación como ya fue descrito. Se observó la unión desde los 5 minutos de interacción, llegando a su mayor adhesión a los 120 min. (100%); también la adhesión fue observada por microscopía electrónica. Por último se logró el reconocimiento de una PME de *App* de 60 kDa que une a fibrinógeno de cerdo, por medio de la técnica de electroforesis y transferencia a papel de nitrocelulosa, con reconocimiento usando fibrinógeno biotinilado. De nuevo se puede decir que esta proteína es utilizada por *App* para unirse (31).

En la figura 1 se muestra la interacción de *A. pleuropneumoniae* adherido a una fibra de fibrinógeno porcino.

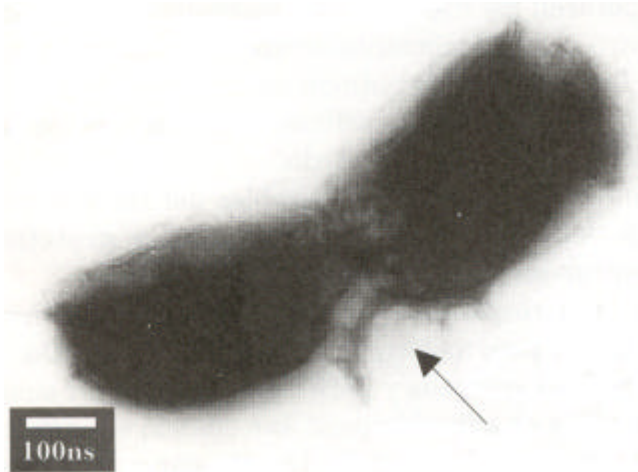


Fig.1 Interacción de *A. pleuropneumoniae* con una fibra de fibrinógeno porcino (flecha). Microscopía electrónica, tinción negativa con acetato de uranilo.

VIII. Conclusiones

- *App* se adhiere instantáneamente a fibronectina de cerdo, permaneciendo la unión *in vitro* por mucho tiempo.
- Se prepararon PME de *App*, y se encontró que una PME de 40 kDa de *App* reconoce a fibronectina por medio de anti cuerpos contra fibronectina de cerdo.
- *App* presenta una adhesión preferencial a células bucoepiteliales de cerdo comparadas con las de rata o de ser humano.
- Se purificaron colágenas de pulmón de cerdo tipos I, III, IV y V.
- Cuantificamos la adhesión de *App* a los cuatro tipos de colágena, tomando como un 100% a la tipo III, porque siempre mostró mayor adhesión que los otros tipos y también observamos cualitativamente que gran cantidad de células de *App* son capaces de adherirse fuertemente alas redes o fibras de colágena tipo III.
- Se separaron las PME de *App*, lográndose enriquecer, y se encontró el reconocimiento de una PME de 60 kDa de *App* hacia las colágenas de pulmón de cerdo.
- *App* presenta en su superficie moléculas que se unen al fibrinógeno de plasma de cerdo.
- Las moléculas de *App* responsables del reconocimiento y enlace del fibrinógeno son de carácter proteínico, se encuentran en las PME.
- La proteína responsable en *App* de la unión al fibrinógeno presenta un peso molecular aproximado de 60 kDa.
- Fibronectina, colágena y fibrinógeno pueden ser substratos importantes de adhesión para *App* cuando se encuentra en el tejido respiratorio del cerdo. La adhesión a estos substratos le permite a *App* iniciar el proceso de infección y colonización en la pleuroneumonía porcina.

Referencias

1. **Bashey, R.I., Herold, R.A., and Jimenez, S.A.:** Biochemical characterization of collagens and of a non-collagenous protein synthesized by guinea pig lung fibroblasts in culture. *Connective Tissue Research*. 12: 17-31,1983.
2. **Bhatia, B., Mittal, K.R. and Frey, J.:** Factor involved in immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. *Vet. Microbiol.* 29: 147-158, 1991.
3. **Bisno, A.L.:** Molecular aspects of bacterial colonization. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 16: 648-657, 1995.
4. **Blackall, P.J., Klaasen, H.L.B.M., Van Den Bosch, H., Kuhnert, P., and Frey, J.:** Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet. Microbiol.* 84: 47-52, 2002.
5. **Ciprián-Carrasco, A. , Mendoza-Elvira, S.:** Importancia de identificar el serotipo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en la pleuroneumonía contagiosa porcina por la clase de citolisina excretada. *Porcivama* 5: 6-20, 1995.
6. **Cho, W.S. and Chae, C.:** Expression of apxIV gene in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Comp. Pathol.* 125: 34-40,2001.
7. **Cruz, W.T., Nedialkov, Y.A., Thacker, B.J., Mulks, M.H.:** Molecular characterization of a common 48-kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 64: 83-90, 1996.
8. **Devlin, T.H.:** Textbook of Biochemistry with clinical correlations. *Ed. Wiley-liss, Inc.* 4ta. ed. USA. pp. 960-979, 1997.

9. **Duff, J.P., Scott, W., Wilkes, M., Hunt, B.:** Otitis in a weaned pig: a new pathological role for *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Vet. Rec.* 139: 561-563,1996.
10. **Doolittle, R.F.:** Fibrinogen and fibrin. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 195-229, 1984.
11. **Duran-Avelar, M., Vivanco, N., Talamas, P., Hernández, V., and de la Garza, M.:** Adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine fibronectin. *Proceedings of the HAP International Conference*. México. pp. 54, 1996.
12. **Engel, J.:** Domains organizations of modular extracellular matrix proteins and their evolution. *Matrix Biology* 15: 295-299, 1996.
13. **Enríquez-Verdugo, I., Guerrero-Barrera, A.L., Serrano-Luna, J.J., Reyes-López, M.E., Rosales-Encina, J.L., Godínez Vargas, D., Martínez-Zúñiga, R., Hamer-Barrera, R.C., and de la Garza, M.:** *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 adheres to pig-lung collagen in vitro. *J. Bact.* 2002. (En prensa)
14. **Fedorka-Cray, P.J., Cray, W.C., Gray, J.T., Breisch, S.A., Anderson, G.A.:** *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Part II. Virulence Factors, Immunity and Vaccines. *Food Animal*. 16: 117-125, 1994.
15. **Fedorka-Cray, P.J., Hoffman, L., Cray, W.C., Gray, J.T., Breisoli!, S.A., Anderson, G.A.:** *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Part I. History, Epidemiology, Serotyping, and Treatment. *Food Animal* 1447-1455, 1993.
16. **Fenwick, B. and Henry, S.:** Clinical Update: Porcine Pleuropneumonia. *JAVMA*. 20 (4): 1334-1340, 1994.

17. **Frey, J.:** Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol.* 3: 257-261, 1995.
18. **Foster, T.J., Hook, M.:** Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 6: 461-501, 1998.
19. **Froman, G.:** Binding of *Escherichia coli* to fibronectin. *J. Biol. Chem.* 259: 14899-14905, 1984.
20. **García-Cuellar, C., Montañés, C., Tenorio, V., Reyes-Esparza, J., Duran, M.J., Negrete, E., Guerrero, A., y de la Garza, M.:**
A 24-kDa cloned zinc metalloprotease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* is common to all serotypes and cleaves actin *in vitro*. *Can. J. Vet. Res.* 64: 88-95, 2000.
21. **García-Cuellar, C., Tenorio, V., Negrete, E., Godínez, D., Álvarez, J., Serrano, J., Reyes, M., de la Garza, M.:**
Actinobacillus pleuropneumoniae: una bacteria nociva para la porcicultura mexicana. *Avance y Perspectiva* 14: 173-180, 1995.
22. **Girón, J.A., Lange, M., Baseman, J.B.:** Adherence, fibronectin binding, and induction of cytoskeleton reorganization in cultured human cells by *Mycoplasma penetrans*. *Infec. Immun.* 64: 197-208, 1996.
23. **Haesebrouk, F., Chiers, K., Van Overbeke, I., Ducatelle, R.:**
"Actinobacillus pleuropneumoniae" infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection". *Vet. Microbiol.* 58: 239-249, 1997.
24. **Hamer, R. C., Enríquez, I. Godínez, D., Guerrero, A. L., Martínez, R. Z., Talamas, P., Vaca, S., García, C. M., and de la Garza, M.:** Adhesión of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine bucal epithelial-cells. *Proceedings of the HAP International Conference.* South Africa. pp. 51, 1999.

25. **Hamer-Barrera, R. C., Godínez-V. D., Enríquez-V. I., Vaca P. S., Martínez-Z. R., Tamamas-R. P., Suarez-G. F., and de la Garza, M.:** Preferential adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine buccal epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002. (En prensa).
26. **Huff, S.:** Interaction of N-terminal fragments of fibronectin with synthetic and recombinant D motifs from its binding protein on *Staphylococcus aureus* studied using fluorescence anisotropy. *J. Biol. Chem.* 269: 15563-15570, 1994.
27. **Jacques, M., Belanger, M., Roy, G. and Foiry, B.:** Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal epithelial cells and frozen lung sections. *Vet. Microbiol.* 27: 133-143, 1991.
28. **Jensen, T., Boye, M., Hagedorn, O., Rusing, H., Angen, O.:** *Actinobacillus pleuropneumoniae* osteomyelitis in pigs demonstrated by fluorescent in situ hybridization. *Vet. Pathol.* 36: 258-261, 1999.
29. **Kreis, T., and Vale, R.:** Guide Book to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins. USA. *Oxford University Press Inc.* pp. 1-110, 1993.
30. **Lesson, C.R., Lesson, T.:** Histología. *Ed. Interamericana*, 3ra. ed. México. pp. 153-170, 1981.
31. **Martínez-Zúñiga, R.:** Adhesión in vitro de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a fibrinógeno de cerdo. *Tesis de Maestría*, CINVESTAV-IPN. México, 1999.
32. **Mills, A.N. and Haaworth, S.G.:** Pattern of connective tissue development in swine pulmonary vasculature by immunolocalization. *J. Pathol.* 153: 171-176, 1987.

33. **Murray, R.K., Mayes, P., Granner, D., Rodwell, V.:** Bioquímica de Harper. *Ed. Manual moderno*. 14a. ed. México. pp. 829-867,1997.
34. **Negrete-Abascal, E., García, R.M., Reyes, M.E., Godínez, D., and de la Garza, M.:** Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and Apx toxins. *FEMS Microbiol Lett*. 191: 109-113,2000.
35. **Negrete, E., García-C. C., Tenorio, V., Godínez, D., Álvarez, J., Serrano, J., de la Garza, M.:** Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin, and immunoglobulin A. *Can. J. Vet. Res.* 58: 83-86, 1994.
36. **Negrete-Abascal, E., Reyes, M.E., García, R.M., Vaca, S., Girón, J.A., Andrade, A., García-González, O., and de la Garza, M.:** Flagella and motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *International Pasteurellaceae Society Conference*. Canadá. p. 37, 2002.
37. **Negrete, E., Tenorio, V., Guerrero, A.L., Garcia, R.M., Reyes, M.E., de la Garza, M.:** Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1, an antigen common to all the serotypes. *Can. J. Vet. Res.* 62: 183-190,1998.
38. **Nilsson, M., Frykberg, L., Flock, J., Pei, L., Linderberg, M., Guss, B.:** A fibrinogen binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 66: 2666-2673, 1998.
39. **Ofek, I. and Doyle, R.J.:** Bacterial adhesion to cells and tissues. USA. *Ed. Chapman and Hall*. pp. 1-53,1994.

40. **Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J., Hook, M.:** MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 85, 1994.
41. **Pattison, H.I., Howell, D.C., Elliott, J.:** A *Haemophilus-like* organism isolated from pig lung and associated pneumonic lesion. *J. Comp. Pathol.* 67: 320-329, 1997.
42. **Ramachandran, G.N. and Reddi, A.H.:** Biochemistry of collagen. *Plenum press.* New York. 1976.
43. **Rapp, V.J., Munson, R.S. and Ross, R.F.:** Outer membrane protein profiles of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 52: 414-420, 1986.
44. **Sakai, L. Y.:** The extracellular matrix. *Scientific American Science and Medicine.* pp. 58-67, 1995.
45. **Sottile, J.:** Five type 1 modules of fibronectin form a functional unit that binds to fibroblasts and *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 266: 12840-12843, 1991.
46. **Speziale, P., Raucci, G., Visai, L., Switalski, L.M., Timpl, R., Hook, M.:** Binding of collagen to *Staphylococcus aureus* Cowan 1. *J. Bacteriol.* 163: 77-81, 1986.
47. **Switalski, L.M., Speziale, P., Hook, M.:** Isolation and characterization of a putative collagen receptor from *Staphylococcus aureus* strain Cowan 1^{*}. *J. Biol. Chem.* 264: 21080-21086, 1989.
48. **Talay, S.R., Grammel, M., Chhatwal, O.:** Structure of a group C streptococcal protein that binds to fibrinogen, albumin and

immunoglobulin G via overlapping modules. *Biochem. J.* 315: 577-582, 1996.

49. **Tamin, A., Tarkkanen A.M., Korhonen T .K., Kuusela, p., Toivanen, P., and Skurnik, M.:** Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the *Yad A* protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* 10: 995-1011, 1993.
50. **Trust, T.J.,Doig. P., Emody, L., Kienle, Z., Wadstrom, T. and O'Toole P.:** High-affinity binding of the basement membrane proteins collagen type IV and laminin to the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 59: 4398-4404, 1991.
51. **Utrera, V., and C. Pijoan.:** Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from respiratory tracts. *Vet. Rec.* 128: 357-358, 1991.
52. **Van-Kuppevelt, T.H., Veerkamp,J.H., Timmermans,J.A.H.:** Immunoquantification of type I, III, IV and V collagen in small samples of human lung parenchyma. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 27: 775-782,1995.
53. **Westerlund, B. and Korhonen, T.K.** Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 9: 687-694, 1993.
54. **Woods, D. E.:** Role of fibronectin in the prevention of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to buccals cells. *J. Infect. Dis.* 143: 784-790, 1981.
55. **Zhang, Y., Tennent, J.M., Ingham, A., Beddome, G., Prideaux, C., and Michalski, W.P.:** Identification of type 4 frimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol. Leu.* 189: 15-18,2000.