



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

“Estudios a micro y nanoescala de la respuesta de *Bordetella pertussis* a condiciones del entorno”

Tesista: María Inés Villalba

Director/a: Dr. Osvaldo M. Yantorno

Codirector/a: Dra. María Elena Vela

Año: 2020

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA, FUE REALIZADO EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CINDEFI) Y EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FISICOQUIMICAS TEORICAS Y APLICADAS (INIFTA), CONICET, FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA, BAJO LA DIRECCION DEL DR. OSVALDO M. YANTORNO Y LA DRA. MARIA E. VELA.

PARTE DE LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS HAN SIDO ENVIADOS O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION:

Aceptados:

- Villalba MI, Stupar P, Chomicki W, Bertacchi M, Dietler G, Arnal L, Vela ME, Yantorno O, Kasas S. Nanomotion detection method for testing antibiotic resistance and susceptibility of slow-growing bacteria. *Small*. 2018, 14(4). doi: 10.1002/sml.201702671.

- Venturelli L, Kohler AC, Stupar P, Villalba MI, Kalauzi A, Radotic K, Bertacchi M, Dinarelli S, Girasole M, Pešić M, Banković J, Vela ME, Yantorno O, Willaert R, Dietler G, Longo G, Kasas S. A perspective view on the nanomotion detection of living organisms and its features. *J Mol Recognit*. 2020, 30:e2849. doi: 10.1002/jmr.2849.

A ser remitidos:

- Villalba MI, Venturelli L, Willaert R, Vela ME, Yantorno OM, Dietler G, Kasas S. Nanomotion spectroscopy as a new approach to characterize virulence phases of *Bordetella pertussis*. Revista: PNAS

Colaboraciones:

- Arnal L, Grunert T, Cattelan N, de Gouw D, Villalba MI, Serra DO, Mooi FR, Ehling-Schulz M, Yantorno OM. *Bordetella pertussis* Isolates from argentinean whooping cough patients display enhanced biofilm formation capacity compared to Tohama I reference strain. *Front Microbiol*. 2015, 6:1352. doi: 10.3389/fmicb.2015.01352.

- Cattelan N, Villalba MI, Parisi G, Arnal L, Serra DO, Aguilar M, Yantorno O. Outer membrane protein OmpQ of *Bordetella bronchiseptica* is required for mature biofilm formation. *Microbiology (Reading)*. 2016, 162(2):351-363. doi: 10.1099/mic.0.000224.

- Willaert RG, Vanden Boer P, Malovichko A, Alioscha-Perez M, Radotić K, Bartolić D, Kalauzi A, Villalba MI, Sanglard D, Dietler G, Sahli H, Kasas S. Single yeast cell nanomotions correlate with cellular activity. *Sci Adv*. 2020, 6(26):eaba3139. doi: 10.1126/sciadv.aba3139.

MI RECONOCIMIENTO

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT), por concederme la beca inicial y el financiamiento otorgado que permitió el desarrollo de esta investigación científica.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por concederme la beca de finalización de doctorado que posibilitaron el desarrollo de esta Tesis doctoral.

Al Gobierno Suizo por el financiamiento otorgado para la realización de estadías de cooperación.

Al Centro de Investigaciones y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) y al Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) que me permitieron utilizar sus instalaciones y equipamiento para la realización de los experimentos de esta tesis.

Al Laboratorio de Física de la Materia Viva de la Escuela Politécnica de Lausanne (EPFL), Suiza, por haberme brindado la posibilidad de llevar a cabo estadías de investigación en sus laboratorios.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo realizado en esta tesis fue posible gracias a un gran número de personas que me han enseñado, acompañado, ayudado y apoyado mucho durante el transcurso de este periodo, a nivel profesional como personal. Quiero agradecer especialmente:

A Osvaldo Yantorno, por darme la posibilidad de realizar este trabajo de tesis, transmitirme sus conocimientos en Bordetella, por la ayuda brindada y acompañarme durante esta etapa bajo su dirección.

A Maria E. Vela, por haberme enseñado y transmitido sus conocimientos en Microscopía de Fuerza Atómica; por su apoyo, su ayuda, sugerencias, predisposición continua y gran calidez durante toda esta etapa.

A Sandor Kasas, por darme la posibilidad de realizar parte del trabajo experimental en su laboratorio, por sus conocimientos transmitidos, amabilidad y constante interés. A Giovanni Dietler por haberme recibido en su laboratorio como si fuera una más de sus becarios y su buen trato.

A Laura Arnal por haberme enseñado y ayudado tanto los primeros años, de una forma desinteresada. Su aporte fue fundamental para el desarrollo de este trabajo de Tesis.

A Julio Figari por su gran asistencia técnica, pero mas que nada por su amistad, los mates, chistes y charlas.

A mis compañeros del CINDEFI, INIFTA y EPFL y amigos del laboratorio. Gracias por la ayuda, los momentos y experiencias compartidos, charlas, mates, reuniones, etc. Extiendo el agradecimiento toda la gente de cada instituto en general que me han brindado su compañía y ayuda.

A mis amigos que me apoyaron tanto en esta etapa. Quiero agradecer especialmente a mi “peña” de quienes estoy orgullosa de tenerlas siempre conmigo.

A mi familia por el apoyo, estar siempre y especialmente por el ejemplo de trabajo, constancia y esfuerzo.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I: Introducción general

I.1.1 Introducción	
I.1.1 Técnicas microscópicas.....	2
I.1.1.a Microscopía de Fuerza Atómica.....	3
I.1.2 Biosensores y análisis microbianos.....	6
I.1.3 <i>Bordetella pertussis</i>	9
I.1.3.a Ciclo de virulencia.....	9
I.1.3.b Biofilm de <i>B. pertussis</i>	13
I.1.4 Tos convulsa.....	14
I.1.4.a Resurgencia.....	17
I.2 Objetivos del trabajo de tesis.....	18
I.3 Bibliografía.....	20

CAPÍTULO II: Características morfológicas y nanomecánicas de *B. pertussis* en fase virulenta y avirulenta

II.1 Introducción	27
II.1.1 Estados de virulencia de <i>B. pertussis</i>	27
II.1.2 Microscopía de Fuerza Atómica.....	29
II.1.2.a Cantilevers	31
II.1.2.b Registro de datos	33
-Modo contacto e imágenes de altura	33
-Curvas de fuerza e Imágenes Fuerza-Volumen.....	34
-Imagen cuantitativa.....	36
-Espectroscopía de fuerzas de molécula individual	37
II.2 Objetivos.....	39
II.3 Materiales y métodos.....	40
II.3.1 Bacterias y condiciones de cultivo.....	40
II.3.2 Preparación de la muestra bacteriana para AFM.....	40

II.3.2.a Análisis del efecto de la fijación con glutaraldehído de células de <i>B. pertussis</i>	41
II.3.2.b Inmovilización de <i>B. pertussis</i> sobre vidrio y placas de Petri.....	42
II.3.3 Análisis de características morfológicas y propiedades nanomecánicas de bacterias individuales de <i>B. pertussis</i>	44
II.3.4 Espectroscopía de molécula individual: análisis de la expresión de virulencia	46
II.3.4.a Funcionalización del cantilever con anticuerpos.....	46
II.3.4.b Preparación de la muestra proteica: FHA purificada.....	46
II.3.4.c Preparación de la muestra bacteriana.....	47
II.3.4.d Análisis de la interacción proteína-anticuerpo.....	47
II.3.4.e Análisis de la interacción <i>B. pertussis</i> -anticuerpo.....	48
II.4 Resultados.....	49
II.4.1 Selección del protocolo de preparación de muestras bacterianas para el análisis por AFM	49
II.4.2 Empleo de AFM para el análisis morfológico de células de <i>B. pertussis</i> en fase virulenta y avirulenta	51
II.4.3 Análisis de la presencia de FHA como método de monitoreo del cambio de fase en <i>B. pertussis</i>	52
II.4.3.a Análisis de la especificidad del anticuerpo comercial y la interacción antígeno-anticuerpo: FHA - AntiFHA.	52
II.4.3.b Análisis de la presencia de FHA en la superficie celular de <i>B.pertussis</i>	54
II.4.4 Evaluación de la rigidez de cubierta celular de <i>B. pertussis</i> asociadas a la fase de virulencia	56
II.5 Discusión.....	57
II.6 Bibliografía.....	59

CAPÍTULO III: Análisis de la respuesta de *B. pertussis* a la presencia de antibióticos mediante el estudio de propiedades nanomecánicas

III.1 Introducción	64
III.2 Objetivos.....	66
III.3 Materiales y métodos.....	67
III.3.1 Bacterias y condiciones de cultivo.....	67
III.3.2 Ensayo de resistencia a antibióticos mediante el método convencional de dilución en medio de cultivo.....	67
III.3.3 Estudio del efecto de la exposición a antibióticos sobre las propiedades nanomecánicas de <i>B. pertussis</i> en bacterias individuales	69
III.3.4 Estudio de propiedades nanomecánicas y efectos de la exposición a	

antibióticos sobre bacterias grupadas.....	70
III.3.5 Análisis de viabilidad en bacterias expuestas a antibióticos	71
III.4 Resultados.....	72
III.4.1 Análisis de resistencia a antibióticos evaluada mediante el método convencional de dilución en medio de cultivo líquido.....	72
III.4.2 Evaluación de propiedades nanomecánicas de la cubierta celular de bacterias individuales de <i>B. pertussis</i> luego de la exposición a antibióticos.....	73
III.4.3 Análisis del efecto de antibióticos sobre la rigidez de bacterias en procesos de división.....	76
III.4.4 Análisis del efecto de antibióticos sobre propiedades morfológicas y nanomecánicas de bacterias en grupos celulares.....	79
III.4. 5 Análisis de viabilidad mediante tinción de fluorescencia	81
III.5 Discusión.....	82
III.6 Bibliografía.....	84

CAPÍTULO IV: Estudio de la respuesta de *B. pertussis* a distintas condiciones ambientales, definidas por la presencia de antibióticos y agentes de cambio de virulencia, evaluada mediante sensores de nanomovimientos

IV.1 Introducción.....	88
IV.1.1 Configuración del equipo sensor de nanomovimientos.....	89
IV.1.2 Principio del método.....	90
IV.2 Objetivos.....	93
IV.3 Materiales y métodos.....	94
IV.3.1 Bacterias y condiciones de cultivo.....	94
IV.3.2 <u>Sección A</u> : Análisis de respuesta a antimicrobianos y puesta a punto de la metodología	94
IV.3.2.a Controles y puesta a punto del equipo: alineamiento del láser y pureza del medio durante el registro de datos.....	95
IV.3.2.b Método convencional de determinación de concentraciones inhibitorias mínimas y concentraciones bactericidas mínimas.....	96
IV.3.2.c Proceso de funcionalización y adhesión de bacterias a la sonda.....	96
IV.3.2.d Automatización del equipo y adquisición de datos utilizando el nanosensor.....	97
IV.3.2.e Análisis de datos registrados con el nanosensor.....	99
IV.3.2.f Ensayo de resistencia a antibióticos mediante el uso de técnicas colorimétricas: Cloruro de tetrazolio (TTC).....	100
IV.3.3 <u>Sección B</u> : Análisis de la respuesta a agentes que inducen un cambio de fase de virulencia	102

IV.3.3.a Equipo nanosensor utilizado mediante ensayos de Espectroscopía de nanomovimiento.....	102
IV.3.3.b Preparación del cantilever.....	103
IV.3.3.c Desarrollo experimental y análisis de datos.....	104
IV.4 Resultados.....	105
IV.4.1 <u>Sección A</u> : <i>Puesta a punto del equipo. Adaptación al estudio y análisis de B. pertussis expuesta a entornos definidos por la presencia de antimicrobianos</i>	105
V.4.1.a Análisis de alineamiento del láser y cambios en la sensibilidad del equipo. Estudio del efecto de la pureza del líquido de la celda de análisis del nanosensor.	105
IV.4.1.b Análisis de sensibilidad a antibióticos de poblaciones de <i>B. pertussis</i> mediante sensores de nanomovimientos.....	107
IV.4.1.c Registro de oscilaciones del sensor con <i>B. pertussis</i> adheridas a su superficie a lo largo de 13 h en medio líquido SS	109
IV.4.1.d Análisis de la respuesta de <i>B. pertussis</i> a la presencia de macrólidos utilizando el equipo nanosensor de movimiento.....	111
IV.4.1.e Exposición a concentraciones variables de antibióticos: Test de sensibilidad evaluado por nanomovimientos	113
IV.4.2 <u>Sección B</u> : <i>Evaluación de células de B. pertussis en fases virulenta, avirulenta y en ambientes moduladores mediante Espectroscopía de nanomovimiento</i>	115
IV.5 Discusión.....	124
IV.6 Bibliografía.....	127

CAPÍTULO V: Análisis de la adhesión bacteriana y formación de biofilm de *B. pertussis* expuestos a fuerzas de corte

V.1 Introducción	131
V.2 Objetivos	135
V.3 Materiales y métodos	136
V.3.1 Microorganismos y condiciones de cultivo	136
V.3.1.a Cultivos planctónicos	136
V.3.1.b Cultivos sésiles	137
V.3.2 Microscopías.....	139
V.3.2.a Microscopía de Fluorescencia y análisis de imágenes	139
V.3.2.b Microscopía de barrido láser confocal y análisis de imágenes	140
V.3.3 Análisis desarrollados	140
V.3.3.a Análisis estructural de biofilms maduros crecidos en sistema semicontinuo con recambio de nutrientes (semi-batch).....	140
V.3.3.b Análisis del efecto del <i>shear stress</i> en la adhesión de <i>B. pertussis</i>	141
V.3.3.c Análisis del efecto del <i>shear stress</i> en el desarrollo y estructura de biofilms de <i>B. pertussis</i>	144

V.4 Resultados	145
V.4.1 Análisis estructural de biofilms maduros formados en sistemas de cultivo semi-batch por la cepa de referencia Bp Tohama I y el aislado clínico Bp 2723	145
V.4.2 Análisis de la adhesión a superficies de <i>B. pertussis</i> bajo los efectos del <i>shear stress</i>	147
V.4.3 Análisis de la formación de biofilms bajo los efectos de <i>shear stress</i> fisiológico de la cepa de referencia Bp Tohama I vs el aislado clínico Bp 2723	149
V.5 Discusión	151
V.6 Bibliografía.....	155

CAPÍTULO VI. Conclusiones generales y perspectivas 159

ANEXO

Anexo capítulo II.....	164
Anexo capítulo III.....	165
Anexo capítulo IV.....	166
-Bibliografía.....	173

CAPÍTULO I

Introducción General

I.1 INTRODUCCIÓN

I.1.1 Técnicas microscópicas

El desarrollo tecnológico ha permitido disponer actualmente de una amplia gama de técnicas microscópicas fundamentales en el avance científico. Esta metodología de estudio puede clasificarse de acuerdo al método de obtención de imágenes en tres grandes grupos (Figura 1). El primero abarca las **microscopías que utilizan la incidencia de luz** para producir las imágenes de la muestra, e incluye aquellas que usan luz visible o ultravioleta y logran una magnificación de hasta 1000x (1 μm). Los microscopios comúnmente utilizados que forman parte de este grupo incluyen microscopios de campo claro, campo oscuro, contraste de fase, contraste de interferencia diferencial, fluorescencia y confocal. Por ejemplo, en microbiología, luego de aislarse un microorganismo patógeno, el mismo puede ser estudiado con un microscopio óptico, donde el contraste se puede mejorar con varias tinciones inespecíficas o específicas como la tinción de Gram. Como la mayoría de los patógenos son muy pequeños, el microscopio óptico no solo debe presentar grandes aumentos, sino también objetivos de inmersión en aceite para mejorar los exámenes morfológicos. La microscopía de fluorescencia permite lograr una especificidad aún mayor ya sea inespecífica, (por ejemplo, la tinción típica mediante IP/SYTO9 utilizada para la identificación de bacterias vivas-muertas), o altamente específica con inmunofluorescencia acoplada a anticuerpos y FISH (hibridación in situ de fluorescencia). El segundo grupo de microscopías utilizan haces de electrones enfocados mediante campos magnéticos para producir la imagen. De esta manera, la **microscopía electrónica**, logra un aumento mucho mayor que la microscopía óptica. Las dos formas más comunes son el microscopio electrónico de transmisión (TEM: del inglés *transmission electron microscope*) y el microscopio electrónico de barrido (SEM: del inglés *scanning electron microscope*), y tienen una magnificación de 20-100000x o mayor, permitiendo resolución atómica (0,5 - 20 nm). Este tipo de microscopías provee detalles ultraestructurales de células, virus, bacterias, parásitos y hongos, así como estudios morfológicos de la superficie y empleando determinadas estrategias se podrían obtener imágenes tridimensionales. Finalmente, el tercer grupo está constituido por **las microscopías de barrido por sonda** (SPM del inglés: *scanning probe microscopy*), las

cuales obtienen imágenes a través de la retroalimentación de sondas muy finas que interactúan con la muestra y permite una magnificación de 100-100000000x o más, permitiendo llegar a escalas subnanométricas (1 Å). En este tipo de microscopios se incluye el microscopio de efecto túnel (STM del inglés: *scanning tunneling microscope*) y el microscopio de fuerza atómica (AFM de inglés: *atomic force microscopy*).

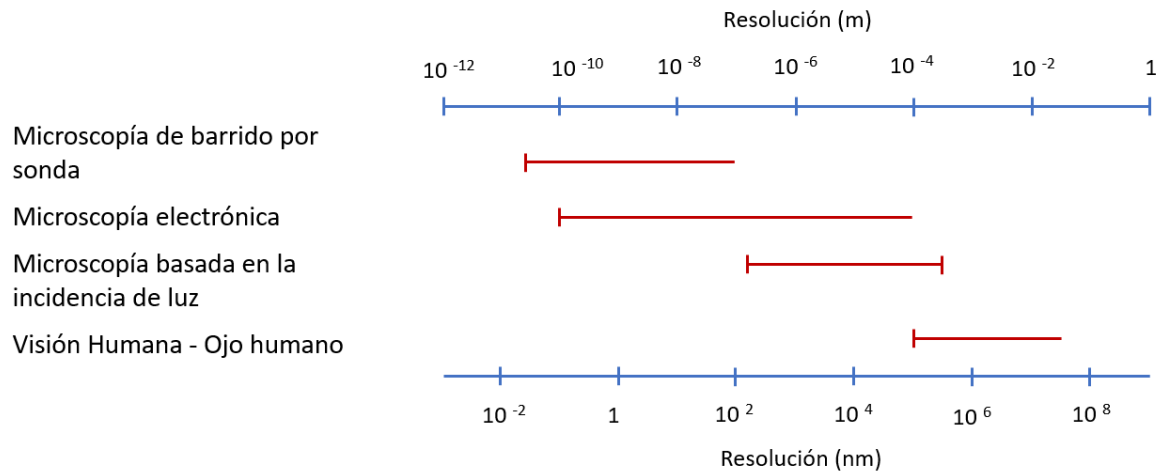


Figura 1. Rango de resolución para los tres grupos de microscopías mencionados aquí y la visión humana (figura adaptada de: <https://www.slideserve.com/porter/microscopic-techniques>).

I.1.1.a Microscopía de Fuerza Atómica

La AFM es una herramienta experimental comprendida dentro de las SPM, que surgió cuando Binnig y colaboradores (1986) estudiaron superficies aislantes a través del análisis de la fuerza de interacción entre una punta sensora sostenida por un cantilever y la muestra, mediante el registro de la deflexión del mismo. A partir de entonces la técnica logró convertirse en una herramienta multipropósito que permite investigar muestras de naturaleza muy variable con resolución a escala nanométrica y bajo condiciones ambientales controladas en aire o en medio líquido. Esta técnica ha dado lugar al desarrollo de estudios en ambientes que se aproximan a los fisiológicos y a distintas temperaturas. Además, no necesita de tinción o fijación de la muestra ni que esta sea conductora de electrones. Si bien el AFM suele estar acoplado a un microscopio óptico,

cámara o lupa como equipamiento accesorio, no requiere lentes ni una fuente de luz que iluminen la superficie a analizar. Estas características representan una gran ventaja en el estudio de muestras orgánicas y es capaz de analizar desde células vivas hasta moléculas simples (proteínas o ADN) (Xiao & Dufrêne, 2016), constituyendo así una herramienta poderosa para explorar las propiedades físicas y biológicas de microorganismos en un nivel de detalle sin precedentes y ofreciendo una nueva exploración a nanoescala en tres dimensiones en áreas de la salud.

El AFM provee a la microbiología, como a muchas áreas científicas, una gran variedad de análisis, entre los cuales se destaca el estudio de la morfología celular obteniendo imágenes en tres dimensiones y las propiedades nanomecánicas a través de la medida del módulo de elasticidad de la envoltura celular, pudiendo establecer la relación de las células con el entorno mediante el examen de paredes celulares, lípidos y proteínas de membrana en ambientes fisiológicos o expuestas a diversas condiciones estresantes (Figura 2). Además, la posibilidad de adquirir las imágenes en tiempo real permite seguir el crecimiento microbiano y monitorear superficies e interacción con diversas sustancias que afectan a la célula (Arnoldi *et al.*, 2000; Benoit *et al.*, 2000; Engel y Muller, 2000; Touhami *et al.*, 2003; Chtcheglova *et al.*, 2007; Kuznetsova *et al.*, 2007; Mortensen *et al.*, 2009; Martínez-Martin *et al.*, 2011; Rico *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015).

El contacto de un microorganismo con factores potencialmente líticos como biocidas y algunos antibióticos provoca daños en la bacteria que pueden dar lugar a cambios en las propiedades nanomecánicas celulares, modificando la turgencia celular y la elasticidad de las capas externas. Investigaciones recientes han demostrado el gran poder del AFM en este tipo de análisis microbiológico, arrojando luz sobre el modo de acción de los antibióticos (Eaton *et al.*, 2008; Perry *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2010; Formosa *et al.*, 2012; Longo *et al.*, 2012, 2013; Pogoda *et al.*, 2017).

El AFM también es ampliamente utilizado para el reconocimiento biomolecular a nivel de la superficie celular, simultáneamente con la localización de sitios de unión específico y cuantificación de la fuerza de los enlaces receptor-ligando (Florin *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994; Hinterdorfer *et al.*, 1996).

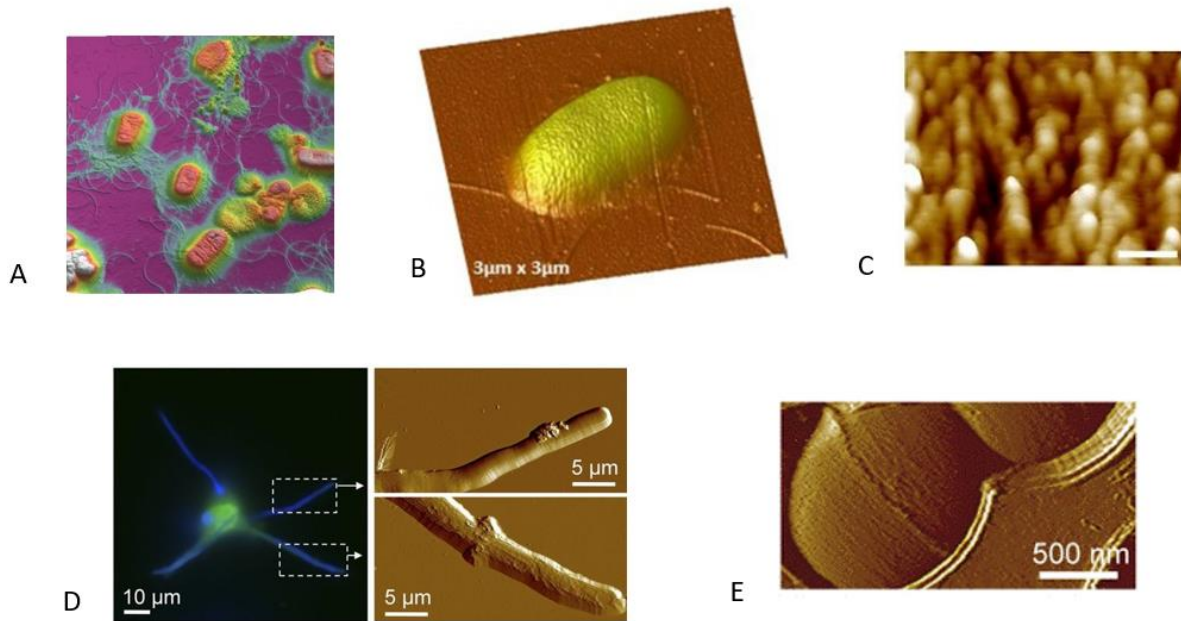


Figura 2. (A) Imagen topográfica de *E. coli* K-12 obtenida por AFM. Flagelos y fimbrias de la pared celular bacteriana son claramente visibles (Imagen tomada de Oh & Hinterdorfer, 2019) (B) Características morfológicas de una bacteria individual de *E. coli* en una superficie de mica registrada mediante AFM, escala de altura: 300 nm (extraída de Gammoudi *et al.*, 2016). (C) Organización estructural de la pared de peptidoglicanos de *Bacillus subtilis* en fase estacionaria, se registra una organización en forma de “cableado” densamente empaquetados orientados de manera paralela. El ancho promedio de estos “cables” es de $29,11 \pm 5,79$ nm; barra de escala: 100 nm (imagen tomada de Li *et al.*, 2018). (D) Imagen de fluorescencia e imágenes de AFM de un macrófago (en verde) incubado durante 3 h con células de *Candida albicans* (en azul). Las dos imágenes de AFM son vistas ampliadas de las áreas discontinuas que se muestran en la imagen de fluorescencia. Revelan importantes diferencias estructurales entre las dos hifas, una internalizada (abajo) y la otra externalizada (arriba) (extraída de El-Kirat-Chatel & Dufrêne 2012). (E) Imágenes de alta resolución adquiridas con AFM de células de *Lactobacillus plantarum* donde se capturan detalles estructurales de la superficie microbiana (figura adaptada de Andre *et al.*, 2010).

En un trabajo previo de nuestro grupo de trabajo, se demostró la relación de la virulencia de *Bordetella pertussis* con la rigidez de membrana, mediante el análisis de la elasticidad de la cubierta celular respecto a una adhesina esencial expresada en la etapa virulenta, la adhesina hemaglutinina filamentosa (FHA, del inglés *filamentous hemagglutinin*) (Figura 3). Los valores más rígidos de módulo de Young encontrados en bacterias de la cepa *B. pertussis* Tohama I se asociaron a la presencia de la proteína FHA en la superficie bacteriana. También se determinó que la proteína FHA parecería estar organizada en nanodominios en lugar de encontrarse homogéneamente distribuida en la superficie celular (Arnal *et al.*, 2012). Esta hipótesis se confirmó posteriormente a través de la funcionalización de las puntas sensoras del AFM con el anticuerpo específico de FHA y realizando experimentos de reconocimiento molecular en la superficie de la bacteria. A su vez, se pudo monitorear en el tiempo el incremento de adhesinas mediante interacción

con el cantilever funcionalizado con el anticuerpo específico, interpretado como un posible reclutamiento inducido por un efecto mecánico (Arnal *et al.*, 2015). Además, este tipo de análisis permite estudiar las fuerzas de adhesión y la evaluación de polímeros de la superficie bacteriana necesarios en la formación de biofilm, dando lugar al estudio de la habilidad de la bacteria para formar este tipo de comunidades (Wang *et al.*, 2017; Berne *et al.*, 2018). De este modo, el estudio de propiedades nanomecánicas de la superficie bacteriana mediante AFM contribuye a monitorear procesos importantes de virulencia y viabilidad de los microorganismos.

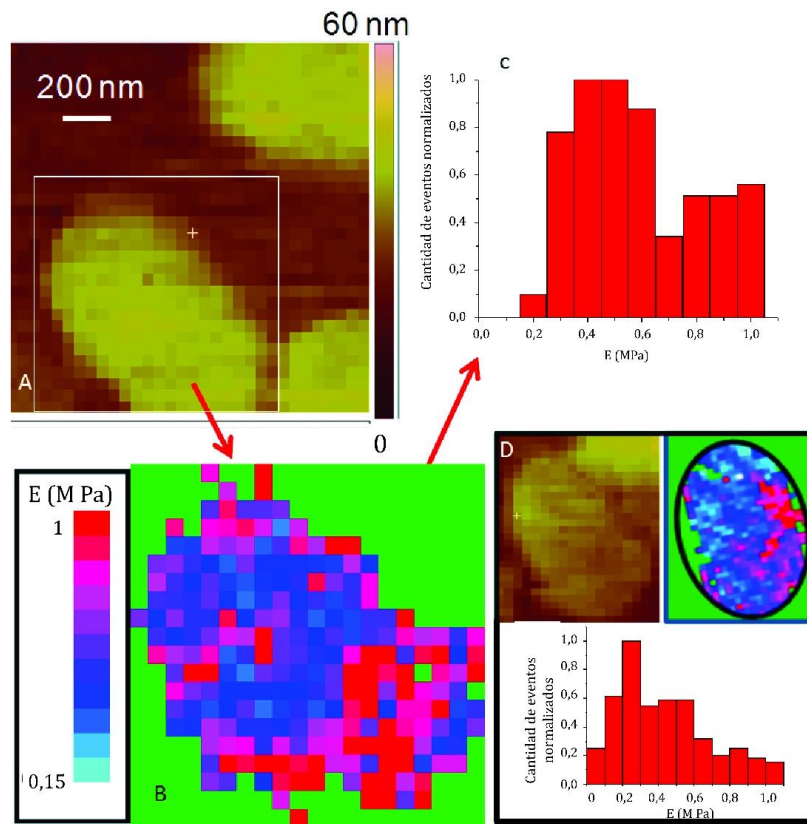


Figura 3. Imagen de FV realizada sobre células de Bp Tohama I (A), el mapa de elasticidad correspondiente a la bacteria recuadrada (B) donde se puede observar cómo los dominios rígidos no se encuentran homogéneamente distribuidos. En la figura (C) se observa el histograma de módulos de Young asociado a la célula analizada. En la figura (D) se observa el mismo análisis para una célula diferente de Bp Tohamal (Figura adaptada de Arnal *et al.*, 2012).

I.1.2 Biosensores y análisis microbianos

Un equipo compuesto de un elemento físico (sensor o transductor) que es capaz de transformar una señal biológica en una señal eléctrica medible, es llamado biosensor. En los últimos años, el desarrollo y demanda de biosensores se ha

incrementado ampliamente en investigación biomédica, biotecnología, salud, desarrollo de drogas y diagnóstico clínica. La detección de movimientos de oscilación de un cantilever de AFM mediante la incidencia de un láser, puede ser usada como una herramienta biosensora. Considerando que el componente principal de un biosensor mecánico tiene un tamaño a nivel de la nanoescala en al menos una de sus dimensiones, a este sistema se lo refiere como un biosensor nanomecánico.

El grupo del Prof. Dietler de la EPFL (École Polytechnique Fédérale de Lausanne) ha reportado un dispositivo basado en sensores de nanomovimiento, que puede ser usado para caracterizar la actividad metabólica de células vivas en pocos minutos. Dicha actividad proviene de células vivas adheridas a un cantilever, que mediante su actividad metabólica provocan fluctuaciones del mismo a escala nanométrica las cuales pueden ser detectadas mediante un arreglo instrumental procedente de un AFM convencional. De esta manera puede llevarse a cabo un análisis de la respuesta dinámica de células frente a la exposición a diversos agentes en tiempo real (Aghayee *et al.*, 2013). La técnica es sumamente sensible y puede detectar movimientos a escala sub-Amstrong en condiciones fisiológicas.

Una de las aplicaciones de este nanosensor es el estudio de microorganismos patógenos frente a distintas condiciones ambientales. Luego de identificar el agente causal de una infección se continúa en general con la determinación de su susceptibilidad a antibióticos, procedimiento que involucra procesos lentos y tediosos. Esta etapa es clave para la selección del antibiótico a emplear en el tratamiento y establecer la concentración inhibitoria mínima (CIM) a utilizar en el tratamiento del paciente. En el manejo de las infecciones, es necesario mantener actualizadas las estrategias terapéuticas mediante el monitoreo de la evolución de la resistencia a antibióticos y, a su vez, utilizar herramientas que pueden detectar y caracterizar rápidamente la respuesta bacteriana a los antibióticos. La inadecuada prescripción y el uso intensivo de antibióticos han contribuido a la selección de bacterias resistentes a un ritmo muy rápido. Este equipamiento nanosensor ha sido utilizado en el estudio de susceptibilidad a antibióticos permitiendo determinar en tiempos muy breves, de apenas minutos, las concentraciones inhibitorias mínimas y bactericidas de ampicilina, kanamicina, ciprofloxacina y caspofungina, para distintos tipos de organismos de crecimiento rápido, como *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (Longo *et al.*, 2013; Kasas *et al.*, 2015) (Figura 4A).

A su vez, la exposición de *E. coli* a diversas concentraciones de glucosa ha permitido asociar las fluctuaciones registradas por el biosensor con cambios en la actividad metabólica bacteriana (Figura 4B) (Longo *et al.*, 2013). Incluso, se ha demostrado que este innovador sensor nanomecánico puede llegar a detectar fluctuaciones tan pequeñas como las producidas por cambios conformacionales en proteínas (Ruggeri *et al.*, 2016). Este biosensor podría ser de suma importancia por ejemplo en el estudio de bacterias en diferentes estados de virulencia y sus respectivos cambios en la actividad metabólicas y expresión génica. El análisis de la variación en la virulencia es fundamental en el estudio y comprensión de infecciones bacterianas, resistencia a antibióticos, persistencia en el hospedador y transmisión de la bacteria.

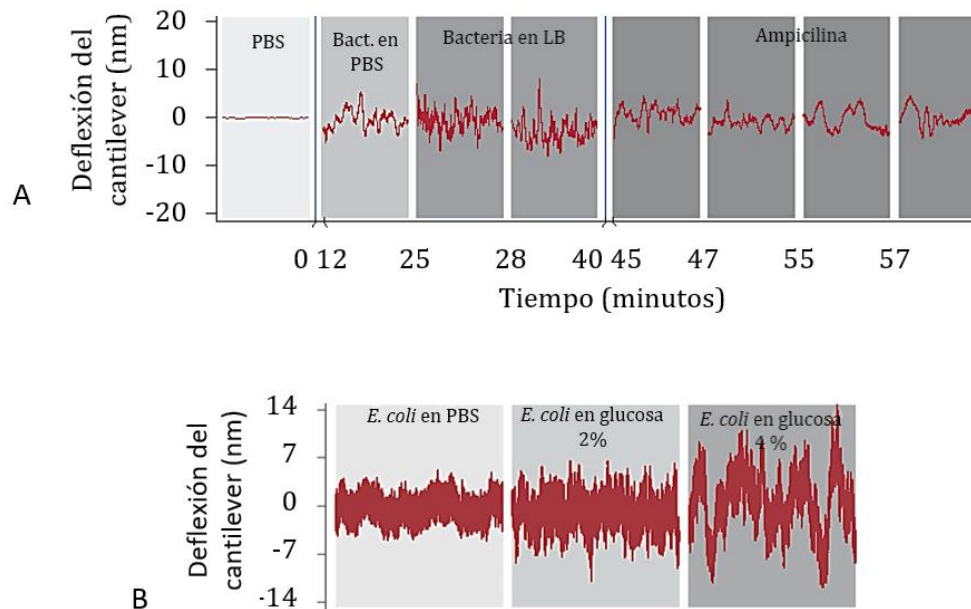


Figura 4. (A) Deflexión del nanosensor registrada durante la exposición de *E. coli* a PBS, medio LB y ampicilina. Aquí puede observarse como disminuye el movimiento del nanosensor registrado durante la exposición a antibiótico. (B) Deflexión registrada del nanosensor durante la exposición de *E. coli* a diversas concentraciones de glucosa. Un incremento en la concentración de glucosa es asociado con un incremento en el movimiento del sensor. Figuras tomadas de Longo *et al.*, 2013.

Teniendo en cuenta que la tasa de crecimiento microbiano está asociada con la actividad metabólica del organismo en cuestión, resulta de gran interés probar si el nanosensor es capaz de detectar movimientos asociados a la actividad metabólica de bacterias pequeñas de crecimiento lento y a partir de estos resultados extender el uso del sistema de nanodetección a distintas aplicaciones. *B. pertussis* es capaz de adherirse a

diversas superficies abióticas como polipropileno y vidrio, donde muestra una velocidad de crecimiento específica (μ) de $0,03 \text{ h}^{-1}$ (Serra *et al.*, 2008), la cual es muy baja cuando se la compara con otros tipos bacterianos, como *E. coli* (MG1655) que presenta un valor de $1,09 \text{ h}^{-1}$ creciendo en superficies de polietileno-tereftalato (PET) (Wang *et al.*, 2015). Son muchos los trabajos realizados sobre el efecto de antibióticos o agentes causantes de un cambio de virulencia en microorganismos, (Scarlato *et al.*, 1991; Scaglione *et al.*, 1994; Craig-Mylius *et al.*, 2000; Seydlova *et al.*, 2017; Lesne *et al.*, 2018); sin embargo, los cambios dinámicos inducidos por los mismos en los patrones de crecimiento microbiano en *B. pertussis* no han sido cuantificados hasta el momento.

I.1.3 BORDETELLA PERTUSSIS

B. pertussis es una bacteria gram-negativa, pequeña ($0,8 \mu\text{m}$ por $0,4 \mu\text{m}$ aproximadamente), aerobia estricta y no productora de esporas, que fue descrita por Bordet y Gengou en el año 1906. Recientemente ha sido demostrado que presenta estructuras similares a flagelos que le confieren movilidad (Hoffman *et al.*, 2019) (Figura 5). El único hospedador conocido de esta bacteria es el ser humano, no conociéndose al presente ningún reservorio zoonótico. Este organismo es el agente causal de la tos convulsa o pertussis, una enfermedad respiratoria aguda altamente contagiosa que afecta principalmente recién nacidos y niños menores de 6 meses de edad.



Figura 5. Ilustración tridimensional (3D) de bacterias *B. pertussis* generada en base a imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM). (Fuente: CDC PHIL: CDC / Sarah Bailey Cutchin. Disponible en: <https://phil.cdc.gov>).

I.1.3.a Ciclo de virulencia

B. pertussis posee un sistema encargado del control de su virulencia, codificado por el locus *bvgAS* (del inglés *Bordetella virulence gene activator/sensor*). El sistema BvgAS es a menudo considerado un "reóstato" que regula el ciclo de infección al permitir la supervivencia, persistencia y difusión de este microorganismo en el tracto respiratorio. Este sistema de traducción de señales posee dos componentes que utilizan un mecanismo de señalización de fosfotransferencia. BvgAS está compuesto por un regulador transcripcional BvgA de 23 kDa, que es un regulador de respuesta de unión a ADN (Boucher & Stibitz, 1995), y por un sensor BvgS que es un sensor transmembrana tipo quinasa de 135 kDa que contiene un dominio periplásmico, una región linker, y los dominios: transmisor, receptor y de fosfotransferencia a histidina (Stibitz & Yang, 1991). En respuesta a estímulos del entorno, el sensor quinasa sufre un cambio conformacional y transmite la señal generando la autofosforilación dependiente de ATP del mismo. El BvgS fosforilado activa BvgA mediante la transferencia de su fosfato. El BvgA ~ P activado, se une a secuencias promotoras que actúan en *cis* para activar la transcripción de genes regulados por *bvgAS*: genes "vag" (del inglés *virulence activated genes* o genes activados en virulencia). A su vez, una clase adicional de genes, denominada "vrg" (del inglés *virulence repressed genes*), es reprimida por los productos del locus *bvgAS* (Akerley *et al.*, 1992, 1995). La represión de estos genes está mediada por una proteína citoplasmática de 32 kDa llamada BvgR (Merkel & Stibitz, 1995). El gen que codifica para BvgR se encuentra inmediatamente aguas abajo del locus *bvgAS* y también es activado por BvgA (Merkel *et al.*, 2003). Cuando BvgAS está totalmente activo, la fase del crecimiento de *B. pertussis* se conoce como la "fase Bvg+" o "fase virulenta" y se asocia con la expresión de toxinas y adhesinas necesarias para la virulencia.

Cuando *B. pertussis* se cultiva en presencia de cantidades milimolares de iones sulfato (>40 mM MgSO₄), ácido nicotínico 10 mM o a temperaturas menores a 25 °C la fosforilación de BvgA por el sensor quinasa es suprimida; como resultado, BvgA ~ P no se forma y BvgR no se activa (Merkel *et al.*, 2003). Consecuentemente, en este estado BvgAS se encuentra inactivo, es decir, no puede llevarse a cabo la transcripción de genes *vags*. Los genes *vrgs* logran expresarse y las bacterias se encuentran en una "fase Bvg-" o "fase avirulenta".

Además de las fases de virulencia (Bvg+) y avirulencia (Bvg-), cuando el BvgAS se encuentra parcialmente activo, se ha identificado una "fase intermedia" o "fase Bvgi". Bvgi

se caracteriza por la ausencia de fenotipos reprimidos por *bvg* debido a la falta de expresión de genes *vrg*, con la expresión de algunos *vags* (p. ej., FHA) y la expresión mínima de genes que codifican la toxina adenilato ciclasa (Cya) y toxina pertussis (PT) (Deora *et al.*, 2001). Esta fase expresa una proteína característica en *B. pertussis* que es la denominada BipA, la cual cumple el rol de adhesina (Stockbauer *et al.*, 2001).

Los genes *vags* se han categorizado en tres clases temporales; genes tempranos, intermedios y tardíos. Los primeros (tempranos o clase II) incluyen aquellos genes que codifican a las adhesinas FHA y fimbrias (Fim) y son los que se activan rápidamente en respuesta a bajas concentraciones de BvgA~P. Curiosamente, el sistema BvgAS está autorregulado, y el locus BvgAS se clasifica como un gen temprano de clase II (Cummings *et al.*, 2006). Los genes tardíos (o de clase I) son aquellos que se activan 2–4 h después de la activación del locus BvgAS, incluye los que codifican toxinas: Cya y PT. Los genes expresados aproximadamente 1 h después la activación del locus BvgAS pertenecen a la clase de genes intermedios, entre ellos los que codifican para la proteína Pertactina (PRN) (Scarlato *et al.*, 1991). Los genes de clase III son expresados en la fase Bvgi, específicamente el gen *bipA* que codifica para una proteína la cual ha sido sugerida como un factor importante para etapas de colonización temprana de las vías respiratorias. Y finalmente los genes conocidos como *vrgs* (reprimidos en virulencia) expresados en la fase Bvg-, son los clasificados como clase IV (Figura 6).

La transmisión de *B. pertussis* se lleva a cabo principalmente mediante aerosoles (microgotas de saliva) por contacto directo desde un individuo infectado. La vía de colonización es a través del tracto respiratorio, donde se inicia la infección mediante la unión de las bacterias a los cilios de las células epiteliales. Luego de la adhesión se produce una rápida multiplicación de las bacterias en las membranas mucosas de las vías respiratorias, pero en teoría desde aquí no hay más diseminación de la infección, es decir no ocurre una bacteriemia (Finger *et al.*, 1996). En la primera etapa de colonización del tracto respiratorio, la acción sinérgica de dos de los factores de virulencia más importantes, la PT y FHA, afectan la adherencia de *B. pertussis* a los cilios, cada uno de los cuales actúa como un puente bivalente entre la bacteria y el receptor ciliar (Figura 7).

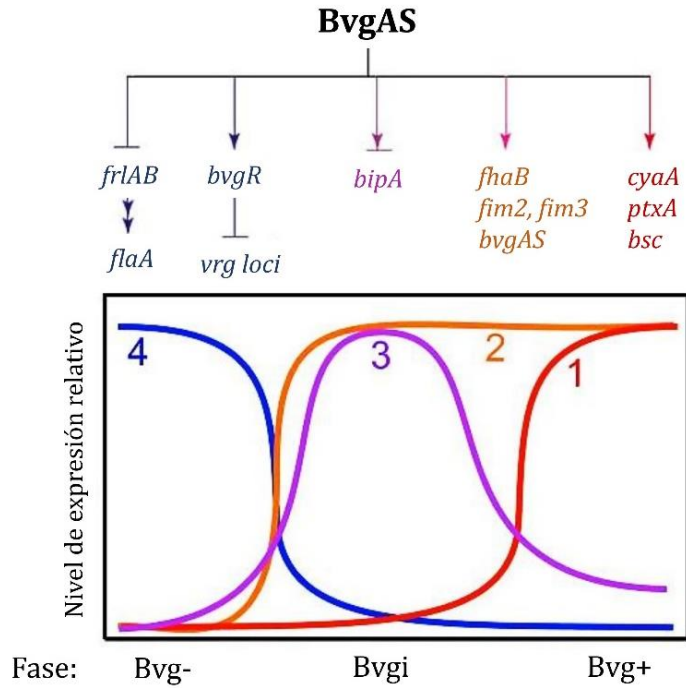


Figura 6. Variación entre las fases de virulencia de *B. pertussis*. La diferencia entre las fases Bvg +, Bvg- y Bvgi ha sido demostrada *in vitro* en condiciones estables. La fase Bvg+ se caracteriza por la expresión máxima de genes codificantes de adhesinas (genes de clase 2) y toxinas (genes de clase 1) y mínima expresión de genes de clase 3 y 4. La fase Bvg- se caracteriza por la máxima expresión de genes de clase 4 y mínima de genes de clase 1, 2, y 3. Y finalmente la fase Bvgi se caracteriza por la expresión máxima de genes de clase 1 y 4, y expresión mínima de genes de clase 2 y 3. El único gen que forma parte del grupo 3 es el *bipA* característico de la fase Bvgi. F. Imagen tomada de Cotter & Jones, 2003.

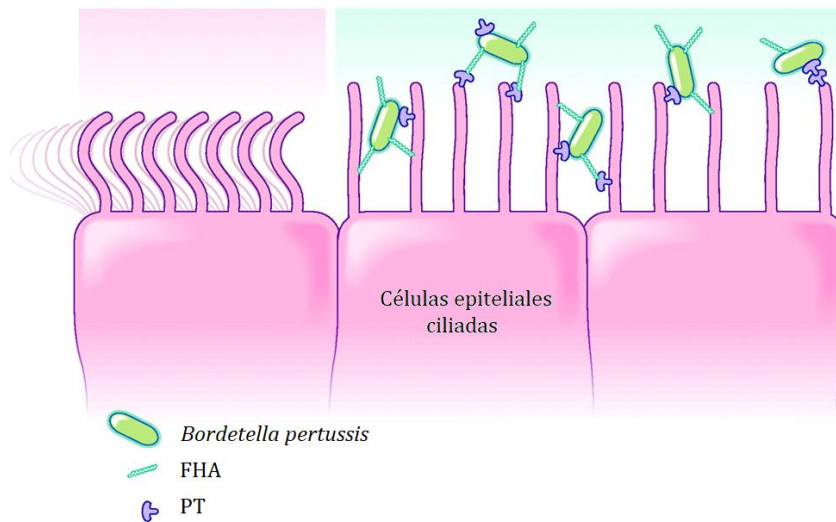


Figura 7. *B. pertussis* se adhiere fuertemente a las células ciliadas con la acción combinada de FHA, PT y otras adhesinas (como: Fimbrias y pertactina). Foto: Lianne Friesen y Nicholas Woolridge (Tozzi *et al.*, 2005)

I.1.3.b Biofilm de *B. pertussis*

El mecanismo por el cual *B. pertussis* persiste en humanos no está bien caracterizado. Si bien se ha sostenido la vida de este microorganismo en forma intracelular, la supervivencia y la persistencia de esta bacteria se puede asociar con la formación de biofilms. Una de las definiciones más aceptadas y utilizada de este concepto es la que describe al biofilm como una comunidad microbiana, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente *a un substrato o interfase o entre sí, encerradas o inmersas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas mismas u otras poblaciones producen y que expresan un fenotipo propio* (células sésiles) (Costerton, 2002; Donlan & Costerton, 2002; Hall-Stoodley *et al.*, 2012; Høiby, 2017).

Utilizando varios modelos in vitro, el modelo de infección en vías respiratorias de ratón y múltiples técnicas de imagen, microscópicas y macroscópicas, se ha comprobado que *B. pertussis* puede desarrollarse bajo esta forma de crecimiento tanto sobre superficies abióticas como en tracto respiratorio de ratones. *B. pertussis* posee la capacidad de formar biofilms bacterianos en superficies abióticas bajo condiciones estáticas o de flujo de medio de cultivo (Figura 8) (Mishra *et al.*, 2005; Sloan *et al.*, 2007; Serra *et al.*, 2011; Sugisaki *et al.*, 2013). También se demostró que *B. pertussis* forma biofilms adheridos a superficies bióticas: nariz y tráquea en infecciones experimentales utilizando ratones, embebidos en la matriz compuesta específicamente de ADNe (ácido desoxirribonucleico extracelular), la proteína FHA y el polisacárido Bps (de su sigla en inglés: *Bordetella polysaccharide*) (Conover *et al.*, 2010 y 2011; Serra *et al.*, 2011; Dorji *et al.*, 2018).

Estudios recientes de nuestro laboratorio sobre las capacidades de formación de biofilm de *B. pertussis* utilizando aislados clínicos actualmente en circulación de Argentina y Estados Unidos, (países con diferentes programas de vacunación), muestran que todos los aislados clínicos forman biofilms a niveles más elevados de biomasa en comparación con la cepa de referencia (Cattelan *et al.*, 2017). Esta mayor capacidad de formación de biofilm podría estar asociada a una adaptación bacteriana dirigida a favorecer la persistencia de esta especie en su hospedador bajo esta forma de vida.

El estudio de las comunidades bacterianas, en la mayoría de los microorganismos tradicionalmente se ha centrado en el entorno químico-molecular pero los análisis considerando el mencionado ambiente mecánico son sumamente necesarios. Se ha

demostrado en otras especies bacterianas los efectos de la presencia de esfuerzos de corte sobre los biofilms (Otto, 2014; Kim *et al.*, 2016; Thomen *et al.*, 2017). Si bien el efecto de las fuerzas de corte sobre el desarrollo del biofilm permanece bastante confuso, se conoce que afecta varios procesos esenciales de la naturaleza como el estrés mecánico, el transporte de nutrientes o la dispersión bacteriana, dificultándose el estudio por separado de cada acción. Se han reportado trabajos sobre los efectos del *shear stress* en la regulación del *quorum sensing* (Kirisits *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2016), cambios morfológicos (Alpkvist *et al.*, 2007; Lecuyer *et al.*, 2011; Aggarwal *et al.*, 2012; Grant *et al.*, 2014; Thomen *et al.*, 2017), modificación en la velocidad de crecimiento (Mbaye *et al.*, 2013; Otto, 2014), cambios en el metabolismo y alteraciones viscoelásticas (Liu & Tay, 2001; Mathias *et al.*, 2009; Galy *et al.*, 2012) o variación en la producción de la matriz extracelular y posiblemente cambios en la expresión génica (Nickerson *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2011); con lo cual estudiar la capacidad de formación de biofilm en condiciones similares a las que podrían encontrar estos organismos en tracto respiratorio resulta de sumo interés.

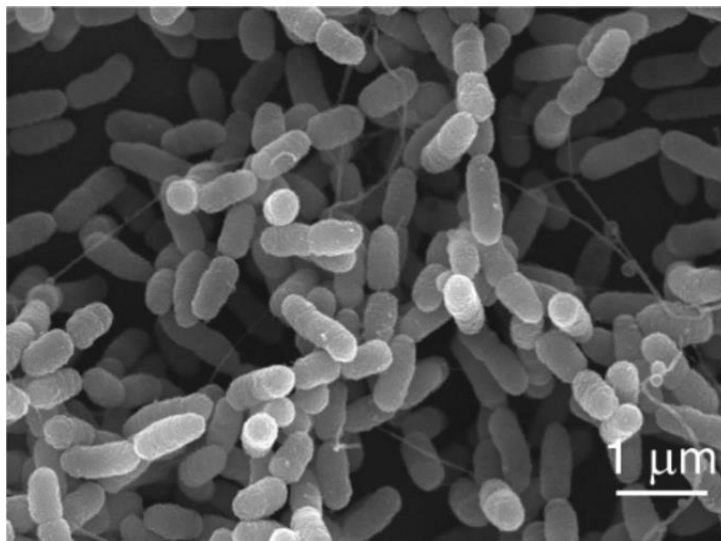


Figura 8. Biofilms de *B. pertussis* formados sobre cubreobjetos adquiridas mediante SEM (fuente: Sugisaki *et al.*, 2013)

I.1.4 Tos convulsa

La tos convulsa, tos ferina o pertussis es una enfermedad del tracto respiratorio altamente contagiosa que ocasiona tos violenta e incontrolable, dificultando la

respiración y que a menudo genera un sonido "convulsivo" profundo cuando la persona trata de inspirar. Se propaga fácilmente de una persona a otra, principalmente a través de microgotas producidas al toser o estornudar y se estima que por cada caso primario en una población susceptible se derivan entre 12 a 17 casos secundarios (Cherry & Harriman, 2012). La susceptibilidad por contacto doméstico varía entre el 70 al 100%. Por lo tanto, la infección en adolescentes y adultos es una fuente importante de contagio a niños no vacunados o parcialmente inmunizados (Nieves & Heininger, 2016). Típicamente se observa en recién nacidos y niños pequeños no inmunizados, (asociado principalmente con gran morbilidad y riesgo de mortalidad), y con menos frecuencia en adolescentes y adultos, donde suele presentarse en forma inespecífica (Mattoo & Cherry 2005; Nieves *et al.*, 2016). Pertussis dura entre 6 a 12 semanas, pero los síntomas clínicos se desarrollan después de un período de incubación inicial de 7 a 10 días, aunque a veces puede llegar a pasar hasta 3 semanas antes de que aparezcan los mismos (Kline *et al.*, 2013).

El tratamiento, que contribuye al control de la transmisión de la enfermedad, se basa en la administración de antibióticos tanto al individuo infectado como a los contactos cercanos para evitar la diseminación y contagio. Los macrólidos son los antibióticos de elección frente a esta enfermedad, especialmente la eritromicina. La dosis para niños es de 40 a 50 mg / kg (de peso corporal) por día, la cual es administrada cada 6 a 8 h durante 14 días; pero macrólidos más nuevos también son muy efectivos, como la claritromicina (15 a 20 mg / kg por día durante 7 días para niños) y azitromicina (10 mg / kg en el día 1, y 5 mg / kg en los días 2 a 5 por 5 días para niños). Un agente alternativo en los casos de intolerancia a macrólidos es el trimetoprima(TMP)-sulfametoxazol (SMX), en una dosis de TMP: 8 mg / kg y SMX: 40 mg /kg, por día durante 14 días, sin embargo, está contraindicado para niños menores a los dos meses (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2005). Aplicar el tratamiento temprano puede mejorar la gravedad del cuadro y reducir la duración de los síntomas clínicos, así como eliminar la bacteria de la nasofaringe acortando la infectividad y reduciendo el riesgo de diseminación y contagio. Comenzar un tratamiento tardío si bien no llega a reducir la enfermedad en el individuo afectado, disminuye la propagación de la misma.

Con la implementación y el uso generalizado de vacunas, las tasas de incidencia de tos convulsa han disminuido drásticamente. Sin embargo, en la década del 80 el número de casos comenzó a incrementarse. Epidemias de pertussis se registran cada intervalo de 2

a 5 años, y continuaron a pesar de la vacunación masiva. La Organización Mundial de la Salud, reportó 151074 casos durante el año 2018 (Figura 9).

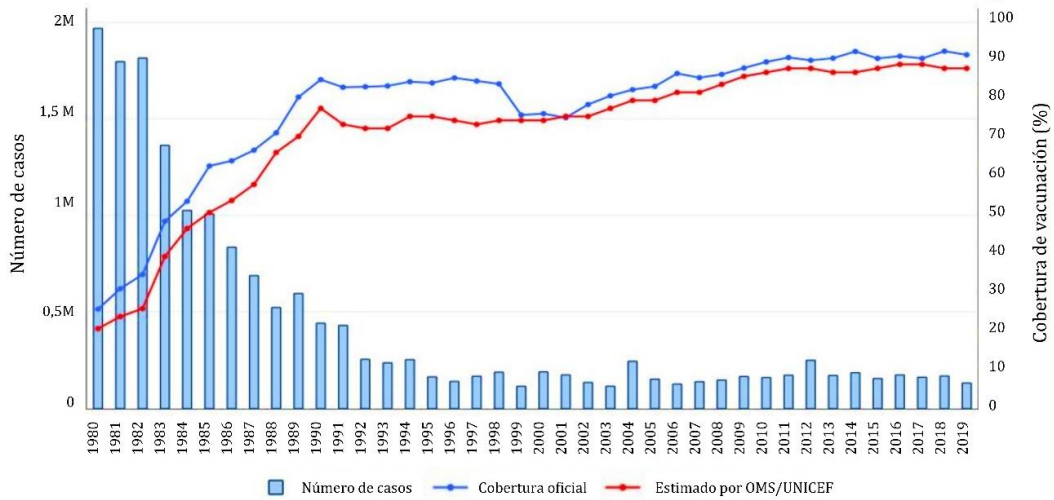


Figura 9. Número de casos oficiales reportados anualmente (barras) y porcentaje global de cobertura de la vacuna DTP3 (difteria- tétanos-pertussis; línea azul, datos oficiales, línea roja, datos estimados) a nivel mundial. Fuente: OMS/UNICEF, actualizados a julio de 2020.

En Argentina al analizar el número de casos de pertussis, se registró un pico de resurgencia de la enfermedad en el año 2012, luego del cual el Ministerio de Salud de la Nación decidió implementar la vacunación de embarazadas. Sin embargo, el número de casos presentó otro incremento en el año 2016 (Figura 10).

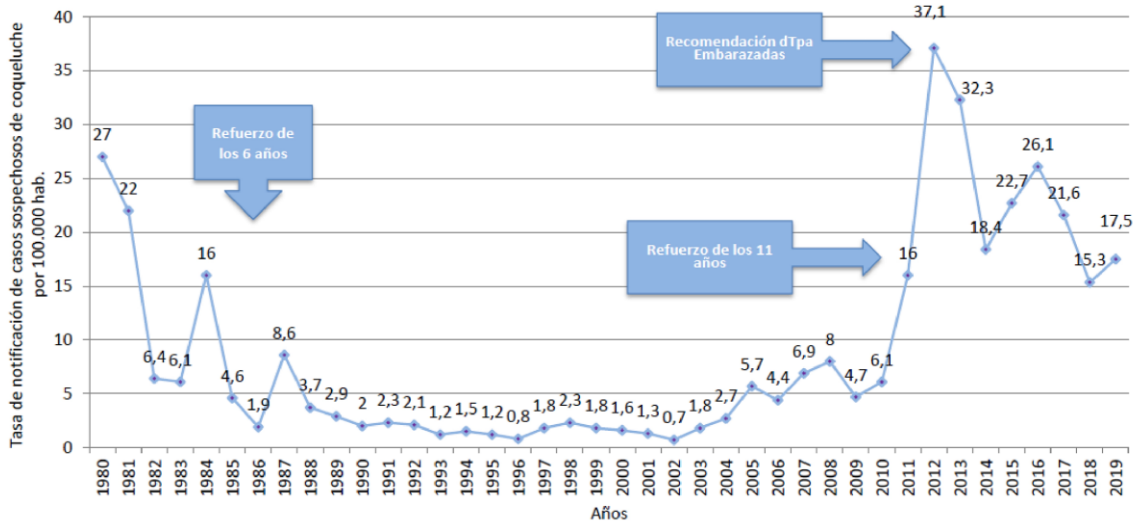


Figura 10. Casos sospechosos notificados de *B. pertussis* entre 1980-2019 en Argentina (fuente: Dirección de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles en base a datos del SNVS 2.0. Ministerio de Salud). Las tasas de notificaciones se mantienen por encima de las registradas previas al brote del año 2011.

I.1.4.a Resurgencia

A pesar de la mayor atención a nivel mundial en el diagnóstico y transmisión de tos convulsa (Cherry, 2012, 2013; McCaw *et al.*, 2015; Kaulh *et al.*, 2017), en las últimas décadas se ha registrado una importante resurgencia de la enfermedad a nivel global. Las posibles causas de este incremento en el número de casos reportados son varias. Entre ellas: i) la aparición de mutantes de *B. pertussis*, que presentan variaciones inmunogénicas en los principales factores de virulencia incluidos en las formulaciones de las vacunas acelulares de uso corriente, como consecuencia de la evolución frente a la presión inmune (Safarchi *et al.*, 2015); ii) una mayor resistencia a antibióticos de uso clínico (Bartkus 2003; Guillot *et al.*, 2012); y iii) la baja efectividad de las vacunas acelulares actualmente en uso corriente (Wendelboe *et al.*, 2005; Esposito 2018; Esposito & Principi 2018).

Aunque *B. pertussis* es conocida por su limitada variación en la secuencia de genes, avances en el estudio de aislados clínicos han revelado heterogeneidad estructural genómica incluso entre aislamientos dentro de epidemias definidas geográfica o temporalmente (Bowden *et al.*, 2016; Weigand *et al.*, 2017). Se han identificado cambios entre genomas de las cepas de referencia asociadas a vacunas y aislados clínicos. Estas mutaciones se han producido en genes que codifican proteínas inmunogénicas, sobre todo las de los antígenos que integran formulaciones acelulares de las vacunas empleadas contra tos convulsa que se utilizan actualmente, como los genes de la toxina pertussis (*ptxA* y la región promotora *ptxP*), las fimbrias (*fimH*) y pertactina lo que ha llevado a muchos a concluir que son el resultado de selección impulsada por vacunas (de Gouw *et al.*, 2014; Bart *et al.*, 2015; Safarchi *et al.*, 2016; Weigand *et al.*, 2017).

Los primeros aislados clínicos resistentes a antibióticos fueron reportados en 1994 en Estados Unidos (CDC 1994; Choo 1994). A partir de entonces se han informado algunos casos en países como Francia, Taiwán, Irán y particularmente en China donde la resistencia de *B. pertussis* a macrólidos se ha vuelto prevalente (Bartkus *et al.*, 2003, Guillot *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013, 2014; Shahcheraghi *et al.*, 2014; Safarchi *et al.*, 2019). Probablemente, dicha resistencia se debe a una mutación del sitio de unión de la eritromicina en el gen del ARNr 23S (Bartkus *et al.* 2003). En China particularmente, se registró una asociación estrecha entre la resistencia a antibióticos y el genotipo *ptxP1*, específico de la cepa vacunal (Safarchi *et al.*, 2019). Esto sugiere que posiblemente la evolución de *B. pertussis*

haya sido impulsada por la presión de selección tanto de la vacunación como de los antibióticos. Adicionalmente en Japón se ha detectado resistencia a las quinolonas, que se utilizan como fármacos alternativos, en los aislados de *B. pertussis* recolectados en dicho país (Ohtsuka *et al.*, 2009). La expansión de las cepas resistentes circulantes se ha reportado como impulsora de un aumento de aislados resistentes en otros países. La propagación de estas cepas es un motivo de preocupación para la salud pública mundial.

I.2 OBJETIVOS

La forma de transmisión, la evolución genética y fenotípica de los aislados clínicos circulantes y la aparición de aislados resistentes a los antibióticos tradicionales en *B. pertussis*, son problemáticas que atraen la atención de la ciencia vinculada a pertussis a nivel mundial. El actual escenario ha suscitado nuevos interrogantes sobre la forma de controlar la transmisión y evitar mediante la formulación de nuevos inmunógenos el resurgimiento de la tos convulsa.

B. pertussis como se indicó tiene la capacidad de alternar entre diferentes fases de virulencia, durante las cuales se expresan genes específicos. Este fenómeno conocido como modulación fenotípica puede ser una estrategia bacteriana para lograr la evasión inmune y la persistencia microbiana dentro del hospedador. Además, la adquisición de la fase avirulenta se ha asociado con tolerancia frente a condiciones de estrés (Moon *et al.*, 2017). Es evidente entonces que para lograr el control de la enfermedad se debe tener un mejor conocimiento de la respuesta adaptativa de esta bacteria frente a condiciones del entorno, en particular durante la modulación fenotípica y frente a la exposición a antimicrobianos. La capacidad de diferenciar bacterias según su fase de virulencia o actividad metabólica en tiempo real es de importancia para el estudio de esta bacteria en particular y microorganismos en general. Para esto, partiendo de un dispositivo derivado de AFM, se analizaron las dos fases de virulencia de *B. pertussis* mediante el registro de nanomovimientos.

Teniendo en cuenta que los antimicrobianos pueden modificar diferentes propiedades mecánicas como rugosidad, altura y rigidez de la cubierta celular y que el AFM ha demostrado su potencial para monitorear todas estas propiedades en células

individuales vivas, en este trabajo de Tesis Doctoral se decidió emplear esta tecnología para monitorear la acción de antibióticos sobre las propiedades mecánicas de células individuales a una resolución nanométrica. Se aprovechó en este sentido la experiencia de los grupos participantes de este trabajo en el manejo de esta tecnología y de este tipo de organismo patógeno.

Dados todos estos antecedentes los **Objetivos Generales** de este trabajo fueron:

*Explorar las propiedades nanomecánicas de superficie de células de *B. pertussis* en fase virulenta y avirulenta y su transición de fase en ambientes moduladores. Analizar el impacto de dos antibióticos -ampicilina y eritromicina- sobre dichas propiedades nanomecánicas mediante AFM.

*Analizar la respuesta a antibióticos y la modulación fenotípica de *B. pertussis* en tiempo real mediante el empleo de un equipo que permite sensar nanomovimientos de células vivas.

*Evaluar la adhesión y formación de biofilm de *B. pertussis* bajo condiciones de *shear* hidrodinámico.

Objetivos específicos

1.- Establecer y caracterizar diferencias morfológicas y propiedades nanomecánicas de cubierta celular entre células de *B. pertussis* que expresen fase virulenta y fase avirulenta.

2.- Evaluar y monitorear cambios en propiedades nanomecánicas de cubierta de células de *B. pertussis* en fase virulenta o avirulenta, en presencia de antibióticos utilizados en el tratamiento clínico de pacientes infectados.

3.- Comparar el efecto de antibióticos sobre cubierta celular de bacterias de *B. pertussis* individuales y agrupadas.

3.- Determinar las CIM y CBM de *B. pertussis* mediante un equipo nanosensor en condiciones fisiológicas en tiempo real.

4.- Analizar y comparar la actividad metabólica de células virulentas y avirulentas de *B. pertussis* mediante el empleo de equipos de censado de nanomovimientos en tiempo real.

5.- Evaluar la capacidad de adhesión y formación de biofilm de *B. pertussis* en presencia de fuerzas de *shear* hidrodinámico que simulen la condición presente en vías respiratorias.

I.3 BIBLIOGRAFÍA

- Aghayee S, Benadiba C, Notz J, Kasas S, Dietler G, Longo G. Combination of fluorescence microscopy and nanomotion detection to characterize bacteria. *J Mol Recognit.* 2013, 26(11):590-5. doi: 10.1002/jmr.2306.
- Akerley BJ, Monack DM, Falkow S, Miller JF. The *bvgAS* locus negatively controls motility and synthesis of flagella in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol.* 1992, 174:980-990.
- Akerley BJ, Cotter PA, Miller JF. Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *Bordetella*-host interaction. *Cell.* 1995, 80:611-620.
- Alves CS, Melo MN, Franquelim HG, Ferre R, Planas M, Feliu L, Bardají E, Kowalczyk W, Andreu D, Santos NC, Fernandes MX, Castanho MA. *Escherichia coli* cell surface perturbation and disruption induced by antimicrobial peptides BP100 and pepR. *J Biol Chem.* 2010, 285(36):27536-44. doi: 10.1074/jbc.M110.130955.
- Andre G, Kulakauskas S, Chapot-Chartier MP, Navet B, Deghorain M, Bernard E, Hols P, Dufrêne YF. Imaging the nanoscale organization of peptidoglycan in living *Lactococcus lactis* cells. *Nat Commun.* 2010, 1(3):27. doi: 10.1038/ncomms1027.
- Arnal L, Serra DO, Cattelan N, Castez MF, Vázquez L, Salvarezza RC, Yantorno OM, Vela ME. Adhesion contribution to nanomechanical properties of the virulent *Bordetella pertussis* envelope. *Langmuir.* 2012, 28(19):7461-9. doi: 10.1021/la300811m.
- Arnal L, Longo G, Stupar P, Castez MF, Cattelan N, Salvarezza RC, Yantorno OM, Kasas S, Vela ME. Localization of adhesins on the surface of a pathogenic bacterial envelope through atomic force microscopy. *Nanoscale.* 2015, 7(41):17563-72. doi: 10.1039/c5nr04644k.
- Arnoldi M, Fritz M, Bäuerlein E, Radmacher M, Sackmann E, Boulbitch A. Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics.* 2000, 62(1 Pt B):1034-44.
- Bart MJ, van der Heide HG, Zeddeman A, Heuvelman K, van Gent M, Mooi FR. Complete genome sequences of 11 *Bordetella pertussis* strains representing the pandemic ptxP3 lineage. *Genome Announc.* 2015, 3(6):e01394-15. doi: 10.1128/genomeA.01394-15.
- Bartkus JM, Juni BA, Ehresmann K, Miller CA, Sanden GN, Cassidy PK, Saubolle M, Lee B, Long J, Harrison AR, Jr, Besser JM. Identification of a mutation associated with erythromycin resistance in *Bordetella pertussis*: implications for surveillance of antimicrobial resistance. *J Clin Microbiol.* 2003, 41:1167-1172.
- Benoit M, Gabriel D, Gerisch G, Gaub HE. Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. *Nat Cell Biol.* 2000, 2(6):313-317. doi: 10.1038/35014000.
- Berne C, Ellison CK, Ducret A, Brun YV. Bacterial adhesion at the single-cell level. *Nat Rev Microbiol.* 2018, 16(10):616-627. doi: 10.1038/s41579-018-0057-5.
- Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett.* 1986, 56(9):930-933.
- Bordet J, Gengou O. Le microbe de la coqueluche. *Ann Inst Pasteur (Paris).* 1906, 20:48-68.
- Boucher PE & Stibitz S. Synergistic binding of RNA polymerase and BvgA phosphate to the pertussis toxin promoter of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1995, 177:6486-6491.
- Bowden KE, Weigand MR, Peng Y, Cassidy PK, Sammons S, Knipe K, Rowe LA, Loparev V, Sheth M, Weening K, Tondella ML, Williams MM. Genome structural diversity among 31 *Bordetella pertussis* isolates from two recent U.S. whooping cough statewide epidemics. *mSphere.* 2016, 1(3) e00036-16. doi: 10.1128/mSphere.00036-16.

- Castro SL, Nelman-Gonzalez M, Nickerson CA, Ott CM. Induction of attachment-independent biofilm formation and repression of hfq expression by low-fluid-shear culture of *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*. 2011, 77(18):6368–78.
- Cattelan N, Jennings-Gee J, Dubey P, Yantorno OM, Deora R. Hyperbiofilm Formation by *Bordetella pertussis* strains correlates with enhanced virulence traits. *Infect Immun*. 2017, 17;85(12). pii: e00373-17. doi: 10.1128/IAI.00373-17.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Erythromycin-resistant *Bordetella pertussis* Yuma County, Arizona, May–October 1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1994, 11;43(44):807–10.
- Centers for Disease Control and Prevention. Recommended antimicrobial agents for the treatment and postexposure prophylaxes of pertussis: 2005 CDC guidelines. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2005, 54:1–16.
- Cherry JD, Harriman K. Why do vaccine-preventable disease outbreaks occur in the United States?. *Infect Dis Special Ed*. 2012; 15:53–57.
- Cherry JD. Why do pertussis vaccines fail?. *Pediatrics*. 2012; 129:968–70. doi:10.1542/peds.2011-2594.
- Cherry JD. Pertussis: challenges today and for the future. *PLoS Pathog*. 2013, 9:e1003418. doi:10.1371/journal.ppat.1003418.
- Choo V. Erythromycin-resistant *Bordetella pertussis*. *The Lancet*. 1994, 344:1564. doi: 10.1016/S0140-6736(94)90365.
- Chtcheglova LA, Hinterdorfer P. Simultaneous topography and recognition imaging on endothelial cells. *J Mol Recognit*. 2011, 24:788–79412.
- Conover MS, Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Deora R. The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Mol Microbiol*. 2010, 77(6):1439-55. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07297.x.
- Conover MS, Mishra M, Deora R. Extracellular DNA is essential for maintaining *Bordetella* biofilm integrity on abiotic surfaces and in the upper respiratory tract of mice. *PLoS One*. 2011, 11;6(2):e16861. doi: 10.1371/journal.pone.0016861.
- Cotter PA, Jones AM. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol*. 2003, 11(8):367-73. doi: 10.1016/s0966-842x(03)00156-2.
- Craig-Mylius KA, Weiss AA. Antibacterial agents and release of periplasmic pertussis toxin from *Bordetella pertussis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000, 44(5):1383-6. doi: 10.1128/aac.44.5.1383-1386.2000.
- Cummings CA, Bootsma HJ, Relman DA, Miller JF. Species and strain specific control of a complex, flexible regulon by *Bordetella BvgAS*. *J Bacteriol*. 2006, 188(5):1775-85.
- de Gouw D, Hermans PW, Bootsma HJ, Zomer A, Heuvelman K, Diavatopoulos DA, Mooi FR. Differentially expressed genes in *Bordetella pertussis* strains belonging to a lineage which recently spread globally. *PLoS One*. 2014, 8;9(1):e84523. doi: 10.1371/journal.pone.0084523. Erratum in: *PLoS One*. 2014, 9(1). doi: 10.1371/annotation/1b2cfe52-aaea-4148-aa72-a74c78550192.
- Deora R, Bootsma HJ, Miller JF, Cotter PA. Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol Microbiol*. 200, 40(3):669-83.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002, 15(2):167-93.
- Dorji D, Mooi F, Yantorno O, Deora R, Graham RM, Mukkur TK. *Bordetella pertussis* virulence factors in the continuing evolution of whooping cough vaccines for improved performance. *Med Microbiol Immunol*. 2018, 207(1):3-26. doi: 10.1007/s00430-017-0524-z.
- Eaton P, Fernandes JC, Pereira E, Pintado ME, Xavier Malcata F. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopy*. 2008, 108(10):1128-34. doi: 10.1016/j.ultramic.2008.04.015.
- El-Kirat-Chatel S, Dufrêne YF. Nanoscale imaging of the *Candida*-macrophage interaction using correlated fluorescence-atomic force microscopy. *ACS Nano*. 2012, 21;6(12):10792-9. doi: 10.1021/nn304116f.
- Engel A, Müller DJ. Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nat Struct Biol*. 2000, 7(9):715-8.
- Esposito S, Principi N. Prevention of pertussis: an unresolved problem. *Hum Vaccin Immunother*. 2018, 14(10):2452-2459. doi: 10.1080/21645515.2018.1480298.
- Esposito S. Prevention of pertussis: from clinical trials to Real World Evidence. *J Prev Med Hyg*. 2018, 59(3):E177-E186. doi: 10.15167/2421-4248/jpmh2018.59.3.1041.

- Finger H, von Koenig CHW. Bordetella. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 31. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7813/>
- Florin EL, Moy VT, Gaub HE. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*. 1994, 15;264(5157):415-7.
- Formosa C, Grare M, Jauvert E, Coutable A, Regnouf-de-Vains JB, Mourer M, Duval RE, Dague E. Nanoscale analysis of the effects of antibiotics and CX1 on a *Pseudomonas aeruginosa* multidrug-resistant strain. *Sci Rep*. 2012, 2:575. doi: 10.1038/srep00575.
- Galy O, Latour-Lambert P, Zrelli K, Beloin C, Ghigo JM, Henry N. Mapping of bacterial biofilm local mechanics by magnetic microparticle actuation. *Biophysical journal*. 2012, 5(6):1400-8.
- Gammoudi I, Mathelie-Guinlet M, Morote F, Beven L, Moynet D, Grauby-Heywang C, Cohen-Bouhacina T. Morphological and nanostructural surface changes in *Escherichia coli* over time, monitored by atomic force microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016, 1;141:355-364. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.02.006.
- Guillot S, Descours G, Gillet Y, Etienne J, Floret D, Guiso N. Macrolide-resistant *Bordetella pertussis* infection in newborn girl, France. *Emerg Infect Dis*. 2012, 18(6):966-8. doi: 10.3201/eid1806.120091.
- Hinterdorfer P, Baumgartner W, Gruber HJ, Schilcher K, Schindler H. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci*. 1996, 93(8):3477-3481.
- Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, Høiby N, Moser C, Costerton JW, Moter A, Bjarnsholt T. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012, 65(2):127-45. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00968.x.
- Hoffman CL, Gonyar LA, Zacca F, Zacca F, Sisti F, Fernandez J, Wong T, Damron FH, Hewlett EL. Bordetella pertussis can be motile and express flagellum-like structures. *MBio*. 2019, 10(3):e00787-19. doi:10.1128/mBio.00787-19.
- Høiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS*. 2017, 125(4):272-275. doi: 10.1111/apm.12686.
- JPK Instruments: Nano Wizard AFM handbook. version 2-2a; 2012. <http://www.nanophys.kth.se/nanophys/facilities/nfl/afm/jpk/manuf-manuals/handbook-2.2a.pdf>.
- Kasas S, Ruggeri FS, Benadiba C, Maillard C, Stupar P, Tournu H, Dietler G, Longo G. Detecting nanoscale vibrations as signature of life. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015, 13;112(2):378-81. doi: 10.1073/pnas.1415348112.
- Kauhl B, Heil J, Hoebe CJ, Schweikart J, Krafft T, Dukers-Muijers NH. Is the current pertussis incidence only the results of testing? A spatial and space-time analysis of pertussis surveillance data using cluster detection methods and geographically weighted regression modelling. *PLoS One*. 2017, 12:e0172383. doi:10.1371/journal.pone.0172383.
- Kim SK, Lee JH. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol*. 2016, 54(2):71-85. doi: 10.1007/s12275-016-5528-7.
- Kirisits MJ, Margolis JJ, Purevdorj-Gage BL, Vaughan B, Chopp DL, Stoodley P, Parsek MR. Influence of the hydrodynamic environment on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol*. 2007, 189(22):8357-60.
- Kline JM, Lewis WD, Smith EA, Tracy LR, Moerschel SK. Pertussis: a reemerging infection. *Am Fam Physician*. 2013, 88(8):507-14. Review. Erratum in: *Am Fam Physician*. 2014, 89(5):317.
- Kuznetsova TG, Starodubtseva MN, Yegorenkov NI, Chizhik SA, Zhdanov RI. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*. 2007, 38(8):824-833. doi: 10.1016/j.micron.2007.06.011.
- Lee GU, Chrisey LA, Colton RJ. Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA. *Science*. 1994, 266(5186):771-3.
- Lesne E, Coutte L, Solans L, Slupek S, Debrie AS, Dhennin V, Froguel P, Hot D, Loch C, Antoine R, Jacob-Dubuisson F. Distinct virulence ranges for infection of mice by *Bordetella pertussis* revealed by engineering of the sensor-kinase BvgS. *PLoS One*. 2018, 13(10):e0204861. doi: 10.1371/journal.pone.0204861.
- Li K, Yuan XX, Sun HM, Zhao LS, Tang R, Chen ZH, Qin QL, Chen XL, Zhang YZ, Su HN. Atomic force microscopy of side wall and septa peptidoglycan from *Bacillus subtilis* reveals an architectural remodeling during growth. *Front Microbiol*. 2018, 9:620. doi: 10.3389/fmicb.2018.00620.
- Liu Y, Tay JH. Metabolic response of biofilm to shear stress in fixed-film culture. *J Appl Microbiol*. 2001, 90(3):337-42. pmid:11298227.

- Longo G, Rio LM, Roudit C, Trampuz A, Bizzini A, Dietler G, Kasas S. Force volume and stiffness tomography investigation on the dynamics of stiff material under bacterial membranes. *J Mol Recognit*. 2012, 25(5):278-84. doi: 10.1002/jmr.2171.
- Longo G, Alonso-Sarduy L, Rio LM, Bizzini A, Trampuz A, Notz J, Dietler G, Kasas S. Rapid detection of bacterial resistance to antibiotics using AFM cantilevers as nanomechanical sensors. *Nat Nanotechnol*. 2013, 8(7):522-6. doi: 10.1038/nnano.2013.120.
- Martinez-Martin D, Herruzo ET, Dietz C, Gomez-Herrero J, Garcia R. Noninvasive protein structural flexibility mapping by bimodal dynamic force microscopy. *Phys Rev Lett*. 2011, 106(19):198101.
- Mathias JD, Stoodley P. Applying the digital image correlation method to estimate the mechanical properties of bacterial biofilms subjected to a wall shear stress. *Biofouling*. 2009, 25(8):695-703.
- Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev*. 2005, 18:326-382.
- Mbaye S, Sechet P, Pignon F, Martins JM. Influence of hydrodynamics on the growth kinetics of glass-adhering *Pseudomonas putida* cells through a parallel plate flow chamber. *Biomicrofluidics*. 2013, 7(5):54105.
- McCaw JM, McIntyre P, McVernon J. Defining long-term drivers of pertussis resurgence, and optimal vaccine control strategies. *Vaccine*. 2015, 33:5794-800. doi:10.1016/j.vaccine.
- Merkel TJ, Stibitz S. Identification of a locus required for the regulation of bvg-repressed genes in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol*. 1995, 177:2727-2736.
- Merkel TJ, Boucher PE, Stibitz S, Grippe VK. Analysis of bvgR expression in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol*. 2003, 185:6902-6912.
- Mishra M, Parise G, Jackson KD, Wozniak DJ, Deora R. The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*. *J Bacteriol*. 2005, 187(4):1474-84. doi: 10.1128/JB.187.4.1474-1484.2005.
- Moon K, Bonocora RP, Kim DD, Chen Q, Wade JT, Stibitz S, Hinton DM. The BvgAS Regulon of *Bordetella pertussis*. *mBio*. 2017, 10;8(5):e01526-17. doi: 10.1128/mBio.01526-17.
- Mortensen NP, Fowlkes JD, Sullivan CJ, Allison DP, Larsen NB, Molin S, Doktycz MJ. Effects of colistin on surface ultrastructure and nanomechanics of *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Langmuir*. 2009, 25(6):3728-3733. <https://doi.org/10.1021/la803898g>.
- Nickerson CA, Ott CM, Wilson JW, Ramamurthy R, LeBlanc CL, Höner zu Bentrup K, Hammond T, Pierson DL. Low-shear modelled microgravity: a global environmental regulatory signal affecting bacterial gene expression, physiology, and pathogenesis. *J Microbiol Methods*. 2003, 54(1):1-11.
- Nieves DJ, Heininger U. *Bordetella pertussis*. *Microbiol Spectr*. 2016, 4(3). doi: 10.1128/microbiolspec.EI10-0008-2015.
- Nieves D, Heininger U, Cherry J. *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* spp. infections. In Wilson CB, Nizet V, Maldonado YA, Remington JS, Klein JO (ed), Remington and Klein's infectious diseases of the fetus and newborn infant, 8th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, PA. 2016 598-616.
- Oh YJ, Hinterdorfer P. Sensing the ultrastructure of bacterial surfaces and their molecular binding forces using AFM. *Methods Mol Biol*. 2018, 1814:363-372. doi: 10.1007/978-1-4939-8591-3_21.
- Ohtsuka M, Kikuchi K, Shimizu K, Takahashi N, Ono Y, Sasaki T, Hiramatsu K. Emergence of quinolone-resistant *Bordetella pertussis* in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009, 53(7):3147-9. doi: 10.1128/AAC.00023-09.
- Otto M. Physical stress and bacterial colonization. *FEMS Microbiol Rev*. 2014, 38(6):1250-70.
- Perry CC, Weatherly M, Beale T, Randriamahefa A. Atomic force microscopy study of the antimicrobial activity of aqueous garlic versus ampicillin against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Sci Food Agric*. 2009, 89: 958-964. doi: [10.1002/jsfa.3538](https://doi.org/10.1002/jsfa.3538).
- Pogoda K, Piktel E, Deptuła P, Savage PB, Lekka M, Bucki R. Stiffening of bacteria cells as a first manifestation of bactericidal attack. *Micron*. 2017, 101:95-102. doi: 10.1016/j.micron.2017.06.011.
- Rico F, Su C, Scheuring S. Mechanical mapping of single membrane proteins at sub-molecular resolution. *Nano Lett*. 2011, 11(9):3983-3986. <https://doi.org/10.1021/nl202351t>.
- Ruggeri FS, Habchi J, Cerreta A, Dietler G. AFM-Based single molecule techniques: unraveling the amyloid pathogenic species. *Curr Pharm Des*. 2016, 22(26):3950-70.
- Safarchi A, Octavia S, Luu LD, Tay CY, Sintchenko V, Wood N, Marshall H, McIntyre P, Lan R. Pertactin negative *Bordetella pertussis* demonstrates higher fitness under vaccine selection pressure in a mixed infection model. *Vaccine*. 2015, 33(46):6277-81. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.09.064.

- Safarchi A, Octavia S, Luu LD, Tay CY, Sintchenko V, Wood N, Marshall H, McIntyre P, Lan R. Better colonisation of newly emerged *Bordetella pertussis* in the co-infection mouse model study. *Vaccine*. 2016, 34(34):3967-71. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.06.052.
- Safarchi A, Octavia S, Nikbin VS, Lotfi MN, Zahraei SM, Tay CY, Lamichhane B, Shahcheraghi F, Lan R. Genomic epidemiology of Iranian *Bordetella pertussis*: 50 years after the implementation of whole cell vaccine. *Emerg Microbes Infect*. 2019, 8(1):1416-1427. doi: 10.1080/22221751.2019.1665479.
- Scaglione F, Demartini G, Dugnani S, Ferrara F, Maccarinelli G, Cocuzza C, Fraschini F. Effect of antibiotics on *Bordetella pertussis* adhering activity: hypothesis regarding mechanism of action. *Chemotherapy*. 1994, 40(3):215-20. doi: 10.1159/000239195.
- Scarlato V, Arico B, Prugnola A, Rappuoli R. Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J*. 1991, 10(12):3971-5.
- Serra DO, Lücking G, Weiland F, Schulz S, Görg A, Yantorno OM, Ehling-Schulz M. Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. *Proteomics*. 2008, 8(23-24):4995-5010. doi: 10.1002/pmic.200800218.
- Serra DO, Conover MS, Arnal L, Sloan GP, Rodriguez ME, Yantorno OM, Deora R. FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One*. 2011, 6(12):e28811. doi: 10.1371/journal.pone.0028811.
- Seydlova G, Beranova J, Bibova I, Dienstbier A, Drzmisek J, Masin J, Fiser R, Konopasek I, Vecerek B. The extent of the temperature-induced membrane remodeling in two closely related *Bordetella* species reflects their adaptation to diverse environmental niches. *J Biol Chem*. 2017, 292(19):8048-8058. doi: 10.1074/jbc.M117.781559.
- Shahcheraghi F, Nakhost Lotfi M, Nikbin VS, Shooraj F, Azizian R, Parzadeh M, Allahyar Torkaman MR, Zahraei SM. The first macrolide-resistant *Bordetella pertussis* strains isolated from Iranian patients. *Jundishapur J Microbiol*. 2014, 7(6):e10880. doi: 10.5812/jjm.10880.
- Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Mishra M, Deora R. The *Bordetella* Bps polysaccharide is critical for biofilm development in the mouse respiratory tract. *J Bacteriol*. 2007, 189(22):8270-6.
- Stibitz S, Yang MS. Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the vir locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol*. 1991, 173:4288-4296.
- Stockbauer KE, Fuchslocher B, Miller JF, Cotter PA. Identification and characterization of BipA, a *Bordetella* Bvg-intermediate phase protein. *Mol Microbiol*. 2001, 39(1):65-78.
- Sugisaki K, Hanawa T, Yonezawa H, Osaki T, Fukutomi T, Kawakami H, Yamamoto T, Kamiya S. Role of (p)ppGpp in biofilm formation and expression of filamentous structures in *Bordetella pertussis*. *Microbiology*. 2013, 159(Pt 7):1379-1389. doi: 10.1099/mic.0.066597-0.
- Thomen P, Robert J, Monmeyran A, Bitbol AF, Douarche C, Henry N. Bacterial biofilm under flow: First a physical struggle to stay, then a matter of breathing. *PLoS One*. 2017, 12(4):e0175197. doi: 10.1371/journal.pone.0175197.
- Touhami A, Hoffmann B, Vasella A, Denis FA, Dufrêne YF. Aggregation of yeast cells: direct measurement of discrete lectin-carbohydrate interactions. *Microbiology*. 2003, 149(Pt 10):2873-8.
- Touhami A, Nysten B, Dufrêne YF. Nanoscale mapping of the elasticity of microbial cells by atomic force microscopy. *Langmuir*. 2003, 19:4539-4543. <https://doi.org/10.1021/la034136x>.
- Tozzi AE, Celentano LP, Ciofi degli Atti ML, Salmaso S. Diagnosis and management of pertussis. *CMAJ*. 2005, 172(4):509-15. doi: 10.1503/cmaj.1040766.
- Wang H, Wilksch JJ, Strugnell RA, Gee ML. Role of capsular polysaccharides in biofilm formation: an AFM nanomechanics study. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015, 7(23):13007-13. doi: 10.1021/acsami.5b03041.
- Wang H, Wilksch JJ, Chen L, Tan JW, Strugnell RA, Gee ML. Influence of fimbriae on bacterial adhesion and viscoelasticity and correlations of the two properties with biofilm formation. *Langmuir*. 2017, 33(1):100-106. doi: 10.1021/acs.langmuir.6b03764.
- Wang Z, Li Y, Hou T, Liu X, Liu Y, Yu T, Chen Z, Gao Y, Li H, He Q. Appearance of macrolide-resistant *Bordetella pertussis* strains in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013, 57(10):5193-4. doi: 10.1128/AAC.01081-13.
- Wang Z, Cui Z, Li Y, Hou T, Liu X, Xi Y, Liu Y, Li H, He Q. High prevalence of erythromycin-resistant *Bordetella pertussis* in Xian, China. *Clin Microbiol Infect*. 2014, 20(11):O825-30. doi: 10.1111/1469-0691.12671.
- Weigand MR, Peng Y, Loparev V, Batra D, Bowden KE, Burroughs M, Cassiday PK, Davis JK, Johnson T, Juieng P, Knipe K, Mathis MH, Pruitt AM, Rowe L, Sheth M, Tondella ML, Williams MM. The history of

- Bordetella pertussis* genome evolution includes structural rearrangement. *J Bacteriol.* 2017, 199(8). pii: e00806-16. doi: 10.1128/JB.00806-16.
- Wendelboe AM, Van Rie A, Salmaso S, Englund JA. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatr Infect Dis J.* 2005, 24 (5 Suppl): S58-61. doi:10.1097/01.inf.0000160914.59160.41.
- Xiao J, Dufrêne YF. Optical and force nanoscopy in microbiology. *Nat Microbiol.* 2016, 1(11):16186. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.186.
- Zhang Q, Li M, Wang L, Xin T, He Q. High-resolution melting analysis for the detection of two erythromycin-resistant *Bordetella pertussis* strains carried by healthy schoolchildren in China. *Clin Microbiol Infect.* 2013, 19(6):E260-2. doi: 10.1111/1469-0691.12161.

CAPÍTULO II

Características morfológicas y nanomecánicas de

***B. pertussis* en fase virulenta y avirulenta**

II.1 INTRODUCCIÓN

II. 1.1 Estados de virulencia de *B. pertussis*

Casi todos los factores de virulencia de *B. pertussis* son activados por un sistema maestro de dos componentes, BvgAS, compuesto por el sensor quinasa BvgS y el regulador de respuesta BvgA. Cuando BvgS está activo, BvgA se fosforila y los genes activados por virulencia (*vags*) se expresan adquiriendo así la bacteria un estado virulento (Bvg+). Cuando BvgS está inactivo y BvgA se encuentra no fosforilado, se inducen genes reprimidos por virulencia (*vrgs*), y la bacteria adquiere un modo avirulento (Bvg-). Entre ambas fases fenotípicas se ha descrito un modo o estado de virulencia intermedia (Bvg_i), donde las proteínas BvgS quinasa activadas y quinasa desactivadas pueden coexistir en equilibrio.

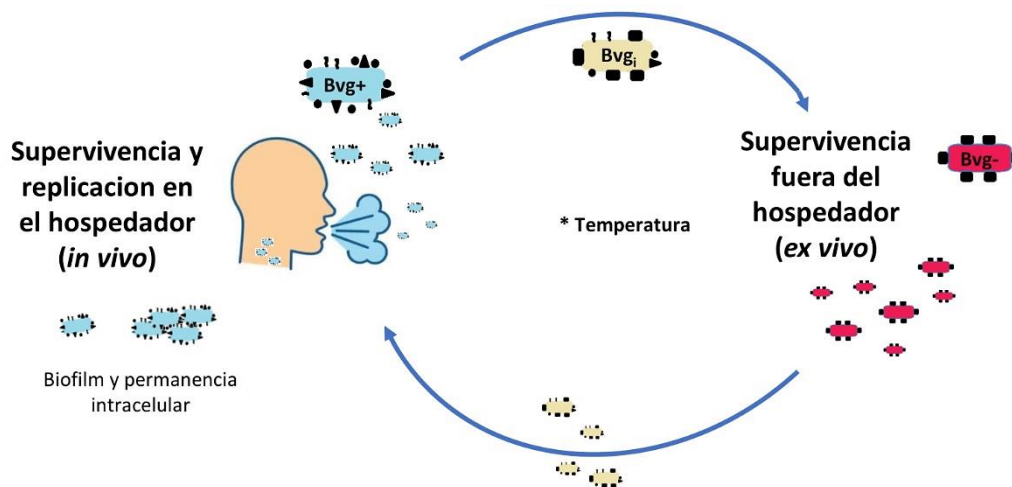


Figura 1. Ciclo de virulencia de *B. pertussis*. Se pueden utilizar ciertas condiciones de cultivo de laboratorio para modular el perfil de expresión a la fase Bvg-, específicamente: crecimiento a temperatura ambiente (<25 °C) o en presencia de concentraciones milimolares de ácido nicotínico o de MgSO₄ (mayores a 10 mM y 40 mM respectivamente).

El hecho de que la bacteria pueda adoptar distintas fases de virulencia ha sido asociado con la necesidad de la misma de evadir anticuerpos dirigidos contra los factores de virulencia expresados en fase Bvg+. Además, esta transición en el estado de virulencia

podría favorecer el atemperamiento del daño a los tejidos del huésped mediante la disminución de la expresión de toxinas, así como facilitar la transmisión bacteriana a través de la disminución en la expresión de adhesinas y factores de fase Bvg⁺ esenciales para la interacción inicial con el huésped o para sobrevivir dentro de las células (Martínez de Tejada *et al.*, 1998; Lesne *et al.*, 2018). Incluso se ha mencionado cierta motilidad en *B. pertussis* que parece ocurrir principalmente en la fase Bvg⁻ mediante estructuras similares a flagelos (Hoffman *et al.*, 2019). Además, fue reportado que los cambios metabólicos en Bvg⁻ podrían estar participando en la supervivencia, transmisión y/o persistencia bacteriana (Moon *et al.*, 2017).

La hemaglutinina filamentosa (FHA) es una proteína altamente inmunogénica de alto peso molecular, β -helicoidal de 4 × 40 nm con un dominio globular en un extremo (Scheller y Cotter, 2015). Se encuentra asociada a la membrana y a su vez es secretada al medio extracelular (Vidakovics *et al.*, 2006; Henderson *et al.*, 2012). Es codificada por el gen *fhaB* y se sintetiza en primera instancia como un precursor de 365 kDa, que luego es escindido hasta convertirse en la proteína funcional de 220 kDa en su forma madura. Se han identificado varios dominios de unión en la misma que son responsables de la adhesión a una gran variedad de células eucariotas y estructuras extracelulares. De este modo FHA interviene en la invasión a células del hospedador y colonización del tracto respiratorio, considerándose el factor dominante de la adhesión de *Bordetella* a superficies blancas tanto en humanos como en animales (Mattoo & Cherry 2005). A su vez, posee un rol fundamental en la adhesión interbacterial, la ausencia de FHA causa una significativa reducción en la habilidad de *B. pertussis* para formar y mantener estructuras tipo biofilm en el tracto respiratorio de ratones (Serra *et al.*, 2011). También interviene en el desencadenamiento de la respuesta inmunomoduladora y la autoaglutinación (Menozzi *et al.*, 1994; Abramson *et al.*, 2001; Carbonetti 2007). FHA es un componente de la mayoría de las vacunas acelulares de pertussis donde se administran de forma combinadas las toxinas de difteria y tétano con componentes inmunogénicos de *B. pertussis* (Henderson *et al.*, 2012; Scheller & Cotter, 2015).

La capacidad de *B. pertussis* de transportarse y llegar hacia nuevos lugares y superficies, podría estar asociada no sólo con la virulencia y la disminución en la expresión de factores de virulencia, sino también con un cambio en la morfología de la bacteria que le confiera mayor movilidad. Dumais, (2013), sugiere que todos los

organismos enfrentan el desafío común de regular sus propias formas para facilitar la viabilidad y el crecimiento, y para poder reaccionar a las limitaciones espaciales y fuerzas mecánicas. En esta línea de pensamiento, la determinación de la forma y el tamaño celular, es importante para estudios de adhesión y dispersión. Es probable que la forma que adopta una célula dependa de presiones externas que dirigen la actividad de una bacteria a adquirir determinada conformación, lo cual resultará de la interacción entre el entorno y la pared celular (Young, 2006; Yang *et al.*, 2016; van Teeseling *et al.*, 2017), pero los fundamentos de esta interacción en *B. pertussis* son desconocidos.

En este capítulo se lleva a cabo mediante AFM, un seguimiento en tiempo real de la expresión de la adhesina FHA, así como el análisis morfológico y de propiedades nanomecánicas de *B. pertussis* en células virulentas, avirulentas y durante la transición entre dichas fases.

II.1.2 Microscopía de Fuerza Atómica

La microscopía AFM forma parte de las llamadas microscopías de barrido por sondas (SPM) que básicamente construyen la imagen de la muestra analizada mediante la exploración de la superficie a través de una sonda (“probe”), que recorre la superficie. La idea de registrar una interacción local y crear una imagen es relativamente sencilla, pero lo desafiante fue la implementación del sistema con resolución atómica. Para lograr esto, intervinieron muchos factores, uno de los principales fue el desarrollo de materiales piezoeléctricos que permiten posicionar y recorrer de manera reproducible la muestra con una precisión subnanométrica (Dufrêne *et al.*, 2017).

El principio básico consiste en controlar la fuerza que experimenta una punta (tip) ubicada en el extremo de un cantilver al acercarse a una superficie, a través de la deflexión de un haz de radiación láser que incide sobre el mismo, es decir la fuerza se mide de una manera indirecta (Figura 2). Las fuerzas atractivas o repulsivas entre el tip y la muestra causan una deflexión del cantilever acercándolo o alejándolo de la superficie. El haz láser incide directamente sobre el cantilever y es reflejado, a su vez, sobre un fotodetector. Mientras que el cantilever se mueve, el ángulo de reflexión del haz láser cambia y consecuentemente lo hace también su punto de incidencia sobre el fotodetector, (esto es

cuando la muestra está fija y no se aplica el sistema de retroalimentación). La señal procedente del detector permite calcular la deflexión. La deflexión vertical (que mide la fuerza de interacción) puede ser calculada por comparación de la cantidad de señal desde la mitad superior e inferior del detector. El movimiento lateral puede ser calculado de las mitades derecha e izquierda del mismo. De esta manera fuerzas atractivas o repulsivas entre el tip y la muestra se convierten en deflexión o flexión del cantilever que es detectado por el fotodiodo. En la construcción de las imágenes topográficas se fija una fuerza de interacción constante a lo largo del recorrido X-Y de la punta sobre la muestra y los movimientos del piezoeléctrico en el eje Z, necesarios para mantener esa fuerza de interacción que permite obtener la imagen tridimensional (JPK Instruments, 2012).

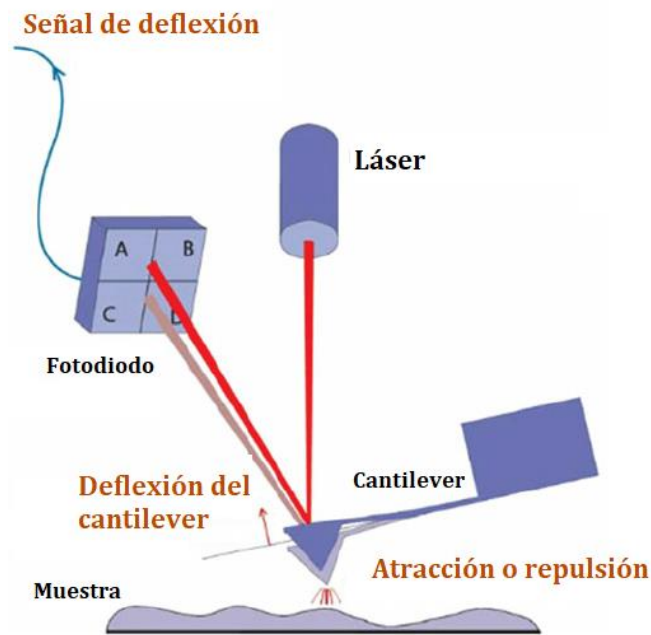


Figura 2. Esquema representativo de un AFM. Extraído de: Drolle *et al.*, 2014

Dentro de las distintas fuerzas de interacción que operan entre la superficie y la punta, las principales son las interacciones de *van de Waals* y las fuerzas coulómbicas. Las fuerzas de van der Waals son de naturaleza atractiva y se manifiestan a distancias de hasta 10 nm aproximadamente. Las interacciones coulómbicas son de mayor intensidad, de corto alcance y repulsivas, y se originan en la repulsión electrostática de las nubes de electrones de la punta y de la muestra; e incrementan cuando la separación punta-

muestra disminuye (Goodman & García, 1991). El resultado de la combinación de estas interacciones da lugar a una curva de fuerza típica, como se detalla en la Figura 3.

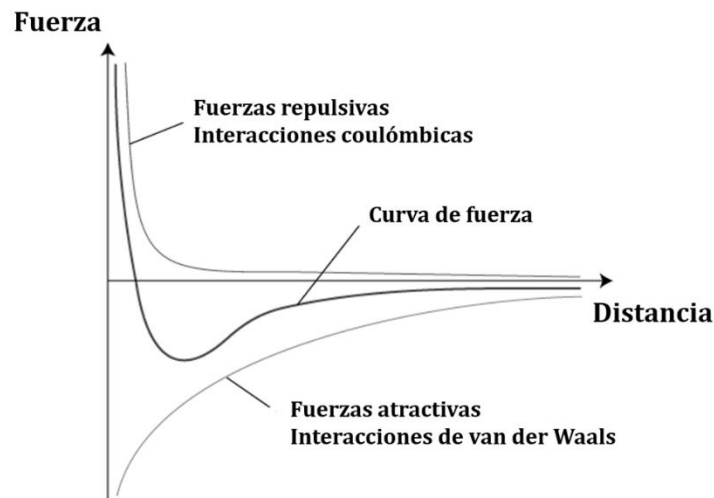


Figura 3. Interacciones intervinientes en AFM, la curva intermedia es la curva de fuerza resultante de la combinación de las interacciones atractivas y repulsivas.

El AFM es una herramienta muy versátil mediante la que pueden llevarse a cabo diversos tipos de análisis según la muestra y la información que se desea obtener. Tal como se mencionó, la adquisición de imágenes topográficas brinda información cuantitativa tridimensional proveyendo no solo la localización espacial en el plano X-Y de la muestra sino también en el eje Z. Esto permite calcular la rugosidad superficial, o el análisis de expresión de diversas proteínas mediante espectroscopía de fuerza; incluso una combinación de ambos mediante imágenes fuerza-volumen o imagen cuantitativa. Por otra parte, la obtención de curvas de fuerza en distintos puntos X-Y de la muestra provee información valiosa sobre propiedades nanomecánicas de la superficie.

II.1.2.a Cantilevers

La punta o tip del AFM forma parte de una estructura más grande, fácil de manipular y montar en el equipo: el cantilever. Al conjunto punta (o tip) más el cantilever se le llama sonda. El tamaño del cantilever puede ser relativamente grande, cientos de micrones o más, pero la señal será dominada por la región donde se ubica el tip a través de la que se genera la interacción con la muestra, que en general se encuentra en los extremos de los cantilevers. La punta o tip tiene forma piramidal, es de silicio (Si) o nitruro de silicio (Si_3N_4) y tiene un radio de 5-15 nm, el cual puede variar por desgaste durante el

experimento (Binnig *et al.*, 1987) (Figura 4 y 5). Las dimensiones y el material del cantilever determinan la dureza final del mismo, es decir la constante de fuerza o resorte (k). Las constantes de fuerza de los cantilevers comerciales varían entre 0,005 N/m y 40 N/m. La frecuencia de resonancia de la sonda es otra característica muy importante a considerar, aquellas de mayor espesor (t) y menor longitud (l), tienden a ser más rígidas y tienen una mayor frecuencia de resonancia. Típicamente un cantilever de dimensiones pequeñas como 0,3 μm de espesor, 10 μm de ancho x 100 μm de largo, posee una frecuencia de resonancia aproximadamente de 16 kHz. La frecuencia de resonancia es muy importante en la velocidad de escaneo y adquisición de imágenes por AFM. La elección apropiada de la sonda siempre depende de la aplicación específica. Para el análisis de materiales blandos, un cantilever apropiado debe ser el que tenga frecuencia de resonancia alta y baja constante de fuerza. En el estudio de muestras biológicas, generalmente se emplean las sondas de Si_3N_4 , de rigidez en el rango de 0,01 N/m–0,6 N/m (Gavara, 2017). Respecto a la forma, los cantilevers de forma triangular se pueden utilizar para las medidas de fricción y en medio líquido debido a su mayor estabilidad, y los rectangulares se suelen utilizar para realizar experimentos al aire.

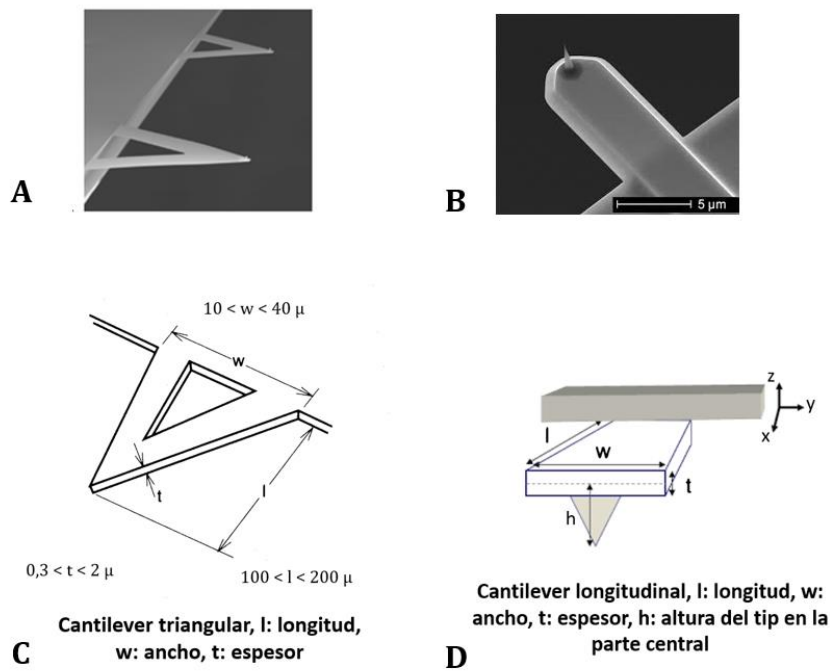


Figura 4. (A) Imágenes de un cantilever triangular de Si_3N_4 modelo DNP-10 y un (B) cantilever rectangular. Dimensiones de los cantilever según la forma (C) triangular o (D) longitudinal.

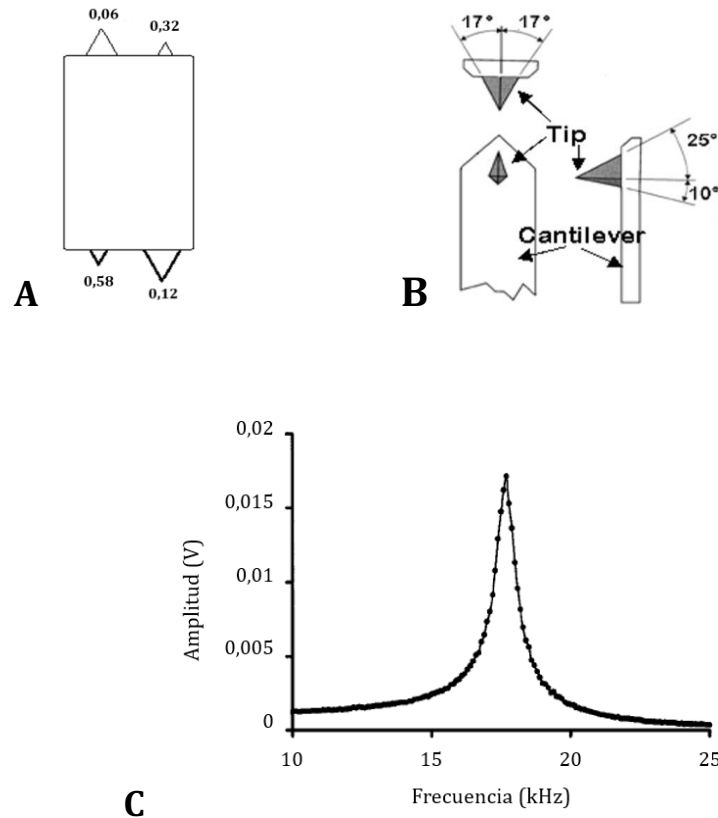


Figura 5. (A) Imagen de una oblea con 4 cantilevers triangulares y sus respectivas constantes de fuerza (en N/m), representación de DNP-10. (B) Esquema de una sonda: cantilever + tip (o punta). (C) Espectro de resonancia para un cantilever donde la frecuencia de resonancia en el aire es 17,8 kHz.

II.1.2.b Registro de datos

-Modo contacto e imágenes de altura

En este caso el tip nunca se aleja de la superficie, es decir, la punta y la muestra se encuentran en contacto, de manera que las fuerzas que intervienen mientras que la punta recorre la muestra en las direcciones “x” e “y”, son repulsivas. El valor de deflexión del cantilever se mantiene constante a medida que se lleva a cabo el registro de datos a través de un sistema de retroalimentación mediante el cual el escáner (barredor piezoeléctrico) modifica su posición en la dirección perpendicular a la superficie de la muestra (en “z”), de tal manera que la distancia punta-muestra es siempre la misma. Este valor de deflexión constante se denomina “setpoint”. Considerando que los cantilevers se comportan como resortes (al ser estructuras deformables y elásticas), la Ley de Hooke permite establecer la relación entre la fuerza aplicada (F) y la deflexión del cantilever (x), (Ecuación 1). De esta manera la fuerza es proporcional a la deflexión y a la constante de resorte del cantilever (Cappella, 1999). Para mantener la condición de F constante entre punta y

muestra entonces la deflexión se debe mantener constante mediante el sistema de retroalimentación durante el transcurso de la adquisición de imágenes. Con los datos de desplazamiento vertical del barredor piezoeléctrico en cada punto se grafica la imagen topográfica de la muestra, llamada imagen de altura.

$$F = -k x \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde F = fuerza, k = constante de resorte del cantilever, x = deflexión del cantilever

-Curvas de fuerza e Imágenes Fuerza-Volumen

El AFM puede proporcionar información acerca de las interacciones y propiedades mecánicas de la superficie a través de curvas de fuerza vs distancia recorrida en el eje Z (perpendicular a la superficie de la muestra). Una curva de fuerza representa un ciclo completo de la deflexión del cantilever en función de la distancia punta-muestra en la dirección perpendicular a la muestra adquirido en una posición X-Y dada de la superficie celular (Kasas *et al.*, 2013). A través de la Ley de Hooke, la deflexión del cantilever se convierte en fuerza (Ecuación 1). En la Figura 6 se representa una curva típica Fuerza vs Distancia donde el segmento desde el punto A hasta el C se refiere al movimiento del tip acercándose a la superficie y el que se dirige a partir del D al E se refiere al movimiento de retracción desde la superficie (Butt *et al.*, 1995; Dufrêne, 2002).

En el modo de imagen fuerza-volumen (FV) se combina la imagen topográfica con la adquisición de curvas de fuerza, es decir la información registrada en el eje Z con los puntos “x” e “y” donde fueron adquiridas esas curvas en la región explorada. Las FV se logran realizando curvas de fuerza en una cuadrícula espacial definida de la superficie (Figura 7). Para cada posición (x, y) de la muestra existe una curva de fuerza en Z. Esto permite ver de manera estratificada fuerzas a varias alturas a lo largo del eje Z sobre la superficie de la muestra. La imagen topográfica se genera a través de los datos de deflexión del cantilever, y asociado a la misma, el FV permite obtener imágenes de fuerzas a valores de Z constantes, brindando información cualitativa de la interacción entre la punta y la muestra para cada valor de Z. El tiempo de adquisición de una FV es mayor al de una imagen topográfica, por esto el número de pixeles está limitado por las

características del microscopio con el cual se trabajó (Radmacher *et al.*, 1994; Veeco Instruments Inc., 2005; Jembrek *et al.*, 2015).

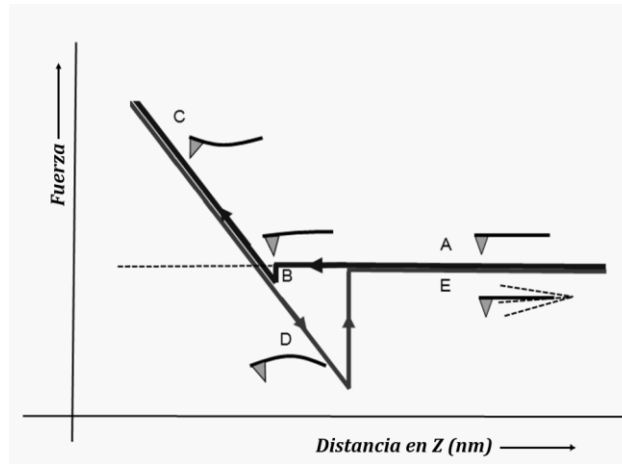


Figura 6. Curva de fuerza típica obtenida con el AFM donde se destacan las cinco zonas características. A: la sonda del AFM (cantilever y punta) se acerca a la superficie, y si hay fuerzas atractivas o repulsivas entre la punta y la muestra son medidas en este segmento por la respuesta hacia abajo o arriba de la sonda; B: la sonda se pone en contacto con la muestra, la pequeña indentación es causada por la interacción de la sonda con la superficie de la muestra tal como ocurre en presencia de las fuerzas capilares; C: porción repulsiva donde la muestra y la punta permanecen en contacto pero ésta se curva hacia arriba por el movimiento del barrido piezoeléctrico en z; D: la punta sufre una fuerza adhesiva hasta que la retracción del piezo permite alejarla de la muestra; E: el cantilever vuelve a su estado no perturbado, mientras que el piezoeléctrico aumenta la distancia de la muestra respecto de la punta.

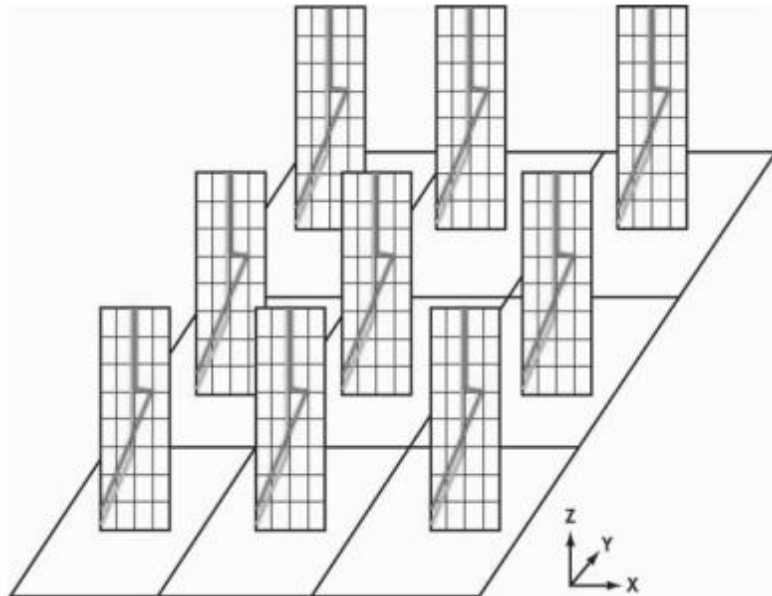


Figura 7. Representación de mecanismo de obtención de la información en una imagen FV, en cada pixel definido en la cuadrícula se realiza una curva de fuerzas. Imagen tomada de Veeco Instruments Inc.

-Imagen Cuantitativa

Los equipos de AFM provistos por la empresa JPK, ofrecen un modo de adquisición de información denominado imagen cuantitativa, similar a FV. Este modo recoge curvas de fuerza-distancia en cada pixel, pero en una imagen de alta resolución. El conjunto de datos es equivalente a un archivo clásico de FV con una mejora considerable en términos de velocidad de recolección de datos y resolución (imágenes de 1024x1024 píxeles) (Smolyakov *et al.*, 2016). El método tradicional requeriría de dos pasos para recoger la misma información: adquirir mediante alta resolución la información topográfica y luego mediante una baja resolución un *force volume* o mapa de fuerzas. El modo Imagen cuantitativa (QI, de las siglas en inglés “Quantitative Imagen”) es multiparamétrico y produce curvas de fuerza con información de altura, rigidez de la superficie y adhesión en cada pixel de alta resolución. Tal como FV, es especialmente útil para el análisis de superficies blandas o adhesivas, incluso para casos de análisis incómodos debido a bordes empinados.

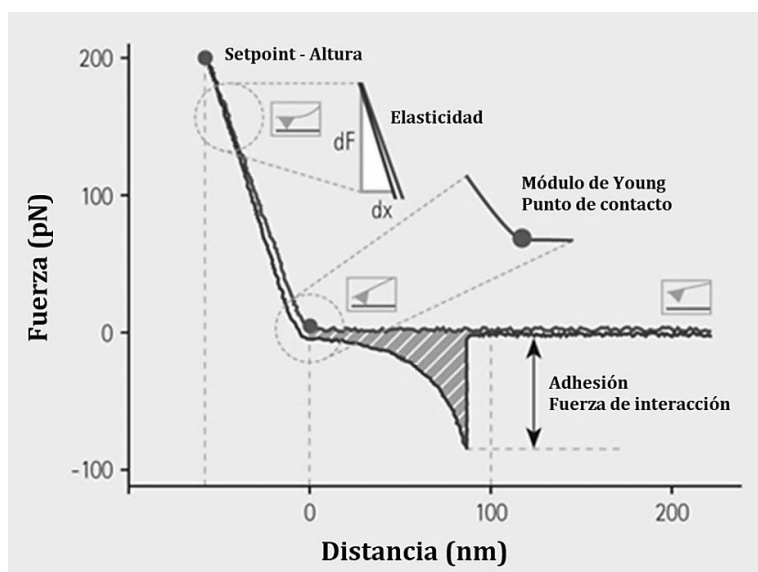


Figura 8. Curva de fuerza y conjunto de propiedades que permite analizar el modo QI (fuente: www.jpk.com).

El algoritmo desarrollado para mover la sonda del AFM permite prevenir las fuerzas laterales y controla las verticales. De esta manera se logra tener un control total de las fuerzas que existen entre la punta y la muestra en cada pixel de la imagen. La ausencia de

fuerzas laterales facilita la adquisición de imágenes de muestras biológicas, reduciendo la probabilidad de desprendimiento de la muestra del porta-muestras a donde están adheridas, y permite medir las bacterias en su estado nativo debido a la distancia de separación y la fuerza de interacción controlada (Bhat *et al.*, 2018). El movimiento del cantilever y los diversos parámetros pueden ser controlados totalmente. Todas las curvas de fuerzas registradas pueden analizarse lo que permite un registro de propiedades de superficie muy completo obteniéndose datos sobre la rigidez, adhesión, energía disipada, rugosidad, altura, etc. (Figura 8).

-Espectroscopía de fuerzas de molécula individual

Entre los avances del AFM y aprovechando la resolución nanométrica de la técnica, se ha desarrollado un modo de estudio especialmente útil para muestras biológicas, para detectar la interacción entre moléculas individuales llamado Espectroscopía de Fuerza de Molécula Individual (SMFS de su sigla en inglés "*single-molecule force spectroscopy*"). En este método de registro de datos la punta se funcionaliza con moléculas para analizar muestras mediante interacción específica, en superficies abióticas o receptores expresados en superficies de células vivas (Figura 9A) (Hinterdorfer & Dufrière, 2006; Chtcheglova & Hinterdorfer 2011; Muller & Dufrière, 2011; Heinisch *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2013; El-Kirat-Chatel *et al.*, 2014; El-Kirat-Chatel & Beaussart 2018). La funcionalización de la punta debe ser lo suficientemente firme para evitar desprendimientos, y mantener la conformación de la sustancia que se empleó en la funcionalización (ligando) que permita el análisis de la molécula a ser analizada (receptor). El método más simple de adherir moléculas a la punta es mediante adsorción no específica o mediante enlaces covalentes. La introducción de un grupo intermediario (linker) entre la punta y el ligando de interés facilita el reconocimiento entre el receptor-ligando y la transmisión de la señal desde el evento de interacción al cantilever. Los linkers más utilizados son el polietilenglicol o el glutaraldehído (Cheung & Nimni, 1982; Migneault *et al.*, 2004).

En SMFS, como en FV, las curvas de fuerza pueden presentar una serie reconocible de picos de adhesión a lo largo del eje x (aproximación punta-muestra) (Figura 9B), cada uno de los cuales representa el despliegue de un módulo de proteína única o un evento de interacción-adhesión entre la punta y la muestra (Sarkar *et al.*, 2005).

Este enfoque ha sido utilizado en estudios de diferentes tipos de células: endoteliales, eritrocitos y bacterias (Almqvist *et al.*, 2004; Dupres *et al.*, 2005, Arnal *et al.*, 2015). Es una herramienta extremadamente útil para detectar y localizar moléculas a nivel individual y para explorar el perfil energético de las interacciones moleculares, permitiendo llevar a cabo un mapeo de las biomoléculas en las superficies microbianas para analizar su distribución y organización espacial o cambios debido a estímulos externos (Alsteens *et al.*, 2010; Heinisch *et al.*, 2010; Beaussart *et al.*, 2012; Arnal *et al.*, 2015; Oh *et al.*, 2016). Las moléculas con estructura tridimensional compleja, como muchas proteínas, se pueden desplegar de manera controlada para que las unidades estructurales puedan ser investigadas. Esta herramienta se utiliza en muchos estudios de adhesión y análisis de interacciones entre anticuerpos y antígenos u otros pares ligando-receptor, tales experimentos incluyen avidina / estreptoavidina, ADN, carbohidratos, lectinas, cadherinas, integrinas, selectinas y adhesinas bacterianas (Dufrière & Hinterdorfer, 2008).

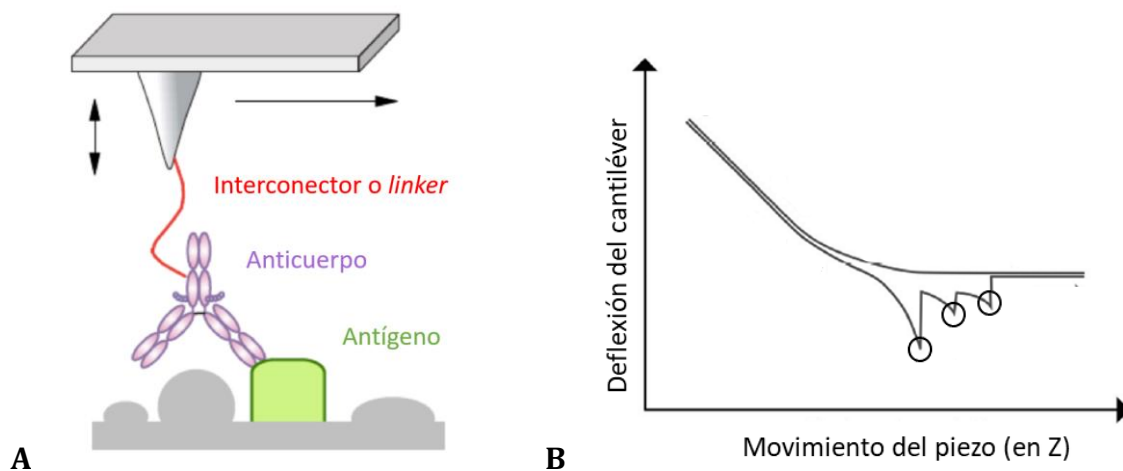


Figura 9. (A) Representación esquemática de SMFS aplicada a interacciones anticuerpo-antígeno. La punta se funcionaliza con una proteína de interés, en este caso un anticuerpo, a través de una molécula interconectora (linker). El anticuerpo interactuará con el antígeno o receptor específico en la muestra, dando como resultado una fuerza que será medida por AFM (Imagen tomada de: Delacroix 2018). (B) Representación esquemática de una curva de fuerza sobre una muestra blanda, donde se indican tres eventos de interacción correspondiente a los tres picos de adhesión (imagen tomada de: Shere *et al.*, 2018).

Han sido mencionados previamente los cambios relacionados con el metabolismo de *B. pertussis* así como con la expresión de factores de virulencias específicos cuando la bacteria cambia su estado de virulencia (Moon *et al.*, 2017). De este modo, **las propiedades**

nanomecánicas y la forma celular características de *B. pertussis* en el estado avirulento o virulento podrían llegar a ser fundamentales en el estudio de la infección, brindando información sobre dichos cambios metabólicos específicos o de la presencia de proteínas de membranas características en cada etapa. En este capítulo mostramos un estudio de propiedades nanomecánicas y morfológicas de *B. pertussis* en sus dos fases de virulencia características, las cuales podrían aportar información relevante en el estudio de la capacidad de dispersión, colonización y formación de agrupamientos celulares. Para esto utilizamos AFM y el análisis de imágenes cuantitativas de alta resolución mediante un estudio no destructivo de la muestra en condiciones fisiológicas. La misma herramienta es utilizada para llevar a cabo un seguimiento del proceso de cambio de la virulencia a través de experimentos de interacción antígeno-anticuerpo utilizando el modo espectroscopía de fuerza y el posterior análisis de curvas de fuerza.

II.2 OBJETIVOS

*Caracterizar morfológicamente las fases de virulencia Bvg⁺ y Bvg⁻ mediante la determinación de la forma y tamaño celular analizando imágenes cuantitativas adquiridas por AFM.

*Estudiar y comparar propiedades nanomecánicas de cubierta celular de *B. pertussis* en ambas fases de virulencia.

*Estudiar la expresión de FHA, la principal adhesina de cubierta externa de *B. pertussis*, en condiciones ambientales que afecten el estado de virulencia mediante interacciones específicas antígeno-anticuerpo evaluadas mediante espectroscopía de fuerzas de molécula individual.

II.3 MATERIALES Y MÉTODOS

II.3.1 Bacterias y condiciones de cultivo

Las cepas que se utilizaron en este capítulo fueron: *B. pertussis* Tohama I (Instituto Pasteur, Paris, France -CIP 8132-), Bp 537: cepa bloqueada en fase avirulenta derivada de Bp Tohama I (Relman *et al.*, 1990), y *Escherichia coli* DH5 α , cepa de laboratorio (StrataGene). Las cepas de *B. pertussis* se crecieron en Agar Bordet-Gengou (ABG) suplementado con 1% w/v de Bactopectona (Difco) y 15% v/v de sangre desfibrinada de carnero, durante 48 h a 37°C. Las colonias fueron re-cultivadas por 48 h y luego inoculadas en erlenmeyers de 100 mL conteniendo 30 mL de medio Stainer-Sholte (SS) (Stainer & Scholte, 1970), de esta manera se conserva la relación (volumen de medio/volumen de frasco) que en principio nos asegura un adecuado suministro de oxígeno en el cultivo. El medio SS está compuesto por (concentraciones expresadas en g/L): glutamato de sodio 10,7, L-prolina 0,24, cloruro de sodio 2,5, cloruro de magnesio hexahidratado 0,1, fosfato monopotásico 0,5, cloruro de potasio 0,2, TRIS 1,52, cloruro de calcio dihidratado 0,02, ácido clorhídrico 25% 2ml/L, L-cisteína 0,8, L-ácido ascórbico 0,4, ácido nicotínico (niacina) 0,08, sulfato ferroso heptahidratado 0,2. Los frascos fueron incubados por 24 h a 37°C en agitación a 160 rpm. La concentración inicial fue DO₆₅₀:0,2. Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en ágar Luria-Bertani (LB) o en caldo LB *over-night* a 37°C. Finalmente, los cultivos fueron centrifugados a 8000 g por 5 minutos y lavados 4 veces con buffer fosfato salino (PBS del inglés: *phosphate buffered saline*) estéril.

Para los análisis de fases de virulencia de *B. pertussis*, se utilizó MgSO₄ como agente “modulador” de la virulencia en concentración final de 50 mM para lograr estados avirulentos. El sulfato fue agregado a las placas ABG, así como a los cultivos con medio líquido SS. La presencia de organismos en fase Bvg- se verificó por ausencia del halo de hemólisis en las colonias producto de la ausencia de la expresión de la toxina Adenilato Ciclasa.

II.3.2 Preparación de la muestra bacteriana para AFM

II.3.2.a Análisis del efecto de la fijación con glutaraldehído de células de *B. pertussis*

Con el objetivo de desarrollar un protocolo de preparación de muestra para el análisis bacteriano de manera de evitar el desplazamiento y desprendimiento celular se probó un mecanismo de adhesión mediante polilisina seguida de una fijación celular utilizando glutaraldehído. El soporte sobre el cual se preparó la muestra consiste en un portaobjetos de 1cm x 1cm previamente modificado mediante la incubación con una solución de hidrobromuro de Polilisina -PLL (hb)- 0,01% por 1 h y lavado con PBS estéril. Las células fueron adheridas mediante interacción electrostática al soporte durante un periodo de 1:30 h seguida de un lavado con PBS. Luego, se llevó a cabo una fijación de la muestra utilizando una solución acuosa de glutaraldehído 0,5%, mediante la incubación por 20 minutos a temperatura ambiente y al resguardo de la luz. Finalmente se realiza un enjuague por inmersión en PBS estéril.

Para determinar los efectos de este procedimiento se analizó la rigidez celular una vez preparada la muestra. La adquisición de imágenes fue mediante la herramienta *Force-Volume* de un AFM Multimode acoplado a una unidad de control Nanoscope V (Bruker, Santa Barbara, CA) disponible en el Laboratorio de Nanoscopías y Fisicoquímica de Superficies del INIFTA (UNLP-CONICET). Este modo de registro de datos permite adquirir curvas de fuerza sobre la superficie de células individuales en cada pixel. Las imágenes fueron de 2,5 x 2,5 μm^2 aproximadamente y de 32 x 32 pixeles. Se utilizaron cantilevers de nitruro de silicio de constante 0,06 N/m y 0,12 N/m. A partir de cada curva de fuerza se obtuvieron los módulos de Young (E) ajustando la porción no lineal de las curvas utilizando el modelo de Hertz (Arnal *et al.*, 2012). El modelo de Hertz utiliza la siguiente ecuación suponiendo una geometría cónica para la punta (Touhami *et al.*, 2003):

$$F = \frac{2 E \tan \alpha}{\pi (1 - \nu^2)} \delta^2 \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde E es el módulo de Young de la muestra, F es la fuerza, α es el ángulo medio de apertura del indentador, δ es la indentación y ν la relación de Poisson de la muestra (asumido como 0,5 para células).

El tratamiento y análisis de los datos de las curvas de fuerza se hizo siguiendo los procedimientos de una tesis previa del grupo de la Dra. Laura Arnal donde se emplearon el programa OriginPro y un "home-made" *software* desarrollado por el Dr. Federico

Castez del INIFTA. Los resultados finales se representaron como el promedio \pm error estándar. La significación estadística se evaluó utilizando dos muestras de la prueba *t* de Student.

II.3.2.b Inmovilización de *B. pertussis* sobre vidrio y placas de Petri.

A continuación, se tuvo que llevar a cabo un análisis para inmovilizar bacterias y preparación de muestra sin el paso final de fijación con glutaraldehído, ya que comprobamos que el mismo afecta las propiedades nanomecánicas y químicas de las superficies celulares ocasionando pérdida de viabilidad de los microorganismos. Muchos trabajos han utilizado diversos métodos para facilitar la adhesión de las células a la superficie del porta-muestras y se han propuesto distintos protocolos (Vadillo-Rodríguez *et al.*, 2004; Louise Meyer *et al.*, 2010; Kuiukina *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019). En este trabajo de tesis analizamos y adaptamos diversos protocolos de inmovilización utilizando polietilenimina (PEI), glutaraldehído y polilisina (PLL) y definimos el más conveniente para los estudios de *B. pertussis*. Los mecanismos de adhesión del PLL y PEI son básicamente mediante la interacción electrostática con las cargas negativas de la superficie bacteriana, ya que ambos son polímeros catiónicos, el glutaraldehído lo hace mediante uniones covalentes con la membrana bacteriana.

**Inmovilización con Polietilenimina (PEI):* En este caso se llevó a cabo el protocolo desarrollado previamente por Arnal y colaboradores, (2012). Inicialmente el vidrio a utilizar como soporte fue incubado con una gota de una solución de PEI (Sigma Aldrich) 0,1% p/v, cubriendo toda la superficie de adhesión deseada. El soporte con la gota de PEI se agita suavemente para cubrir toda la superficie, y luego se deja caer el líquido por inclinación de la superficie y desplazamiento de la gota; de esta manera se retira el exceso del polímero y la superficie queda cubierta solo por una delgada capa húmeda. Luego, se incuba en estufa a 37°C hasta que la superficie esté seca (20 minutos aproximadamente) y finalmente se incuba con la suspensión de células, durante 2 h 30 minutos. Previamente a su inserción en el AFM, se lava dos veces por inmersión en PBS estéril.

**Inmovilización con glutaraldehído (GA):* La inmovilización utilizando glutaraldehído como linker fue puesta a punto para *B. pertussis*. Para esto se incuba la superficie a utilizar como soporte (vidrio o placa de Petri) con una solución acuosa 0,5 % de GA (Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 15 minutos, luego se realiza un lavado con agua ultrapura por

goteo e inclinación. La superficie húmeda se deja secar durante 5 minutos y se incuba con la suspensión bacteriana. Finalmente se lleva a cabo un lavado con PBS estéril por inmersión para eliminar las bacterias débilmente adheridas que podrían afectar las medidas.

* *Inmovilización con Polilisina (PLL)*: La inmovilización de bacterias utilizando PLL como linker se llevó a cabo mediante la puesta a punto de dos protocolos, según el tipo de PLL comercial empleado. La polilisina es un polímero de aminoácidos con carga positiva que establece una interacción electrostática con los iones cargados negativamente de la membrana celular. El primer protocolo se realizó empleando hidrobromuro de poli-L-lisina -PLL (hb)-(P1274 SIGMA). Este protocolo consiste en la incubación del vidrio con una gota de PLL (hb) 0,01% toda la noche, luego se realiza un lavado con agua estéril y se incuba nuevamente con PLL (hb) 0,01% durante 5 minutos; se deja caer el líquido por una inclinación de la superficie y se incuba el soporte a 37 °C hasta que se evapore el líquido de la superficie. A continuación, una gota de la suspensión bacteriana es incubada cubriendo la superficie funcionalizada previamente, por 1 h – 1:30 h. Finalmente se lava por inmersión en PBS dos veces. El otro protocolo es más corto y fácil de llevar a cabo y fue realizado con la solución de poli-L-lisina 0,01% comercial (P4707, SIGMA). Inicialmente se incubaron las placas de Petri con 100 μ L de PLL durante 20 minutos a 37 °C hasta que la superficie se encuentre seca. Luego 200 μ L de la suspensión bacteriana fueron incubados sobre la placa funcionalizada durante 45 minutos a 37 °C y finalmente se lava con PBS estéril (Figura 10).

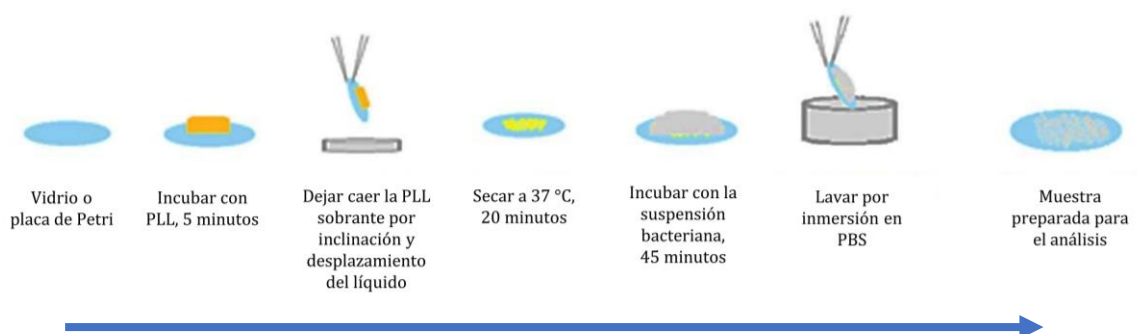


Figura 10. Protocolo de preparación de muestras para análisis con el AFM.

Para asegurar la adhesión continua y la viabilidad de los especímenes, se llevó a cabo un test de viabilidad mediante la tinción fluorescente de los especímenes. Se utilizó el kit Live/Dead, compuesto por yoduro de propidio (PI: *Propidium iodide*) y SYTO9. El SYTO9 (espectro verde) que tiñe todas las bacterias porque penetra independientemente como sea el estado de la membrana. El PI (espectro rojo) tiñe sólo aquellas bacterias con membrana plasmática dañada. Por lo tanto, la utilización de estos compuestos permite diferenciar células vivas (verdes) de muertas (rojas). Este tipo de experimentos deben ser realizados independientemente de las medidas de AFM, ya que el proceso de tinción modifica el metabolismo bacteriano y altera las propiedades nanomecánicas de las bacterias. En todos casos se observó que las bacterias se mantenían viables luego de la adhesión.

II.3.3 Análisis de características morfológicas y propiedades nanomecánicas de bacterias individuales de *B. pertussis*

El proceso de preparación de muestra se llevó a cabo sobre la cepa mutante avirulenta *B. pertussis* 537 y la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I expresando un fenotipo virulento y durante procesos de transición de una fase a otra. En los casos donde se analizó la transición de la fase virulenta a la fase avirulenta, las bacterias fueron incubadas en medio de cultivo SS con una concentración final de MgSO₄ de 50 mM. Inicialmente se llevó a cabo la funcionalización de las placas de Petri utilizando una solución acuosa comercial 0,01% PLL. A continuación, se preparó la suspensión bacteriana: una muestra procedente de un cultivo líquido de 24 h fue lavada dos veces con PBS estéril por centrifugación a 8000 g, luego se concentró en medio SS fresco hasta lograr una solución lo suficientemente concentrada para que las bacterias cubran toda la superficie del soporte destinada a la adhesión celular (DO₆₅₀: 5 o más). Finalmente, 200 µL de la suspensión bacteriana fueron incubados sobre la placa funcionalizada durante 45 minutos a 37 °C.

Para llevar a cabo las medidas mediante AFM en este tipo de experimentos se utilizó un microscopio NanoWizard II (JPK Instruments, Berlin, Germany) y sondas comerciales de nitruro de silicio de constante nominal 0,06 N/m y 0,12 N/m. La obtención de datos se llevó a cabo mediante el modo QI con las siguientes propiedades: *setpoint force*: 1 nN,

máxima extensión en el eje Z (perpendicular a la superficie): 1000 nm, tiempo de retracción y de extensión: 500 ms cada uno, número de píxeles: 64 x 64 o 128 x 128 (dependiendo del caso). Las QI adquiridas tienen un tamaño entre 2 x 2 o 2,5 x 2,5 μm^2 y corresponden a bacterias individuales.

El análisis de QI se llevó a cabo utilizando el software *JPK Data Processing*. En este análisis se examina para cada bacteria la medida de los ejes longitudinal y transversal y la altura media, mediante la opción *cross section* (Figura 11A), y el módulo de Young mediante un ajuste de acuerdo a la ecuación de Hertz mencionada previamente (Figura 11B y C).

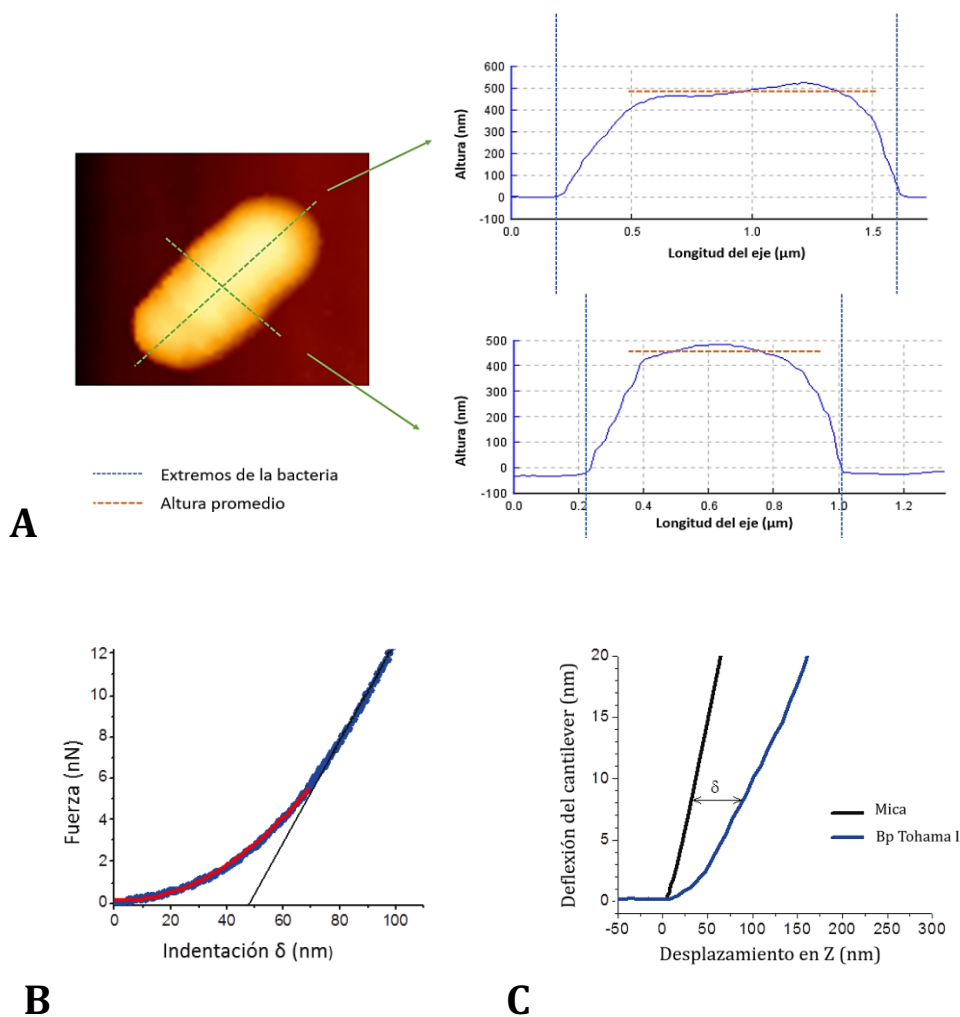


Figura 11. Determinación de las propiedades nanomecánicas. (A) Tamaño de la bacteria: ejes longitudinales y transversales y altura. (B) Ejemplo de curva fuerza-distancia donde la curva de extensión se ajusta con el modelo de Hertz. (C) Curva de deflexión sobre una superficie rígida (mica) (línea negra) y sobre una célula de *B. pertussis* (Línea azul). (B y C son imágenes adaptadas de Arnal *et al.*, 2012).

La rugosidad de la superficie de las bacterias fue analizada mediante el parámetro RMS (*root mean square roughness*) que es la desviación de los valores de z (altura) de una determinada región (Ecuación 3), corrigiendo previamente las imágenes topográficas de acuerdo al plano de inclinación punta-muestra. Para cada bacteria se midió el RMS en al menos tres áreas centrales diferentes con un tamaño fijo de $140 \times 140 \text{ nm}^2$.

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Z_i - Z_{prom})^2}{N}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde, N representa la cantidad de datos de la región analizada, Z_i representa la altura y Z_{prom} representa la altura promedio.

Esto se repitió al menos para tres bacterias procedentes de cultivos diferentes por cada condición. Los resultados finales se representaron como el promedio \pm error estándar. La significancia estadística se evaluó utilizando la prueba t de *Student*.

II.3.4 Espectroscopía de molécula individual: análisis de la expresión de virulencia

II.3.4.a Funcionalización del cantilever con anticuerpos:

El estado de virulencia de *B. pertussis* fue evaluado mediante el estudio de la expresión de la proteína FHA, a través del análisis de la interacción entre una sonda del AFM funcionalizada con el anticuerpo específico (antiFHA). FHA es la principal adhesina de esta bacteria y es expresada en fase Bvg⁺ pero no en Bvg⁻. Para su evaluación se llevó a cabo la funcionalización de un cantilever comercial de nitruro de silicio de constante de fuerza nominal de 0,06 N/m o 0,12 N/m, mediante la incubación con una solución acuosa de glutaraldehído 0,05% p/v durante 15 minutos, seguido de tres lavados con agua ultrapura y de una incubación con el anticuerpo monoclonal antiFHA (NIBSC, Londres, Inglaterra) en una concentración de 1 ng/ μL durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se hace un lavado con PBS estéril y se lleva a cabo el montaje del cantilever en el cabezal del AFM (Arnal *et al.*, 2015).

II.3.4.b Preparación de la muestra proteica: FHA purificada

La proteína FHA purificada fue adherida a una superficie de mica para el análisis de interacción proteína-anticuerpo. Inicialmente, la capa superficial del disco de mica fue extraída utilizando cinta adhesiva permitiendo que quede una superficie nueva y limpia. Este soporte fue incubado con una gota de 50 μL de solución etanólica de APTES 1% durante 1 minuto y lavado tres veces con agua Milli-Q. Los discos de mica fueron secados bajo N_2 e incubados con una solución acuosa de GA 0,5% durante 15 minutos. Se realizó un nuevo lavado con agua Milli-Q y secado con N_2 . Finalmente, los discos de mica fueron incubados durante 15 minutos con 30 μL de una solución de FHA purificada 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (Sigma, St. Louis, MO, USA) en buffer PBS. Finalmente, luego de lavar los discos con la proteína adherida se llevó a cabo el análisis en el AFM (Arnal *et al.*, 2015).

II.3.4.c Preparación de la muestra bacteriana

El registro de la interacción antígeno-anticuerpo se llevó a cabo sobre la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I expresando un fenotipo virulento y durante procesos de transición de una fase a otra, también sobre la cepa mutante avirulenta *B. pertussis* 537 y sobre una cepa de referencia de *E. coli* como control negativo. En los casos donde se analizó la transición de la fase virulenta a la fase avirulenta, las bacterias fueron incubadas en medio de cultivo SS con una concentración final de MgSO_4 de 50 mM. Inicialmente se llevó a cabo la funcionalización de las placas de Petri utilizando una solución acuosa comercial 0,01% PLL. A continuación, se preparó la suspensión bacteriana: una muestra procedente de un cultivo líquido de 24 h fue lavada dos veces con PBS estéril por centrifugación a 8000 g, luego se concentró en medio SS fresco hasta lograr una solución lo suficientemente concentrada para que las bacterias cubran toda la superficie del soporte destinada a la adhesión celular (DO_{650} : 5 o más). Finalmente, 200 μL de la suspensión bacteriana fueron incubados sobre la placa funcionalizada durante 45 minutos a 37 °C.

II.3.4.d Análisis de la interacción proteína-anticuerpo

La adquisición de datos fue realizada mediante el modo *Force-Volume*. Ejemplos de curvas representativas obtenidas mediante Espectroscopia de fuerza se muestran en el anexo asociado a este capítulo (Anexo: Figura 1).

Las medidas fueron realizadas en buffer PBS. La fuerza máxima aplicada fue de 1nN y el recorrido en Z fue de 0,5 μm . Se adquirieron 500 curvas de fuerza para cada velocidad

de retracción analizada (50, 100, 500 y 1000 nm/s), manteniendo el tiempo de contacto en superficie en 500 ms. Estas curvas fueron analizadas con el objetivo de obtener los valores de fuerza de interacción más probables para cada velocidad de retracción y se realizó el gráfico *Fuerza vs loading rate* (tasa de aplicación de fuerza) para comprobar la dependencia lineal de dichos parámetros, típico de una interacción específica ligando-receptor. El *loading rate* (lr) se calculó mediante el producto de la velocidad de aplicación de la fuerza por la constante de fuerza del cantilever. Además, se realizaron medidas luego del bloqueo de FHA como control. Para esto se incubó la muestra proteica desarrollada tal como se menciona en el apartado: “*Preparación de la muestra proteica: FHA purificada*”, con una suspensión de anticuerpos antiFHA (10 ng/ μ l) durante 1 hora, seguido de tres lavados con agua Milli-Q.

II.3.4.e Análisis de la interacción *B. pertussis*-anticuerpo

Para cada bacteria analizada fueron adquiridas 30 curvas de fuerza mediante el modo SMFS antes y después de un periodo de 5 h (conservando el lugar de registro de curvas en la bacteria analizada). En los casos donde se deseaba seguir el cambio de virulencia, la solución de MgSO₄ fue agregada al medio SS de la placa de Petri donde se lleva a cabo el registro de datos. Las curvas de fuerzas fueron registradas en la dirección perpendicular a la superficie con una máxima longitud de extensión y retracción de 1000 nm y un tiempo de duración de 0,5 segundos para cada etapa, incluida una etapa intermedia de contacto punta-muestra entre la extensión y retracción, también de 0,5 segundos.

Finalmente se llevó a cabo el análisis de datos mediante el software *JPK Data Processing*. Cada pico que se observa en las curvas de fuerza corresponde a un evento de reconocimiento específico, el número de picos por curva es el parámetro definido como número de eventos de reconocimiento antígeno-anticuerpo (Figura 8). Se calculó el número de interacciones antígeno-anticuerpo encontradas con sus respectivos errores estándar para todas las curvas registradas por cada bacteria. Sólo aquellos eventos de interacción con valores específicos que correspondan a una fuerza de interacción antígeno-anticuerpo (rango comprendido entre los 30 pN y los 1000 pN) fueron considerados. Los eventos de adhesión inespecíficos no se contemplaron en el análisis.

II.4 RESULTADOS

II.4.1 Selección del protocolo de preparación de muestras bacterianas para el análisis por AFM

Para llevar a cabo las medidas mediante AFM, primero debimos poner a punto y comparar diferentes protocolos de preparación de muestras bacterianas que aseguren una adecuada adhesión de las células sobre el soporte y el menor desprendimiento y movimiento de las mismas para llevar a cabo un registro de datos durante largos periodos de tiempo sobre bacterias individuales.

Inicialmente, como posible mecanismo de preparación y conservación de muestras, se decidió estudiar la fijación con GA al 0,5% de bacterias previamente inmovilizadas a un soporte. Debido a que el GA es un agente “entrecruzador”, que genera enlaces entre moléculas de las proteínas en la célula, se llevó a cabo un análisis sobre el posible efecto en la elasticidad de la membrana que, en efecto, reveló un incremento en los valores medios de rigidez de la célula fijada en comparación a la bacteria no fijada. Los datos del conjunto de células analizadas se muestran en los histogramas de la Figura 12, donde se puede observar que las bacterias sin fijar presentan una distribución de Módulo de Young (E) con dos poblaciones identificables, una con un valor más probable en 0,3 MPa y otra con un valor más probable en 0,55 MPa, señaladas mediante las curvas. Cuando se observa el histograma correspondiente a los valores de E de las 4 células fijadas con glutaraldehído, se detectan valores de rigidez que alcanzan hasta el doble de los detectados en las células sin fijar. No obstante, la distribución del Módulo de Young del conjunto de datos de las bacterias analizadas, mantiene un perfil similar al de las células sin fijar, permitiendo discriminar la presencia de dos poblaciones, indicadas con las curvas, una con un valor de E más probable alrededor de 0,80 MPa y otra con un valor más probable alrededor de 1,2 MPa.

De este modo, la fijación con GA, luego de una inmovilización previa a la superficie, podría utilizarse, por ejemplo, en el estudio de características morfológicas, pero no como método para el análisis de propiedades nanomecánicas por lo que se decidió continuar con el desarrollo de otros protocolos de preparación de la muestra sin el paso de fijación final.

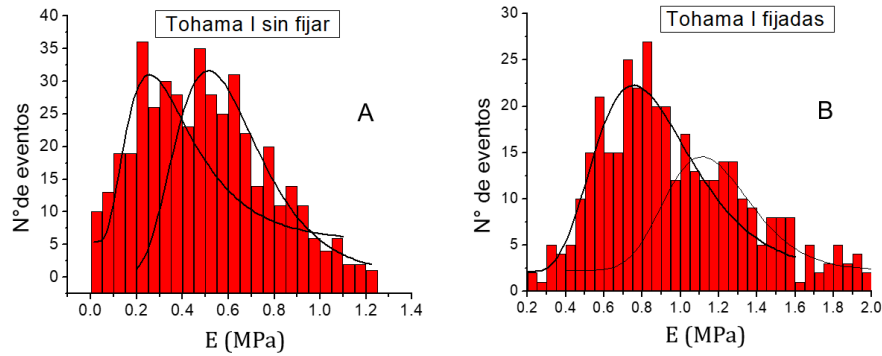


Figura 12. Histogramas representativos del módulo de Young, de (A) curvas procedentes de 4 bacterias *B. pertussis* Tohama I sin fijar y (B) 4 bacterias *B. pertussis* Tohama I inmovilizadas con PLL y fijadas mediante inmersión en GA 0,5%.

A continuación, fueron analizados 3 agentes ligantes distintos. Empezamos estudiando la PEI; un polímero que permite conservar a las bacterias adheridas a una superficie de una manera adecuada para un futuro análisis en condiciones cercanas a las fisiológicas y lo que es más importante, la preservación de la viabilidad de las células luego de la adhesión. Luego hemos estudiado para la inmovilización de *B. pertussis*, el protocolo publicado en la bibliografía respecto a la funcionalización de cantilevers con GA 0,5% (Longo *et al.*, 2013). Las bacterias a analizar se inmovilizan adecuadamente utilizando este protocolo y se conservan viables.

Finalmente, se puso a punto un protocolo empleando un procedimiento de funcionalización superficial menos nocivo para las células. Para ello se empleó polilisina (PLL), mediante una adaptación del protocolo mencionado previamente por Oh y Hinterdorfer, (2018). La PLL es un polímero de aminoácidos con carga positiva que establece una interacción electrostática con los iones cargados negativamente de la membrana celular. Este fue el método que consideramos más apropiado por ser el menos tóxico para la muestra biológica y el que a su vez requiere menor tiempo de preparación. Los pasos seguidos se detallan en la Figura 9 de la sección Materiales y Métodos.

La presencia de bacterias adheridas a la superficie mediante cada protocolo fue corroborada mediante tinción Live/Dead (Figura 13).

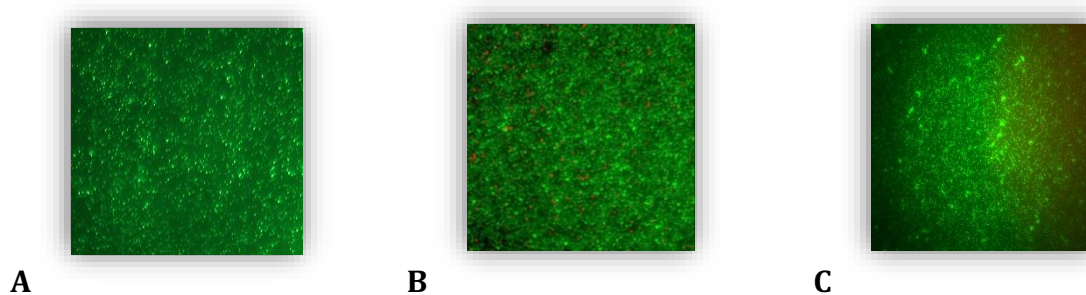


Figura 13. Imágenes de células de *B. pertussis* adheridas a una superficie de vidrio mediante la funcionalización de la superficie con PEI (A), GA (B) o PLL (C). Tinción: Live/Dead (SYTO9-PI).

II.4.2 Empleo de AFM para el análisis morfológico de células de *B. pertussis* en fase virulenta y avirulenta

El aspecto morfológico de *B. pertussis* descrito hasta el momento consiste en un cocabacilo de un tamaño medio de $0,8 \mu\text{m}$ por $0,4 \mu\text{m}$ (Finger & von Koenig, 1996). Sin embargo, las diferencias morfológicas entre las fases virulenta y avirulenta aún no han sido completamente estudiadas. Es por ello que en este trabajo decidimos adentrarnos en el estudio de estas características mediante la utilización de AFM e intentar establecer diferencias entre las mismas.

Sorprendentemente, las medidas registradas luego del análisis con el modo QI mediante AFM, denotan una diferenciación morfológica entre la fase virulenta y la fase avirulenta. Específicamente se ha registrado una diferencia significativa entre los tamaños medios de los ejes longitudinales: *B. pertussis* Tohama I en fase virulenta, (Bvg+), es más larga que Bp 537 y *B. pertussis* Tohama I Bvg-, que expresan una fase avirulenta (Figura 14), con valores medios de $1,59 \pm 0,11 \mu\text{m}$, $1,13 \pm 0,08 \mu\text{m}$ y $1,31 \pm 0,09 \mu\text{m}$, respectivamente. A su vez, el eje longitudinal de bacterias Bvg+ es mayor que el propio eje transversal, lo que le confiere a esta fase una forma más alargada. En cambio, en el análisis de las medidas de los ejes de bacterias avirulentas a pesar de que el eje longitudinal medio es más largo que el transversal medio, la diferencia entre ellos es menor. La longitud media del eje transversal no presenta diferencias significativas según la fase de virulencia. Respecto a la altura celular, *B. pertussis* Tohama I Bvg+ adquiere un valor medio de $0,58 \pm 0,02 \mu\text{m}$ significativamente mayor que el registrado en dicha bacteria en fase avirulenta: $0,47 \pm 0,01 \mu\text{m}$, y en la mutante avirulenta: $0,45 \pm 0,01 \mu\text{m}$.

Además, se llevó a cabo un estudio de la rugosidad de la superficie bacteriana en las dos fases de virulencia. Sin embargo, los resultados encontrados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los datos registrados: RMS bacterias virulentas= $9,85 \pm 0,54$ nm, RMS bacterias avirulentas= $9,44 \pm 0,48$ nm.

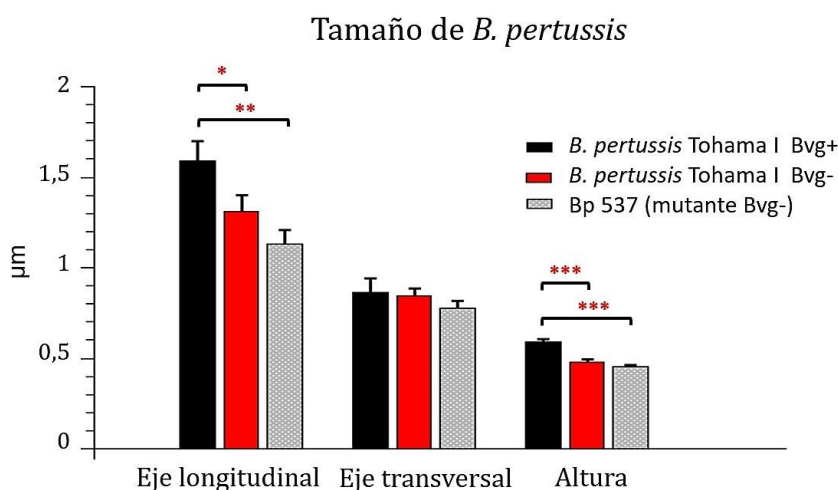


Figura 14. Características morfológicas de *B. pertussis* registradas mediante AFM. Se han hallado diferencias significativas en la longitud del eje longitudinal y en la altura entre *B. pertussis* Tohama I Bvg+ y las bacterias en condición avirulenta (*B. pertussis* Tohama I Bvg- y Bp 537). * representa diferencias significativas analizadas mediante el test de Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

II.4.3 Análisis de la presencia de FHA como método de monitoreo del cambio de fase en *B. pertussis*

II.4.3.a Análisis de la especificidad del anticuerpo comercial y la interacción antígeno-anticuerpo: FHA - AntiFHA.

Como paso inicial en los experimentos de Espectroscopía de Fuerza de molécula individual, se llevó a cabo un análisis de la interacción entre el anticuerpo comercial antiFHA, (a utilizar en los ensayos posteriores), y la proteína purificada FHA. Para ello, se analizó la interacción entre la proteína FHA adherida a una superficie de mica con una punta funcionalizada con el anticuerpo antiFHA. Para determinar la velocidad de retracción a utilizar en los futuros ensayos de interacción FHA (superficie bacteriana)-antiFHA, se llevó a cabo un estudio de fuerza (F) vs *loading rate* (lr) (o tasa de aplicación de fuerza), representado en la Figura 15 (ajuste lineal con un valor de R^2 : 0,92). La velocidad de aplicación de fuerza elegida para realizar el registro de datos fue de 500

nm/s, ya que es la velocidad de retracción intermedia de la curva F vs ld dentro del comportamiento lineal. La mediana estadística de la distribución de fuerzas de interacción registrados a esa velocidad de retracción es de ~ 160 pN, valor que se encuentra dentro del rango de valores dados como más probables para otro tipo de interacciones antígeno-anticuerpo y, así como, para esta misma interacción analizada en un trabajo previo del grupo (Schwesinger *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2011; Arnal *et al.*, 2015). A su vez se ha registrado un valor medio de 38,79 nm para la distancia desde el punto de contacto, el cual pertenece al rango esperado debido a la dimensión de la proteína filamentosa FHA y los anticuerpos, 50nm de longitud y de entre 15 y 20nm, respectivamente (Kajav *et al.*, 2001; Ido *et al.*, 2014). Finalmente se realizó un bloqueo de la muestra proteica incubando la proteína FHA adherida sobre mica, con una solución de anticuerpo purificado. Como era de esperar este análisis de datos nos revela una disminución en la cantidad de eventos de adhesión (Figura 15).

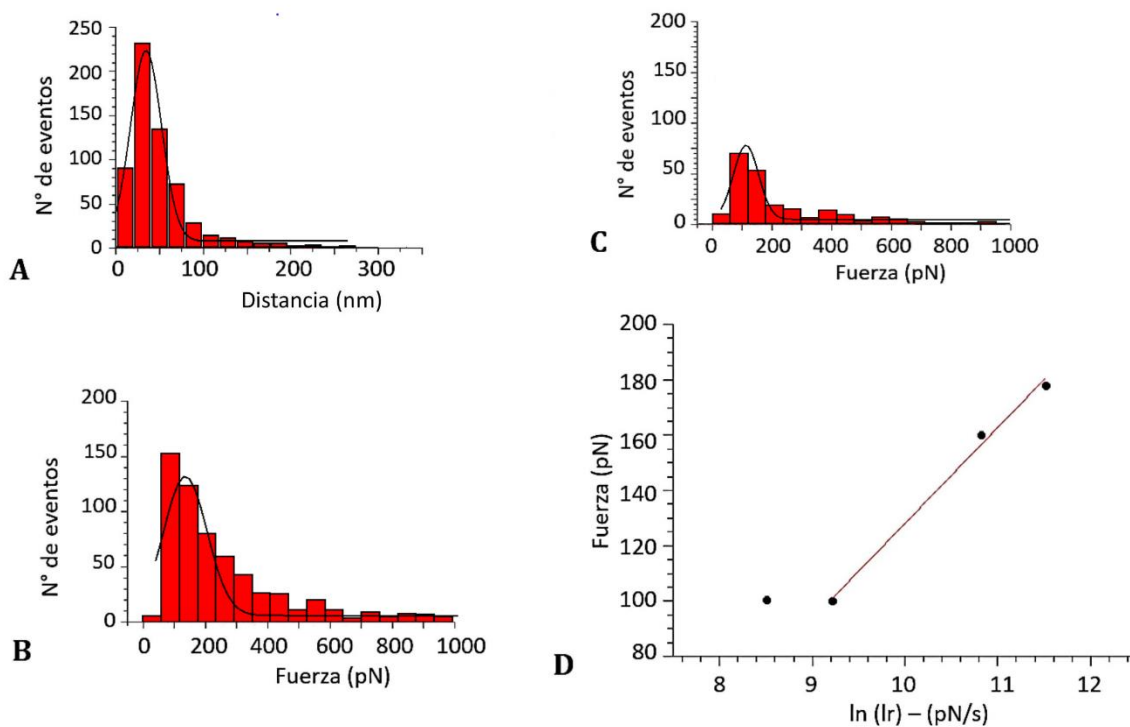


Figura 15. (A) Histograma de los valores de distancia entre el punto de contacto y el evento de interacción encontrados a la velocidad 500nm/s. (B) Histograma de la distribución de fuerzas registradas a una velocidad de 500 nm/s sobre una muestra de FHA. (C) Histograma de la distribución de fuerzas de interacción luego del bloqueo de la superficie con una solución de anticuerpo antiFHA, de los valores de interacción registrados a una velocidad de 500 nm/s, donde se registra una disminución en el número de eventos. (D) Relación de la Fuerza de interacción media para los 4 valores de *loading rate* que se probaron. Se observan dos segmentos diferentes, el segmento determinado por los tres últimos puntos fue ajustado con una función lineal. La velocidad seleccionada para los estudios corresponde a uno de los valores intermedios de ese segmento lineal.

II.4.3.b Análisis de la presencia de FHA en la superficie celular de *B. pertussis*

El cambio de una fase virulenta a otra avirulenta ha sido reportado como una respuesta adaptativa de esta bacteria a condiciones del entorno. Esta modificación fenotípica le otorga a *B. pertussis* nuevas propiedades que en los últimos años se han asociado a mayor tolerancia a antibióticos, a la sobrevivencia en ambientes limitados en nutrientes y a la forma de transmisión de un hospedador infectado a otro receptor. Si bien el análisis del cambio de fase entre el fenotipo virulento y avirulento puede ser corroborado mediante técnicas moleculares, las mismas son metodologías que demandan tiempos prolongados y no permiten llevar a cabo el análisis en tiempo real como tampoco a nivel de célula individual y a su vez conservar viva la célula durante el estudio. Dada la importancia de este tema decidimos evaluar el cambio de fase de virulencia en tiempos acotados mediante espectroscopía de molécula única enfocando el análisis en la presencia de la principal adhesina de *B. pertussis*: FHA, la cual no se expresa en fase avirulenta. De esta forma se analizaron los eventos de reconocimiento molecular utilizando un cantilever funcionalizado con el anticuerpo específico para dicha adhesina en distintos estados de virulencia antes y después de un período de incubación en diversas condiciones ambientales que se sabe afectan la expresión de factores de virulencia de *B. pertussis*. El estudio se llevó a cabo durante un periodo de 5 horas.

La especificidad del anticuerpo contra FHA utilizado en este trabajo además de ser chequeada mediante el análisis de la interacción antígeno-anticuerpo desarrollado en el apartado previo, fue testeado en este caso analizando la respuesta en bacterias *B. pertussis* 537, mutante avirulento que no expresa FHA (control negativo), y en *E. coli* (control adicional). Como puede verse en la Figura 16 el número de eventos en estos casos de reconocimiento inespecífico es bajo y se mantiene hasta las 5 horas del ensayo. Por otro lado, se encontró que las interacciones específicas para *B. pertussis* en fase virulenta (Bvg+) incubadas en medio SS sin agentes modulantes, también se mantienen constantes, es decir, la presencia de FHA en la membrana no varía durante ese periodo de tiempo en bacterias virulentas. La diferencia no significativa en el número de eventos de adhesión luego de 5 h en los casos donde las bacterias conservan su estado de virulencia y las condiciones del medio durante el proceso de adquisición de datos (“Bvg+”, “Bp 537” y “*E. coli*”), nos proporciona seguridad sobre la estabilidad de la funcionalización del cantilever durante ese periodo de tiempo.

Cuando se analizó la transición de una fase virulenta a avirulenta y viceversa empleando el agente modulador ($MgSO_4$) o eliminando el mismo del medio de incubación en el caso de células en fase avirulenta, se observan variaciones significativas en los eventos de reconocimiento molecular entre el primer registro de datos y luego de 5 horas (segundo y tercer par de barras en el sector izquierdo de la Figura 16). El número de eventos antígeno-anticuerpo registrado disminuye o incrementa cuando se analizan bacterias en proceso de transición virulenta-avirulenta o avirulenta-virulenta respectivamente (Figura 16).

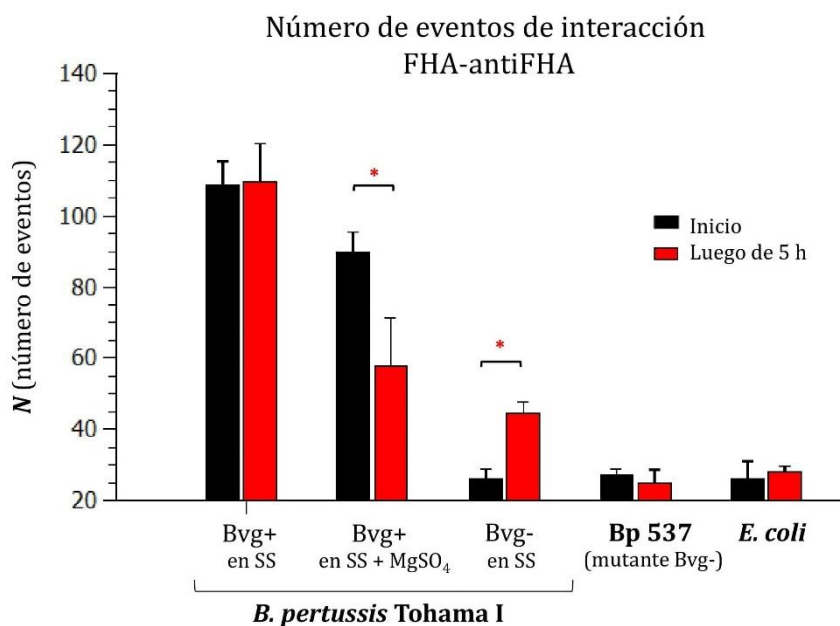


Figura 16. Número de eventos de adhesión entre una sonda funcionalizada con un anticuerpo específico antiFHA y *B. pertussis* en diferentes estados de virulencia registrados a partir de 30 curvas de fuerza por bacterias. El segundo par de barras de izquierda a derecha ("Bvg+ en $MgSO_4$ "), representa las medidas sobre bacterias *B. pertussis* Tohama I en fase Bvg+ incubadas durante el periodo de adquisición de datos en medio con 50 mM de $MgSO_4$, es decir, en condiciones que inducen un cambio fenotípico hacia la condición avirulenta. En sentido contrario, "Bvg-" representa un análisis sobre bacterias avirulentas en condiciones que inducen a la virulencia (en SS sin $MgSO_4$). También se analizó la respuesta con *E. coli* tomada como control negativo. * representan diferencias significativas (* $p < 0,05$). Las medidas se repitieron al menos en 3 bacterias por condición.

A través de este estudio pudimos demostrar en un corto período de tiempo el cambio de virulencia y el efecto de un agente modulante en *B. pertussis* mediante el registro de la presencia de una adhesina de membrana relacionada directamente con la virulencia bacteriana de manera específica y en tiempos reales. **De esta manera se confirmó que la AFM constituye una herramienta de valor para monitorear en tiempo real el**

cambio de fase de estos organismos ante la presencia de un agente modulador y la transición en la expresión de dicha proteína en un período de 5 horas.

II.4.4 Evaluación de la rigidez de cubierta celular de *B. pertussis* asociadas a la fase de virulencia

Una de las propiedades nanomecánicas fundamentales de las bacterias es la rigidez celular. En este trabajo esta propiedad fue analizada mediante AFM en las dos fases de virulencia y en condiciones que estimulen la transición entre fases. Ejemplos de curvas de fuerza representativas adquiridas mediante AFM y la relación entre la fuerza aplicada vs indentación para cada estado de virulencia se muestran en el anexo (Anexo: Figura 2 y 3). El estudio incluyó el análisis de la respuesta a lo largo de 5 h de incubación de *B. pertussis* avirulenta y *B. pertussis* virulenta en presencia y ausencia del agente modulante $MgSO_4$. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 17.

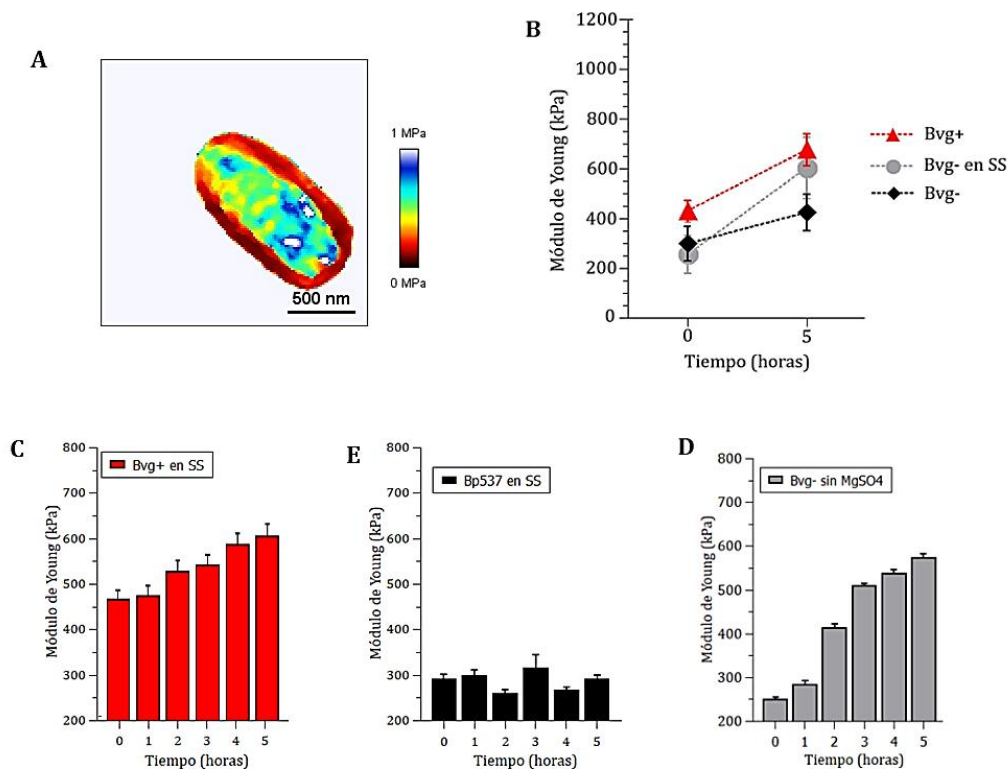


Figura 17. (A) Imagen de rigidez típica de una bacteria individual de *B. pertussis*. (B) Valores medios de E registrados mediante el análisis de la media estadística de cuatro bacterias para cada condición. *B. pertussis* Tohama I Bvg- (gris) en condiciones no moduladoras, *B. pertussis* Tohama I Bvg+ (rojo), y *B. pertussis* 537 (negro). Además, se muestra la rigidez de células individuales a lo largo de 5 horas de (C) *B. pertussis* virulenta en medio SS, (D) *B. pertussis* avirulenta en medio sin agente modulador (en transición a la fase virulenta); y (E) *B. pertussis* avirulenta.

Se determinó que la cepa avirulenta (Bp 537: negro), tiene menor rigidez y mantiene esta característica durante todo el periodo de monitoreo, sin presentar cambios significativos. En cuanto a *B. pertussis* en proceso de cambio de fase hacia la adquisición de virulencia los datos obtenidos luego de las 5 h (D, gris), muestran un incremento de rigidez de membrana externa. Finalmente, *B. pertussis* virulenta, presenta un incremento significativo en la rigidez durante ese periodo de estudio (C, rojo).

II.5 DISCUSIÓN

En la primera parte de este capítulo hemos descrito la puesta a punto de un protocolo, que resulta fácil de desarrollar y demanda un tiempo de preparación corto, dirigido a optimizar la inmovilización de *B. pertussis* a una superficie de vidrio o placa de Petri para el posterior estudio de las células individuales por AFM. Para este procedimiento hemos seleccionado un “conector” o linker no perjudicial para las bacterias como la PLL.

Las bacterias virulentas expresan adhesinas que las anclan al sustrato, en general, y son esenciales en este proceso, las cuales disminuyen en presencia de agentes moduladores de virulencia como el MgSO₄. En este trabajo ha podido comprobarse este cambio en la presencia de la adhesina FHA en el corto periodo de 5 h en situaciones de cambio de estado de virulencia. Estas adhesinas son esenciales para la interacción con otras células así como con la superficie a colonizar. Por lo tanto, hemos demostrado la utilidad de la técnica para estudiar y llevar a cabo un seguimiento en la expresión de este factor de virulencia.

El estudio de las propiedades mecánicas a nivel de la nanoescala de bacterias en un medio líquido similar al de condiciones fisiológicas ha sido previamente empleado en otros sistemas. Por ejemplo, Gaboriaud y colaboradores, (2005), investigaron las propiedades nanomecánicas del bacilo gram-negativo *Shewanella putrefaciens* en soluciones acuosas y observaron que un aumento en el pH del medio de cultivo causa un aumento en la altura de las células y una disminución en la rigidez de la capa polimérica. Longo y colaboradores, (2013), caracterizaron las propiedades mecánicas de la membrana externa de *E. coli* analizando la superficie celular con AFM, y reportaron que la membrana posee áreas más rígidas asociadas posiblemente con la estructura intracelular. Las células

bacterianas pueden mostrar variaciones locales importantes de elasticidad debido a la composición compleja de sus paredes (Touhami *et al.*, 2003). En las imágenes de rigidez adquiridas, *B. pertussis* presenta polos de elasticidad que podrían deberse a la distribución de adhesinas de membrana tal como sugiere Arnal *et al.*, (2015), que correlaciona con los nanodominios de la adhesina FHA en la superficie de *B. pertussis* con áreas más rígidas en la envoltura mediante el análisis de eventos específicos de reconocimiento molecular. Las medidas de rigidez de cubierta evaluadas mediante la determinación del módulo de Young mostraron la variación de esta característica entre las fases de virulencia, coincidiendo con lo mencionado previamente para *Listeria monocytogenes*: la rigidez de las células de *L. monocytogenes* virulentas y avirulentas se determinaron a partir de datos de fuerza de indentación, utilizando el modelo de Hertz para el ajuste de datos, medidos en células en agua (Figura 18) y se encontró que las cepas virulentas eran más rígidas ($E: 97,6 \pm 16,5$ kPa) en comparación a cepas avirulentas ($E: 52,4 \pm 8,4$ kPa) (Park & Abu-Lail, 2010).

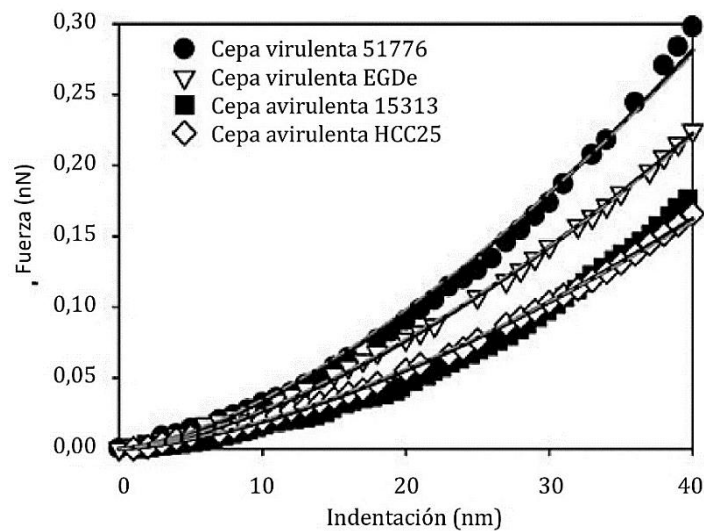


Figura 18. Curvas de fuerza-indentación de cepas virulentas y avirulentas de *L. monocytogenes*. Cada curva es el promedio de 225 curvas individuales medidas en quince células individuales tomadas de tres cultivos diferentes. Imagen adaptada de Park y Abu-Lail, 2010.

Muchos estudios han comenzado a revelar que las bacterias y patógenos en general pueden ser impulsados a adoptar diversas formas debido a una serie de presiones selectivas (Yang *et al.*, 2016). Por ejemplo, recientemente se ha demostrado la evolución de la forma celular de *Burkholderia cenocepacia* durante la infección a largo plazo en

pacientes con fibrosis quística (FQ), desde los bastones típicos hasta la morfología más cercana a los cocos (Hassan *et al.*, 2019). También, se ha postulado que *Caulobacter crescentus* puede haber evolucionado a su forma redondeada para mejorar la colonización de la superficie en entornos donde se encuentra sometida a intenso flujo, lo que indica que la morfología bacteriana es potencialmente el resultado de la adaptación a entornos mecánicos específicos (Persat *et al.*, 2014, 2015). Ha sido importante poder determinar diferencias entre las fases de virulencia ya que estas características podrían estar directamente relacionadas con la capacidad de adhesión e infección, así como con la transmisión.

II. 6 BIBLIOGRAFÍA

- Abramson T, Kedem H, Relman DA. Proinflammatory and proapoptotic activities associated with *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *Infect Immun*. 2001, 69: 2650–2658.
- Almqvist N, Bhatia R, Primbs G, Desai N, Banerjee S, Lal R. Elasticity and adhesion force mapping reveals real-time clustering of growth factor receptors and associated changes in local cellular rheological properties. *Biophys J*. 2004, 86(3):1753-62.
- Alsteens D, Garcia MC, Lipke PN, Dufrière YF. Force-induced formation and propagation of adhesion nanodomains in living fungal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010, 107(48):20744-9. doi: 10.1073/pnas.1013893107.
- Arnal L, Serra DO, Cattelan N, Castez MF, Vázquez L, Salvarezza RC, Yantorno OM, Vela ME. Adhesin contribution to nanomechanical properties of the virulent *Bordetella pertussis* envelope. *Langmuir*. 2012, 28(19):7461-9. doi: 10.1021/la300811m.
- Arnal L, Longo G, Stupar P, Castez MF, Cattelan N, Salvarezza RC, Yantorno OM, Kasas S, Vela ME. Localization of adhesins on the surface of a pathogenic bacterial envelope through atomic force microscopy. *Nanoscale*. 2015, 7(41):17563-72. doi: 10.1039/c5nr04644k.
- Bhat SV, Sultana T, Körnig A, McGrath S, Shahina Z, Dahms TES. Correlative atomic force microscopy quantitative imaging-laser scanning confocal microscopy quantifies the impact of stressors on live cells in real-time. *Sci Rep*. 2018, 8(1):8305. doi: 10.1038/s41598-018-26433-1.
- Beaussart A, Alsteens D, El-Kirat-Chatel S, Lipke PN, Kucharíková S, Van Dijk P, Dufrière YF. Single-molecule imaging and functional analysis of Als adhesins and mannans during *Candida albicans* morphogenesis. *ACS Nano*. 2012, 6(12):10950-64. doi: 10.1021/nn304505s.
- Binnig G, Gerber CH, Stoll E, Albrecht TR, Quate CF. Atomic resolution with atomic force microscope. *Europhys*. 1987, 3:1281-1286.
- Butt HJ, Jaschke M, Ducker W. Measuring surface forces in aqueous electrolyte solution with the atomic force microscope. *Bioelectrochem Bioenerg*. 1995, 38:191-201.
- Cappella, BGD. Force Distance Curves by Atomic Force Microscopy. *Surf Sci Rep*. 1999, 34, 1-104.
- Carbonetti NH. Immunomodulation in the pathogenesis of *Bordetella pertussis* infection and disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2007, 7: 272–278.
- Carvalho FA, Martins IC, Santos NC. Atomic force microscopy and forcé spectroscopy on the assessment of protein folding and functionality. *Arch Biochem Biophys*. 2013, 531(1-2):116-27. doi: 10.1016/j.abb.2012.11.007.
- Cheung DT, Nimni ME. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde II. Reaction with monomeric and polymeric collagen. *Connect Tissue Res*. 1982, 10(2):201-16.
- Chtcheglova LA, Hinterdorfer P. Simultaneous topography and recognition imaging on endothelial cells. *J Mol Recognit*. 2011, 24:788–79412.

- Delacroix, S. Studying the interactions between *Staphylococcus aureus* and atopic dermatitis skin cells using atomic force microscopy. *Faculté des bioingénieurs, Université catholique de Louvain*, 2018. Prom. : Dufrière, Yves ; Feuillie, Cécile. <http://hdl.handle.net/2078.1/thesis:13623>.
- Drolle E, Hane F, Lee B, Leonenko Z. Atomic force microscopy to study molecular mechanisms of amyloid fibril formation and toxicity in Alzheimer's disease. *Drug Metab Rev.* 2014, 46(2):207-23. doi: 10.3109/03602532.2014.882354.
- Dufrière YF. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J Bacteriol.* 2002, 184(19):5205-13. doi: 10.1128/jb.184.19.5205-5213.2002.
- Dufrière YF, Hinterdorfer P. Recent progress in AFM molecular recognition studies. *Pflugers Arch.* 2008, 456(1):237-45.
- Dufrière YF, Ando T, Garcia R, Alsteens D, Martinez-Martin D, Engel A, Gerber C, Müller DJ. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nat Nanotechnol.* 2017, 12(4):295-307. doi:10.1038/nnano.2017.45.
- Dupres V, Menozzi FD, Loch C, Clare BH, Abbott NL, Cuenot S, Bompard C, Raze D, Dufrière YF. Nanoscale mapping and functional analysis of individual adhesins on living bacteria. *Nat Methods.* 2005, 2(7):515-20. Erratum in: *Nat Methods.* 2005, 2(8):631.
- Dumais J. Modes of deformation of walled cells. *J Exp Bot.* 2013, 64(15):4681-95. doi: 10.1093/jxb/ert268.
- El-Kirat-Chatel S, Boyd CD, O'Toole GA, Dufrière YF. Single-molecule analysis of *Pseudomonas fluorescens* footprints. *ACS Nano.* 2014, 25;8(2):1690-8. doi: 10.1021/nn4060489.
- El-Kirat-Chatel S, Beaussart, A. Probing Bacterial Adhesion at the Single-Molecule and Single-Cell Levels by AFM-Based Force Spectroscopy. *Nanoscale Imaging.* 2018, 403-414. doi:10.1007/978-1-4939-8591-3_24.
- Finger H, von Koenig CHW. Bordetella. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 31. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7813/>.
- Gaboriaud F, Baillet S, Dague E, Jorand F. Surface structure and nanomechanical properties of *Shewanella putrefaciens* bacteria at two pH values (4 and 10) determined by atomic force microscopy. *J Bacteriol.* 2005, 187(11):3864-8.
- Gavara N. A beginner's guide to atomic force microscopy probing for cell mechanics. *Microsc Res Tech.* 2017, 80(1):75-84. doi: 10.1002/jemt.22776.
- Goodman FO, Garcia N. Roles of the attractive and repulsive forces in atomic-force microscopy. *Phys Rev B.* 1991, 43(6):4728-4731. doi: 10.1103/PhysRevB.43.4728.
- Hassan AA, Vitorino MV, Robalo T, Rodrigues MS, Sá-Correia I. Variation of *Burkholderia cenocepacia* cell wall morphology and mechanical properties during cystic fibrosis lung infection, assessed by atomic force microscopy. *Sci Rep.* 2019, 9(1):16118. doi: 10.1038/s41598-019-52604-9.
- Heinisch JJ, Lipke PN, Beaussart A, El Kirat Chatel S, Dupres V, Alsteens D, Dufrière YF. Atomic force microscopy - looking at mechanosensors on the cell surface. *J Cell Sci.* 2012, 125(Pt 18):4189-95. doi: 10.1242/jcs.106005.
- Heinisch JJ, Dupres V, Wilk S, Jendretzki A, Dufrière YF. Single-molecule atomic force microscopy reveals clustering of the yeast plasma-membrane sensor Wsc1. *PLoS One.* 2010, 5(6):e111104. doi: 10.1371/journal.pone.0011104.
- Henderson MW, Inatsuka CS, Sheets AJ, Williams CL, Benaron DJ, Donato GM, Gray MC, Hewlett EL, Cotter PA. Contribution of Bordetella filamentous hemagglutinin and adenylate cyclase toxin to suppression and evasion of interleukin-17-mediated inflammation. *Infect Immun.* 2012, 80:2061-2075.34.
- Hinterdorfer P, Dufrière YF. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nat Methods.* 2006, 3:347-355.15.
- Hoffman CL, Gonyar LA, Zacca F, Zacca F, Sisti F, Fernandez J, Wong T, Damron FH, Hewlett EL. *Bordetella pertussis* can be motile and express flagellum-like structures. *MBio.* 2019, 10(3):e00787-19. doi:10.1128/mBio.00787-19.
- Ido S, Kimiya H, Kobayashi K, Kominami H, Matsushige K, Yamada H. Immunoactive two-dimensional self-assembly of monoclonal antibodies in aqueous solution revealed by atomic force microscopy. *Nat Mater.* 2014, 13:264-270.
- Jembrek MJ, Šimić G, Hof PR, Šegota S. Atomic force microscopy as an advanced tool in neuroscience. *Transl Neurosci.* 2015, 6(1):117-130. doi: 10.1515/tnsci-2015-0011.

- JPK Instruments: Nano Wizard AFM handbook. version 2-2a; 2012. <http://www.nanophys.kth.se/nanophys/facilities/nfl/afm/jpk/manuf-manuals/handbook-2.2a.pdf>.
- Kajava, AV, Cheng N, Cleaver R, Kessel M, Simon MN, Willery E, Jacob-Dubuisson F, Loch C, Steven AC. Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins. *Mol Microbiol.* 2001, 42, 279-292.
- Kasas S, Longo G, Dietler G. Mechanical properties of biological specimens explored by atomic force microscopy. *Phys D: Appl Phys.* 2013, 46 133001. doi: 10.1088/0022-3727/46/13/133001
- Kuiukina MS, Korshunova IO, Rubtsova EV, Ivshina IB. Methods of microorganism immobilization for dynamic atomic-force studies. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 2014, 50(1):7-16.
- Lesne E, Coutte L, Solans L, Slupek S, Debie AS, Dhennin V, Froguel P, Hot D, Loch C, Antoine R, Jacob-Dubuisson F. Distinct virulence ranges for infection of mice by *Bordetella pertussis* revealed by engineering of the sensor-kinase BvgS. *PLoS One.* 2018, 13(10):e0204861.
- Longo G, Alonso-Sarduy L, Rio LM, Bizzini A, Trampuz A, Notz J, Dietler G, Kasas S. Rapid detection of bacterial resistance to antibiotics using AFM cantilevers as nanomechanical sensors. *Nat Nanotechnol.* 2013, 8(7):522-6. doi: 10.1038/nnano.2013.120.
- Louise Meyer R, Zhou X, Tang L, Arpanaei A, Kingshott P, Besenbacher F. Immobilisation of living bacteria for AFM imaging under physiological conditions. *Ultramicroscopy.* 2010, 110(11):1349-57. doi: 10.1016/j.ultramic.2010.06.010.
- Martinez de Tejada G, Cotter PA, Heininger U, Camilli A, Akerley BJ, Mekalanos JJ, Miller JF. Neither the Bvg-phase nor the vrg6 locus of *Bordetella pertussis* is required for respiratory infection in mice. *Infect Immun.* 1998, 66(6):2762-8.
- Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev.* 2005, 18:326-382.
- Menozzi FD, Boucher PE, Riveau G, Gantiez C, Loch C. Surface-associated filamentous hemagglutinin induces autoagglutination of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1994, 62: 4261-4269.
- Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques.* 2004, 37(5):790-6, 798-802.
- Moon K, Bonocora RP, Kim DD, Chen Q, Wade JT, Stibitz S, Hinton DM. The BvgAS Regulon of *Bordetella pertussis*. *mBio.* 2017, 8(5):e01526-17. doi: 10.1128/mBio.01526-17.
- Moreno N, Chevalier M, Ronzon F, Manin C, Dupuy M, Krell T, Rieu JP. Unbinding forces of single pertussis toxin-antibody complexes measured by atomic force spectroscopy correlate with their dissociation rates determined by surface plasmon resonance. *J Mol Recognit.* 2011, 24:1105-1114.
- Muller DJ, Dufrene YF. Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. *Trends Cell Biol.* 2011, 21:461-469.
- Oh YJ, Hinterdorfer P. Sensing the Ultrastructure of Bacterial Surfaces and Their Molecular Binding Forces Using AFM. *Methods Mol Biol.* 2018, 1814:363-372. doi: 10.1007/978-1-4939-8591-3_21.
- Oh YJ, Hubauer-Brenner M, Gruber HJ, Cui Y, Traxler L, Siligan C, Park S, Hinterdorfer P. Curli mediate bacterial adhesion to fibronectin via tensile multiple bonds. *Sci Rep.* 2016, 6:33909. doi: 10.1038/srep33909.
- Park BJ, Abu-Lail NI. Variations in the nanomechanical properties of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes*. *Soft Matter.* 2010, 6(16):3898-3909. doi: 10.1039/b927260g.
- Persat A, Stone HA, Gitai Z. The curved shape of *Caulobacter crescentus* enhances surface colonization in flow. *Nat Commun.* 2014, 5:3824. doi: 10.1038/ncomms4824.
- Persat A, Nadell CD, Kim MK, Ingremeau F, Siryaporn A, Drescher K, Wingreen NS, Bassler BL, Gitai Z, Stone HA. The mechanical world of bacteria. *Cell.* 2015, 161(5):988-997. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.005.
- Radmacher M, Cleveland JP, Fritz M, Hansma HG, Hansma PK. Mapping interaction forces with the atomic force microscope. *Biophysical Journal.* 1994, 66, 2159-2165.
- Relman D, Tuomanen E, Falkow S, Golenbock DT, Saukkonen K, Wright SD. Recognition of a bacterial adhesin by an integrin: mac-rophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell.* 1990, 61:1375-1382.
- Sarkar A, Caamano S, Fernandez JM. The elasticity of individual titin PEVK exons measured by single molecule atomic force microscopy. *J Biol Chem.* 2005, 280(8):6261-4.

- Schwesinger F, Ros R, Strunz T, Anselmetti D, Guntherodt HJ, Honegger A, Jeremius L, Tiefenauer L, Pluckthun A. Unbinding forces of single antibody-antigen complexes correlate with their thermal dissociation rates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, 97: 9972-9977.
- Serra DO, Conover MS, Arnal L, Sloan GP, Rodriguez ME, Yantorno OM, Deora R. FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One*. 2011, 6(12):e28811. doi: 10.1371/journal.pone.0028811.
- Scheller EV, Cotter PA. Bordetella filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential. *Pathog Dis*. 2015, 73(8):ftv079. doi: 10.1093/femspd/ftv079.
- Shere L, Zhang ZJ, Preece JA. Application of Atomic Force Microscopy in Formulation Engineering: A versatile tool for surface analysis. *Johnson Matthey Technol Rev*. 2018, 62:(4),438. doi:10.1595/205651318x15342609861275.
- Smolyakov G, Formosa-Dague C, Séverac C, Duval R, Dague E. Highspeed indentation measures by FV, QI and QNM introduce a new understanding of bionanomechanical experiments. *Micron, Elsevier*. 2016, 85, 8-14. doi: 10.1016/j.micron.2016.03.002. hal-01552823.
- Stainer DW & Scholte MJ. A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol*. 1970, 63(2), 211-220.
- Touhami A, Hoffmann B, Vasella A, Denis FA, Dufrêne YF. Aggregation of yeast cells: direct measurement of discrete lectin-carbohydrate interactions. *Microbiology*. 2003, 149(Pt 10):2873-8.
- Touhami A, Nysten B, Dufrêne YF. Nanoscale mapping of the elasticity of microbial cells by atomic force microscopy. *Langmuir*. 2003, 19:4539-4543. <https://doi.org/10.1021/la034136x>.
- Vadillo-Rodríguez V, Busscher HJ, Norde W, De Vries J, Dijkstra RJ, Stokroos I, Van Der Mei HC. Comparison of atomic force microscopy interaction forces between bacteria and silicon nitride substrata for three commonly used immobilization methods. *Appl Environ Microbiol*. 2004, 70(9):5441-6.
- van Teeseling MCF, de Pedro MA, Cava F. Determinants of bacterial morphology: from fundamentals to possibilities for antimicrobial targeting. *Front Microbiol*. 2017, 10;8:1264. doi: 10.3389/fmicb.2017.01264.
- Veeco Instruments Inc. A Practical Guide to SPM Scanning Probe Microscopy. © 2005
- Vidakovics MLA, Lamberti Y, van der Pol WL, Yantorno O, Rodriguez ME. Adenylate cyclase influences filamentous haemagglutinin-mediated attachment of *Bordetella pertussis* to epithelial alveolar cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006, 48:140-147.
- Wang YK, Krasnopeeva E, Lin SY, Bai F, Pilizota T, Lo CJ. Comparison of *Escherichia coli* surface attachment methods for single-cell microscopy. *Sci Rep*. 2019, 9(1):19418. doi: 10.1038/s41598-019-55798-0.
- Yang DC, Blair KM, Salama NR. Staying in Shape: the impact of cell shape on bacterial survival in diverse environments. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016, 80(1):187-203. doi: 10.1128/MMBR.00031-15.
- Young KD. The selective value of bacterial shape. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006, 70(3):660-703.

CAPÍTULO III

Análisis de la respuesta de *B. pertussis* a la presencia de antibióticos mediante el estudio de propiedades nanomecánicas

III.1 INTRODUCCIÓN

La situación actual de enfermedades infecciosas es crítica a nivel mundial como consecuencia del incremento de la resistencia a agentes antimicrobianos, lo cual tiene en alerta a microbiólogos y médicos. Aunque el fracaso del tratamiento con antibióticos generalmente se atribuyó al aumento evolutivo de la resistencia, otros mecanismos como la tolerancia y la persistencia también pueden ayudar a las bacterias a sobrevivir a dicha exposición. Se ha demostrado en los últimos años que las infecciones persistentes involucran bacterias de crecimiento lento, que son muy difíciles de inhibir con antibióticos dirigidos a los procesos biosintéticos en las células en crecimiento (Hurdle *et al.*, 2011). *B. pertussis* no se encuentra exceptuada de esta realidad, en los últimos años se ha reportado la detección de aislados clínicos resistentes a los antibióticos utilizados en la práctica clínica (Ohtsuka *et al.*, 2009; Guillot *et al.*, 2012, Shahcheragh *et al.*, 2014, Safarchi *et al.*, 2019).

La envoltura bacteriana es sumamente susceptible al efecto de los antibióticos, siendo el target de un gran número de este tipo de terapias. Diversos factores antimicrobianos pueden provocar daños en una célula bacteriana, que pueden llegar a modificar la turgencia celular y la flexibilidad de las capas externas. Aunque las técnicas microbiológicas tradicionales llevadas a cabo en grandes poblaciones de células continúan proporcionando información vital para el tratamiento clínico de las infecciones, el AFM dio lugar al estudio del efecto de agentes antimicrobianos en células individuales a nivel de nanoescala en cortos períodos de tiempo. Diversos trabajos de investigación han demostrado el gran poder de este tipo de microscopía para comprender cómo cambian las paredes celulares, la topografía bacteriana, la química de la superficie y las propiedades mecánicas en respuesta a los agentes antimicrobianos en condiciones fisiológicas, arrojando luz sobre el modo de acción de los mismos (Eaton *et al.*, 2008; Perry *et al.*, 2009, Alves *et al.*, 2010; Formosa *et al.*, 2012; Longo *et al.*, 2013, Pogoda *et al.*, 2017).

Entre las estrategias de *B. pertussis* para la persistencia dentro del huésped se podrían mencionar la modulación fenotípica de la virulencia entre fases virulenta y avirulenta (característica de esta especie) (Deora *et al.*, 2001; Merkel *et al.*, 2003), la vida intracelular (Friedman *et al.*, 1992; Hellwig *et al.*, 1999; Lamberti *et al.*, 2008; Cafiero *et al.*, 2018) y la formación de

comunidades bacterianas (Arnal *et al.*, 2015; Cattelan *et al.*, 2016). La fase virulenta de esta bacteria es asociada con la colonización e infección del hospedador, así como la fase avirulenta se ha asociado con la transmisión bacteriana, persistencia y resistencia a antibióticos (Moon *et al.*, 2017). Por otro lado, las comunidades bacterianas dan lugar a la protección contra las condiciones adversas del entorno y las defensas del hospedador, permitiendo la contención de bacterias persistentes en su interior, así como una reducción en la capacidad de penetración de agentes antimicrobianos. Tanto las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) como las concentraciones bactericidas mínimas (CBM) de los antibióticos, son hasta 10-1000 veces más altas para bacterias en comunidad que para las bacterias planctónicas (Patel, 2005; Høiby *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2019; Dieltjens *et al.*, 2020). Actualmente se requieren estudios sobre la resistencia a antibióticos de las células que forman parte de un grupo bacteriano y un concomitante desarrollo de nuevas estrategias como métodos de análisis.

En este capítulo, se muestran los resultados del análisis del efecto de antibióticos sobre propiedades nanomecánicas de las células de *B. pertussis* en fase virulenta y avirulenta en condiciones acuosas controladas. Se analizaron antibióticos con distintos mecanismos de acción con el objetivo de monitorear los cambios estructurales *in situ* de las células a nivel de nanoescala en respuesta a las condiciones de estrés impuestas por los mismos. Además, se evaluó la respuesta a antibióticos de células que forman parte de pequeños grupos bacterianos adheridos a una superficie. Si bien han sido reportados varios trabajos sobre el efecto de antibióticos en membranas celulares, por ejemplo, para *E. coli* y *Bacillus subtilis* (Pogoda *et al.*, 2017; Laskowski *et al.*, 2018), los cambios en propiedades nanomecánicas de la fase virulenta y avirulenta de *B. pertussis* en respuesta al tratamiento con antibióticos no se conocen hasta el momento. En nuestro conocimiento, este es el primer estudio que analiza la respuesta a antibióticos mediante el seguimiento de características nanomecánicas de bacterias en distintos estados de virulencia y se lleva a cabo una comparación entre células individuales vs agrupadas en *B. pertussis*.

III.2 OBJETIVOS

*Estudiar mediante un análisis de propiedades nanomecánicas la respuesta de *B. pertussis* a la presencia de antibióticos según la fase de virulencia.

*Analizar la respuesta a dos antibióticos de células de *B. pertussis* que forman parte de grupos celulares en un corto período de tiempo mediante el estudio de la rigidez celular a través de AFM.

III.3 MATERIALES Y MÉTODOS

III.3.1 Bacterias y condiciones de cultivo

Las cepas que se utilizaron en este capítulo fueron: *B. pertussis* Tohama I (Instituto Pasteur, Paris, France -CIP 8132-) y Bp 537 que es una cepa bloqueada en fase avirulenta derivada de *B. pertussis* Tohama I. Las cepas se crecieron en Agar Bordet-Gengou (ABG) suplementado con 1% w/v de Bactopectona (Difco) y 15% v/v de sangre desfibrinada de carnero (Instituto Biológico de La Plata). Las colonias fueron re-cultivadas por 48 h a 37°C y luego inoculadas en erlenmeyers de 100 mL conteniendo 30 mL del medio Stainer-Sholte (SS). Los frascos fueron incubados por 24 h a 37°C en agitación a 160 rpm. La concentración inicial fue DO₆₅₀: 0,2; luego de 24 h de crecimiento, el cultivo fue centrifugado a 8000 g por 5 minutos y lavado 4 veces con PBS estéril. Las cepas de *B. pertussis* fueron moduladas a la condición avirulenta (Bvg-) por pasajes sucesivos en medio sólido ABG y líquido SS, adicionado con MgSO₄ a una concentración final de 50 mM.

III.3.2 Ensayo de resistencia a antibióticos mediante el método convencional de dilución en medio de cultivo

El análisis inicial de resistencia a antibióticos fue llevado a cabo siguiendo las pautas establecidas por *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Wayne 2012). Estos ensayos consisten en la determinación de la CIM, definida como la mínima cantidad de agente antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento del microorganismo en condiciones normalizadas; y la determinación de la CBM, definida como la mínima cantidad de antibiótico capaz de matar el 99,9% de los microorganismos presentes en una muestra inoculada y tratada en condiciones estandarizadas. Los antibióticos utilizados fueron seleccionados en base a los utilizados en el tratamiento clínico de la infección y a su mecanismo de acción: eritromicina (Sigma- E6376) y ampicilina (Sigma-A0166).

A partir de un cultivo líquido de 24 h de *B. pertussis* en medio líquido SS, fueron inoculados tubos con 2 mL de medio SS con concentraciones crecientes de antibióticos.

Como control de la esterilidad del medio de cultivo fueron utilizados dos tubos sin inocular, con y sin la presencia de antibiótico respectivamente. Además, como control de crecimiento, se registraron medidas en un tubo inoculado sin antibióticos. La concentración inicial siempre fue ajustada a DO_{650} : 0,2. Los cultivos fueron incubados a 37°C en agitación durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, aquella concentración mínima de antibiótico correspondiente al tubo donde no se registraba crecimiento fue la considerada como CIM. El crecimiento fue monitoreado mediante medidas de densidad óptica a través de la lectura de absorbancia a 650 nm de cada suspensión de cultivo (Figura 1A). Una gota de 20 μL proveniente de cada cultivo líquido de 24 h utilizado para la determinación de la CIM, fue inoculada en placas ABG e incubada durante al menos 48 h a 37°C . Una vez transcurrido este tiempo, se analizaron los casos donde no se registró crecimiento alguno, es decir aquellos donde las bacterias procedían de cultivos líquidos en los que estaban muertas. A partir de los mismos, se determinó la CBM como la menor concentración de antibiótico presente en los cultivos líquidos de los inóculos que luego no crecieron en placa ABG. En todos los casos se sembraron al menos 3 gotas de cada cultivo para tener los replicados necesarios (Figura 1B). Todos los experimentos fueron realizados al menos tres veces para asegurar su reproducibilidad.

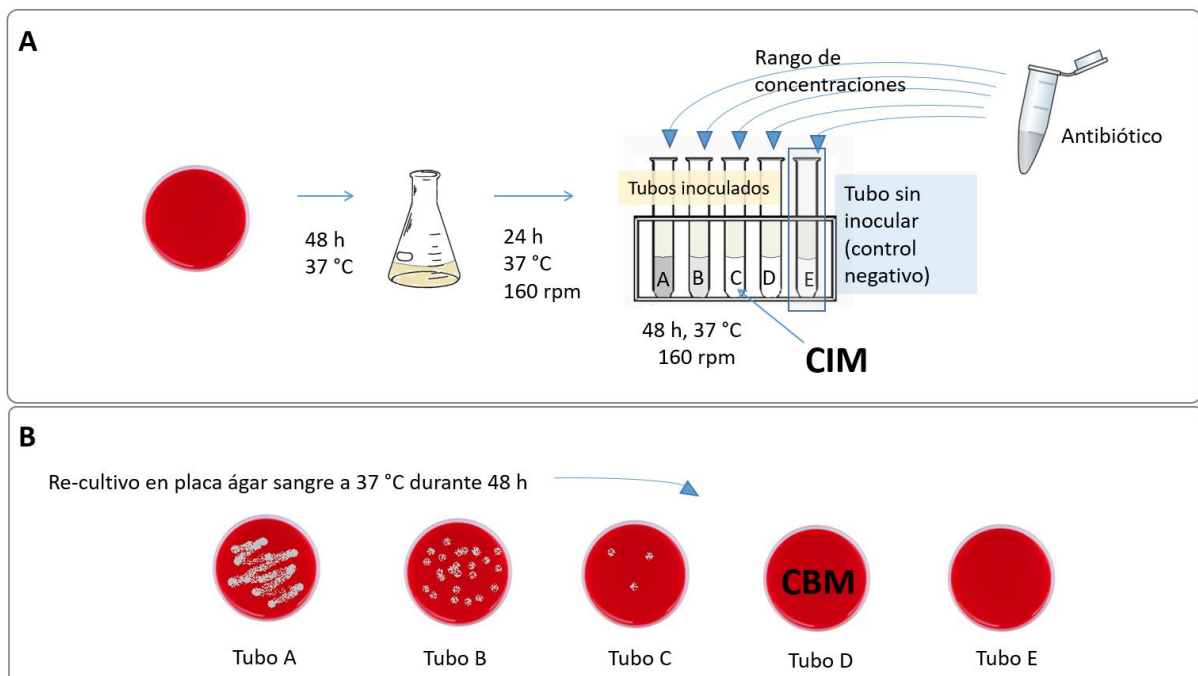


Figura 1. Análisis de resistencia a antibióticos mediante el método convencional de dilución en medio líquido. (A) CIM: Concentración de antibiótico más baja correspondiente a los tubos donde la densidad óptica registrada es igual a la del control negativo o tubo sin inocular (tubo C); (B) CBM: concentración de antibiótico correspondiente al cultivo donde no se registra crecimiento al repicar en placas agar sangre luego del cultivo líquido de 24 h (tubo D).

III.3.3 Estudio del efecto de la exposición a antibióticos sobre las propiedades nanomecánicas de *B. pertussis* en bacterias individuales

Las bacterias procedentes de los cultivos líquidos de 24 h fueron centrifugadas a 8000 g por 5 minutos y lavados 4 veces con PBS estéril. Luego, el cultivo se concentró en medio líquido SS fresco, a una DO_{650} : 5, con el fin de lograr una suspensión con cantidad de bacterias suficiente para conseguir cubrir toda la superficie. Al mismo tiempo, se incubaron placas de Petri con 100 μ L de poli-L-lisina 0,01% comercial (P4707, SIGMA) durante 20 minutos a 37 °C hasta que la superficie se encuentre seca. Finalmente, 200 μ L de la suspensión bacteriana concentrada fueron incubados sobre la placa de Petri, funcionalizada con PLL, durante 45 minutos a 37 °C y se realizó un último lavado con PBS estéril previo a la ubicación de la muestra en el AFM.

Para analizar el efecto de los antibióticos sobre las propiedades nanomecánicas de cubierta bacteriana se llevó a cabo un análisis que incluyó la determinación de altura celular, rugosidad y rigidez de la membrana bacteriana antes y después de un periodo máximo de 5 horas de exposición a antibióticos en bacterias virulentas y avirulentas. Debido a que el análisis se realiza comparativamente según las fases de virulencia, el periodo de 5 horas fue elegido a partir de los resultados expuestos en el capítulo anterior sobre la rigidez en el tiempo de bacterias creciendo en medio SS (ver Figura 16 C del capítulo II). Los antimicrobianos elegidos fueron la eritromicina y la ampicilina. El primero es un macrólido de elección para el tratamiento clínico de la infección y posee un mecanismo de acción sobre los ribosomas que lo clasifica como bacteriostático. La ampicilina es un antimicrobiano bactericida, que actúa específicamente sobre la capa de proteoglicanos de la pared celular.

Luego de ubicar una bacteria individual en el campo de observación de la imagen del AFM sobre la placa de Petri, compartimento donde la muestra está adherida y se lleva a cabo el registro de datos, se toma la primera QI en el momento considerado como tiempo inicial: 0 h. A continuación, se le agrega el antibiótico a dicho compartimento a una concentración igual a la CBM con el objetivo de poder analizar los efectos de los antibióticos rápidamente. Después de 5 h de incubación con el antibiótico, sobre la misma bacteria analizada en el tiempo 0 h, conservando las condiciones de registro de datos y utilizando el mismo cantilever, se lleva a cabo la adquisición de una nueva QI.

El registro de datos se llevó a cabo mediante la adquisición de QI con un equipo de AFM JPK NanoWizard II. Los parámetros utilizados para llevar a cabo las medidas, así como el modo de análisis, fueron los mismos que se han mencionado previamente en el apartado: “*Análisis de características morfológicas y propiedades nanomecánicas de bacterias individuales de B. pertussis*” del capítulo previo. Brevemente, se determinó un valor de setpoint force: 1 nN, máxima extensión en el eje Z (perpendicular a la superficie): 1000 nm, tiempo de retracción y de extensión: 500 ms cada uno, número de pixeles: 64 x 64 o 128 x 128 (dependiendo del caso). Las QI adquiridas tienen un tamaño entre 2 x 2 o 2,5 x 2,5 μm^2 y corresponden a bacterias individuales. La información fue analizada con el software *JPK Data processing*. Se determinó la medida de los ejes longitudinal y transversal y la altura media, mediante la opción *cross section*, y el módulo de Young mediante un ajuste de acuerdo a la ecuación de Hertz mencionada previamente. La rugosidad de la superficie de las bacterias fue analizada mediante el parámetro RMS corrigiendo previamente las imágenes topográficas de acuerdo al plano de inclinación punta-muestra, en al menos tres áreas centrales diferentes con un tamaño fijo de 140 x 140 nm^2 .

Esto se repitió al menos para tres bacterias procedentes de cultivos diferentes por cada condición. Los resultados finales se representaron al valor promedio \pm el error estándar. La significancia estadística se evaluó utilizando la prueba *t* de Student.

III.3.4 Estudio de propiedades nanomecánicas y efectos de la exposición a antibióticos sobre bacterias agrupadas

La respuesta de *B. pertussis* a la presencia de los antibióticos también fue estudiada evaluando las propiedades nanomecánicas en bacterias agrupadas. El ensayo se hizo sobre células que se habían incubado adheridas a una superficie por 8 h, en este caso las placas de Petri no fueron funcionalizadas. Brevemente, un inóculo de DO₆₅₀:1 se incubó durante 4 h en una placa de Petri a 37°C de manera estática, para darle lugar al proceso de adhesión celular, luego se hizo un recambio del medio de cultivo por medio fresco y se colocó la caja bajo agitación a 160 rpm durante 4 h. Estas células fueron analizadas mediante un AFM JPK NanoWizard II. Se utilizaron cantilevers de nitruro de silicio de k: 0,06 y 0,12 N/m, los datos se adquirieron mediante QI en imágenes entre 6 x 6 μm^2 y 10

x 10 μm^2 . Se tomó la primera medida como tiempo 0 y a partir de entonces se incubó la muestra durante 5 h con antibióticos en concentración bactericida con el objetivo de poder analizar los efectos de los antibióticos rápidamente, para finalmente completar el experimento tomando una nueva QI en el mismo campo, conservando la sonda y las características de registro de datos.

Un análisis de rigidez, altura y rugosidad de la superficie bacteriana fue realizado comparativamente antes y después de la incubación con antibióticos, del mismo modo que se explica en el apartado anterior. Se examinaron comparativamente bacterias individuales, bacterias que forman parte de un grupo celular de entre 2 a 4 células y bacterias que forman parte de un grupo formado por lo menos de 5 células (Figura 2). Los resultados finales se representaron con el valor promedio \pm el error estándar de al menos 5 bacterias para cada situación. La significación estadística se evaluó utilizando el test *t* de Student.

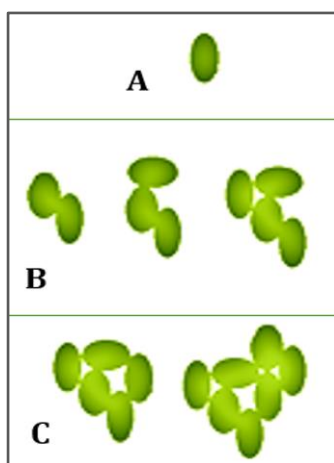


Figura 2. Representación esquemática de las células analizadas en base al número de bacterias que forman parte del grupo al cual pertenecen: (A) bacteria individual, (B) 2 a 4, y (C) 5 o más bacterias agrupadas.

III.3.5 Análisis de viabilidad en bacterias expuestas a antibióticos

El estudio de la viabilidad de *B. pertussis* luego de 5 horas de incubación con antibióticos se realizó mediante una incubación de muestras de bacterias individuales y agrupadas con eritromicina y ampicilina (como se realizó en los dos ensayos previos), preparadas tal como fue mencionado en los apartados anteriores. Luego de 5 horas, se llevó a cabo una tinción con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight (ThermoFisher). Este kit utiliza una mezcla de dos tinciones de ácido nucleico (coloración SYTO™ 9 verde fluorescente – PI o yoduro de propidio: rojo fluorescente). El SYTO9 puede

ingresar tanto a células vivas como muertas, de este modo todas las células de la muestra se teñirán de verde. Mientras que, las células con membranas alteradas que se consideran muertas, se tiñen además de color rojo debido a la acción del PI.

Las imágenes de fluorescencia fueron adquiridas con un microscopio de fluorescencia DMLB acoplado a una cámara DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd), disponible en el CINDEFI-UNLP. El software de adquisición de imágenes utilizado es el de la cámara del microscopio: *Leica Application Suite*. Las mismas fueron analizadas utilizando el software ImageJ y a continuación se calculó la proporción de mortalidad celular medio para cada caso, mediante la ecuación:

$$\text{Proporción de Mortalidad: } \frac{\text{Bacterias muertas}}{\text{Bacterias totales}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde, las bacterias muertas están definidas por aquellas células marcadas con color rojo y las bacterias totales definidas por las bacterias color verde. Se realizó al menos en 6 replicados en cada caso y los resultados se presentan con el valor promedio \pm el error estándar.

III. 4 RESULTADOS

III.4.1 Análisis de resistencia a antibióticos evaluada mediante el método convencional de dilución en medio de cultivo líquido.

Para comenzar con los análisis del efecto de antimicrobianos sobre *B. pertussis* el primer paso fue obtener los valores de CIM y CBM a los antibióticos seleccionados, tal como sugiere hacerlo la CLSI (Wayne 2012). Se utilizaron: eritromicina, (como representante de macrólidos, antibióticos suministrados a pacientes clínicos mayores de 1 mes de vida) y ampicilina, debido a que tiene un mecanismo de acción diferente y actúa específicamente sobre la pared celular. Los valores registrados se muestran en la Tabla I y coinciden con los reportados previamente por la bibliografía (Trollfors, 1978; Field y Parker, 1980; Shahcheraghi *et al.*, 2014; Lönnqvist *et al.*, 2018).

Tabla I: Valores de CIM y CBM para dos eritromicina y ampicilina de *B. pertussis* Tohama I en cultivos planctónico. Los resultados se expresan en $\mu\text{g/mL}$

	CIM	CBM
Eritromicina	0,03-0,12	2,5-5
Ampicilina	5-10	100-160

III.4.2 Evaluación de propiedades nanomecánicas de la cubierta celular de bacterias individuales de *B. pertussis* luego de la exposición a antibióticos

A continuación, analizamos el efecto de la exposición de células individuales de *B. pertussis* en fase virulenta y avirulenta a una concentración bactericida de los antibióticos seleccionados, con el objetivo de poder analizar los efectos rápidamente, mediante un análisis de la altura, rugosidad y rigidez celular. El estudio se llevó a cabo utilizando la cepa de referencia vacunal y dos antibióticos que actúan a través de diferentes mecanismos: ampicilina y eritromicina, durante un período de tiempo de 5 h, igual periodo de tiempo que los experimentos desarrollados para el seguimiento de la rigidez celular de bacterias virulentas y avirulentas en el capítulo anterior.

No se observaron cambios significativos en la rugosidad de *B. pertussis* luego de 5 horas de exposición a ninguno de los dos antibióticos utilizados: eritromicina o ampicilina (los resultados se muestran en el anexo: Tabla A1). Probablemente, en el primer caso se deba a que la eritromicina no actúa sobre la pared celular. Por otro lado, la ampicilina, que ejerce su acción sobre la capa de peptidoglicano de la pared celular, no funciona sobre Gram-negativos con la eficacia que actúa sobre Gram-positivos, debido al menor tamaño de dicha capa (7-8 nm en Gram-negativos y 20-80 nm para la capa en Gram-positivos) (Figura 3). Posiblemente, la acción de la ampicilina durante 5 horas no tiene impacto sobre la rugosidad de la cubierta de *B. pertussis* a causa de la delgadez de esta capa.

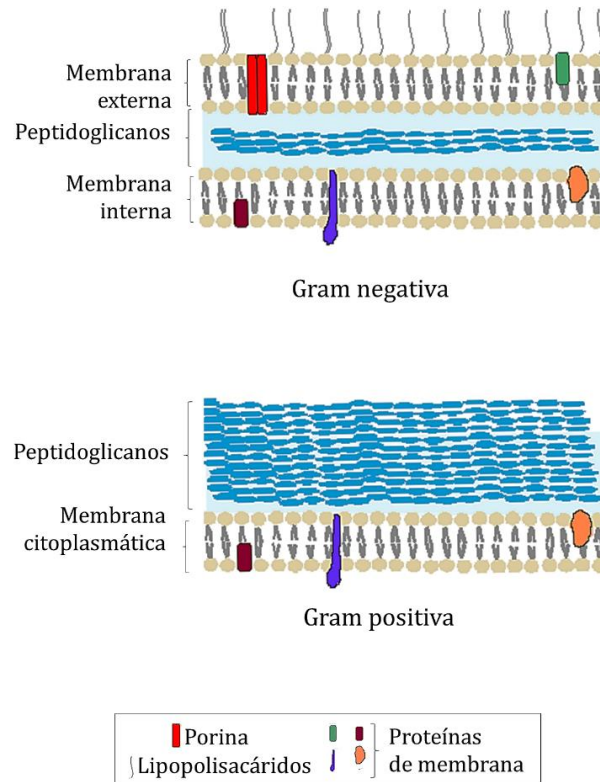


Figura 3. Representación esquemática de las paredes celulares Gram-negativas y Gram-positivas. Resumidamente, las bacterias gramnegativas se caracterizan por tener una membrana celular interna y otra externa, una capa delgada de peptidoglicano entre las membranas y una capa de lipopolisacáridos que recubre la membrana externa. En cambio, las paredes celulares Gram-positivas contienen solo una membrana plasmática fosfolípida y una capa gruesa de peptidoglicano.

Continuando con el estudio de la variación de las propiedades nanomecánicas como respuesta a la presencia de antimicrobianos, se evaluó la altura de células de *B. pertussis* en fase virulenta y en fase avirulenta, en medio SS (Figura 4A) y en medio SS con antibióticos al inicio y al cabo de 5 h de contacto con el antibiótico (Figura 4B y 4C). Una disminución significativa de la misma debido a la exposición a antibióticos fue registrada en bacterias virulentas, contrariamente a la conservación de la altura en ausencia de antibióticos y en bacterias avirulentas. El estudio de la rigidez de cubierta celular reveló que, a diferencia de lo que sucede durante la incubación sin antibióticos donde se registra un aumento de rigidez en el tiempo para bacterias en fase virulenta (Figura 4D), la bacteria en condición virulenta se “ablanda” luego de la exposición a antimicrobianos (Figura 4E). Sin embargo, al realizar el mismo experimento de exposición a antibióticos con la cepa avirulenta no se registraron diferencias significativas después de 5 h de incubación (Figura 4F).

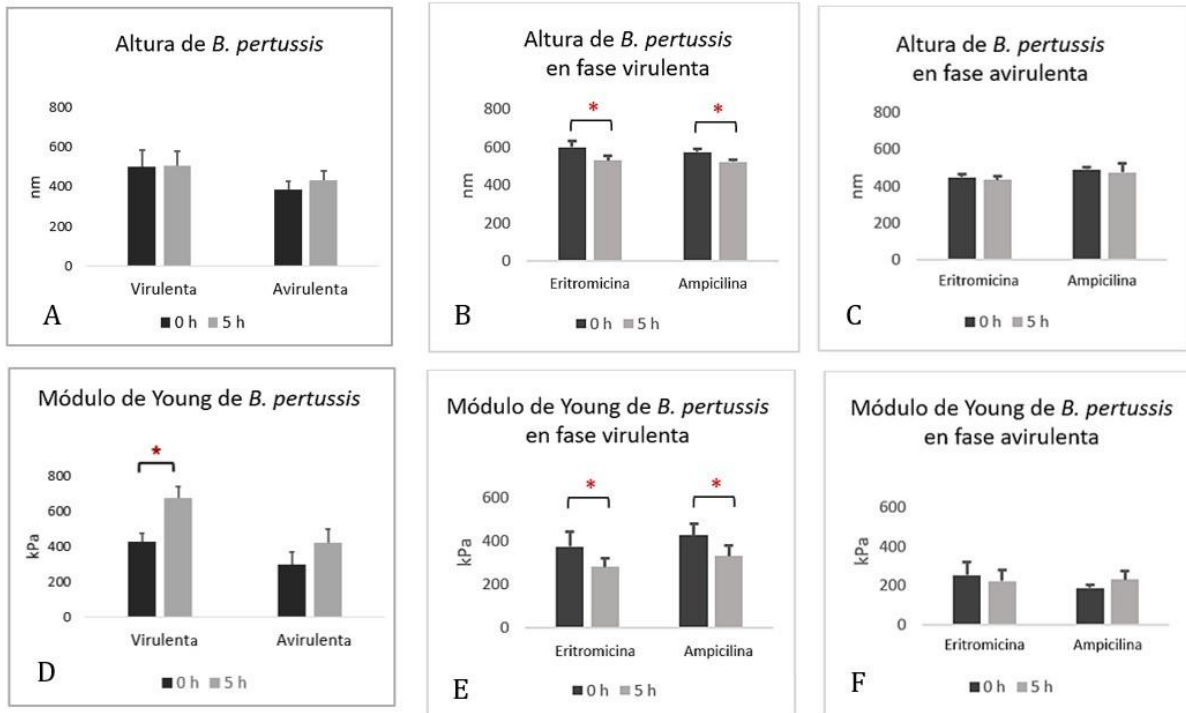


Figura 4. Análisis de la altura promedio de células individuales de *B. pertussis* antes y después de 5 horas de incubación sin exposición a antibióticos (A) e incubadas con antibióticos en fase virulentas (B) y avirulentas (C). Evaluación de la rigidez promedio de *B. pertussis* antes y después de un periodo de 5 horas de incubación en medio SS sin (D) y con antibióticos, en fase virulenta (E) y avirulenta (F). Eritromicina en concentración 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y ampicilina: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (*representa diferencias estadísticamente significativas, test de Student t-test: $p < 0,05$. n: 3 o más bacterias).

En la Figura 5 se exponen ejemplos de bacterias individuales en fase virulenta y avirulenta mediante imágenes de rigidez e histogramas correspondientes a los valores de módulo de Young (E). Siguiendo el gradiente de colores, se observa cómo luego de 5 horas de incubación en medio SS, la rigidez celular de *B. pertussis* virulenta aumenta (el color blanco-azul representa mayor rigidez) (Figura 5A) a diferencia de lo que sucede en avirulentas donde la rigidez no presenta cambios significativos luego de 5 horas de incubación en medio SS (Figura 5B). Sin embargo, luego de 5 horas de incubación en medio con antibióticos en concentración bactericida, la superficie de las bacterias virulentas se vuelve más “blanda”, lo que se refleja también en el desplazamiento hacia la izquierda en el eje X de los histogramas de la Figura 5C y 5E. En contraste, en bacterias avirulentas no se registra dicha disminución de rigidez luego de la incubación con eritromicina o ampicilina (Figura 5D y 5F). En el anexo a este capítulo se presentan ejemplos de bacterias individuales donde se muestra la variación de los valores de rigidez medidos a cada hora durante las 5 horas de exposición a antibióticos (Anexo: Figura 4).

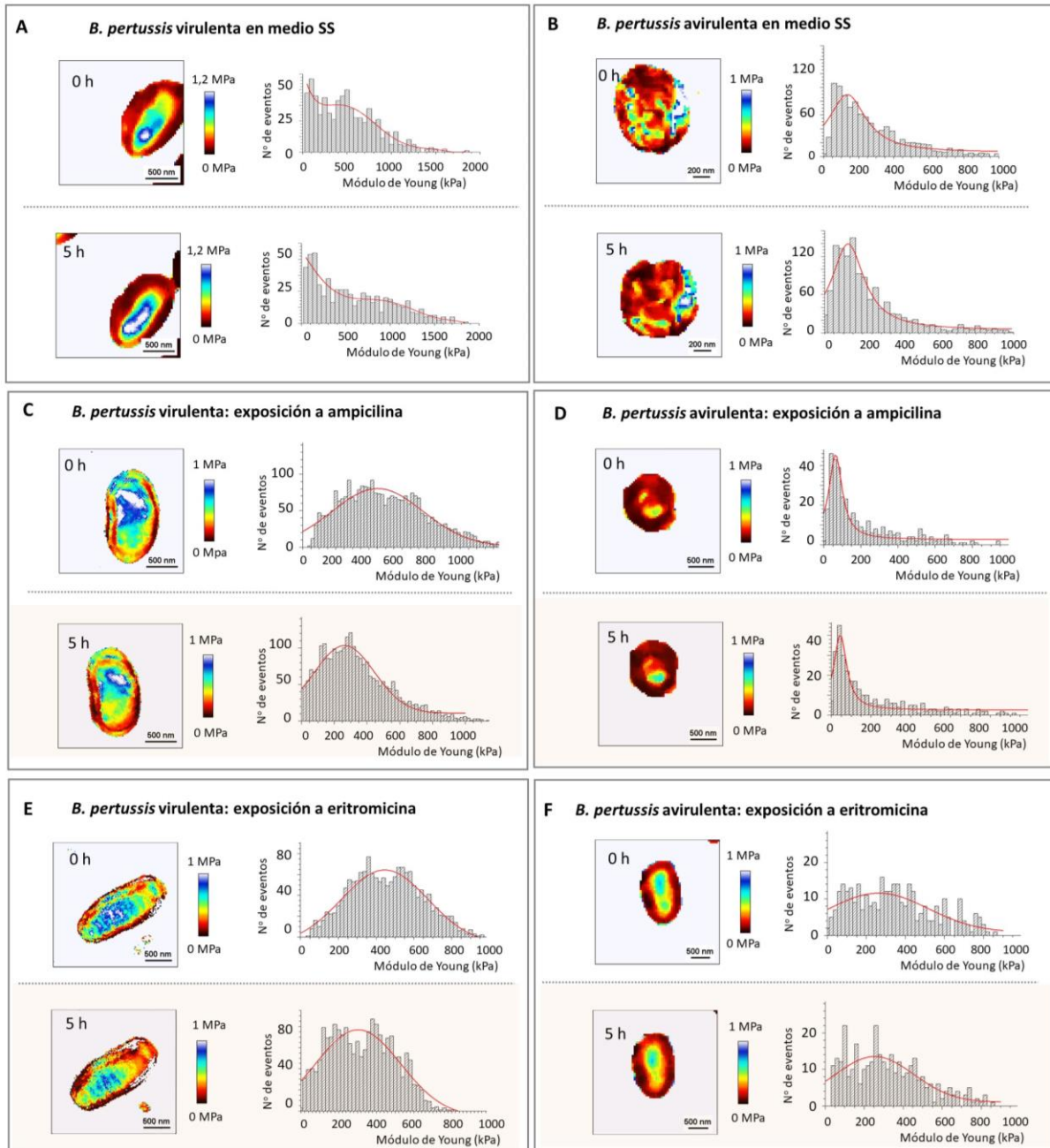


Figura 5. Imagen de rigidez y su respectivo histograma del Módulo de Young de células de *B. pertussis* en (A) fase virulenta y (B) fase avirulenta antes (parte superior de cada cuadrante, tiempo: 0 h) y después de 5 horas de incubación en medio SS (parte inferior de cada cuadrante). Imagen de rigidez y su respectivo histograma de Módulo de Young de *B. pertussis* virulentas y avirulentas antes (parte superior, tiempo: 0 h) y después de 5 horas de incubación en medio SS con ampicilina (C y D) y con eritromicina (E y F) en concentración bactericida (parte inferior del gráfico, tiempo: 5h). Blanco y azul representan los valores más altos y el color marrón los valores más bajos de rigidez. Las bacterias fueron adheridas a la placa de Petri con una solución de polilisina 0,01%.

III.4.3 Análisis del efecto de antibióticos sobre la rigidez de bacterias en procesos de división

Teniendo en cuenta que *B. pertussis* crece con un tiempo de generación inusualmente largo del orden de 8 h (Tuomanen *et al.*, 1989) y que los antibióticos analizados actúan sobre la capa de mureína y en la síntesis de nuevos polipéptidos requeridos para terminar la elongación celular previa a la separación y en consecuencia evitando la división celular, se llevó a cabo un análisis de la rigidez de *B. pertussis* durante el proceso de división y exposición a antibióticos. En bacterias incubadas en medio SS sin la presencia de antibióticos, se observa la definición de la zona de división mediante un ablandamiento de la misma y un incremento del Módulo de Young en ambas células una vez completado el proceso (Figura 6).

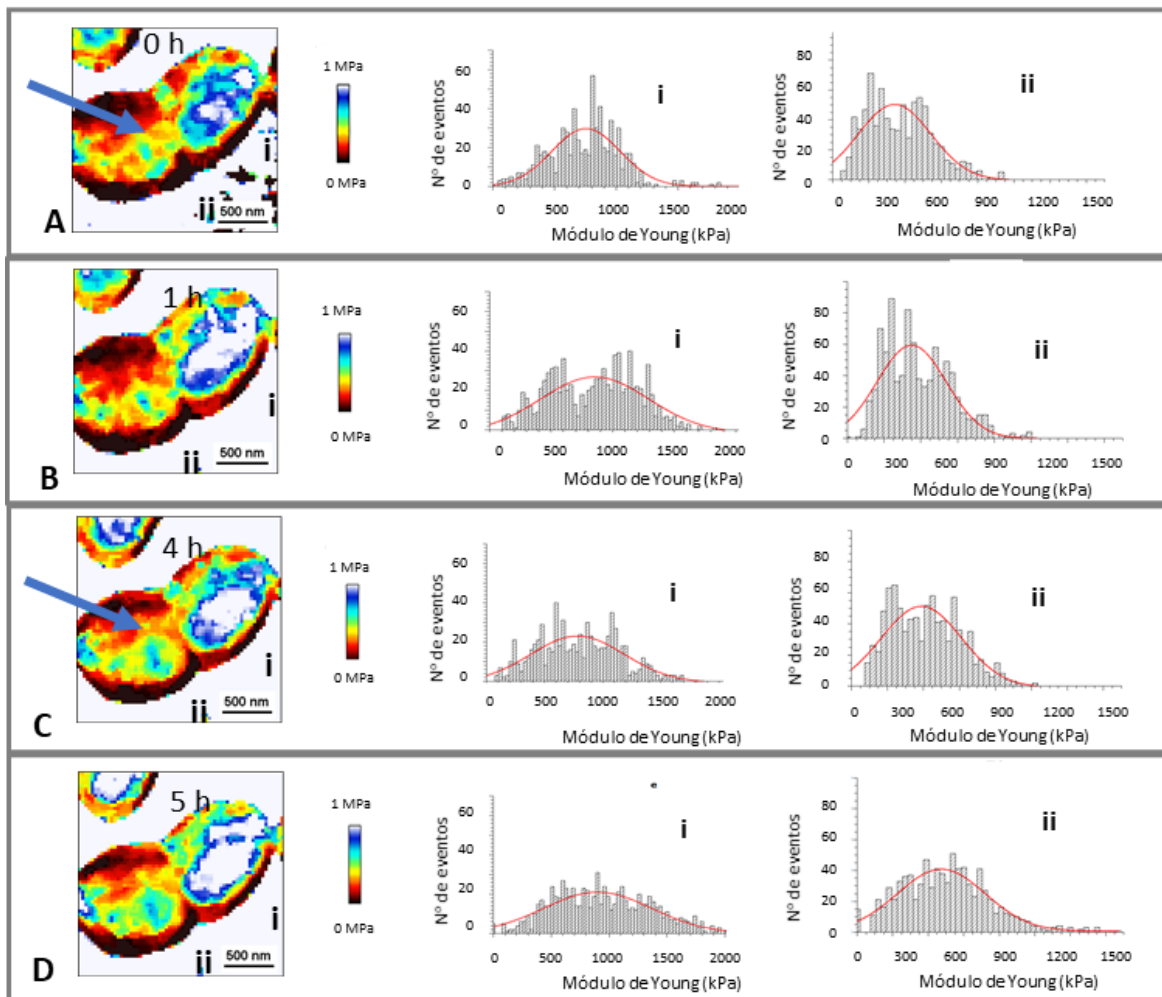


Figure 6. Imágenes de rigidez y sus respectivos histogramas para *B. pertussis* virulenta en proceso de división en medio SS (sin presencia de antimicrobianos). Las bacterias son adheridas a la placa de Petri mediante una solución de polilisina 0,01%. Correspondientes a (A) inicio del experimento, (B) 1 hora, (C) 4 horas y (D) 5 horas. Los colores blanco y azul representan los valores más altos y el color marrón los valores más bajos. Las flechas azules indican la zona de división. i- Identifica a la región superior y ii- indica la porción inferior de la bacteria en división, las cuales dan lugar a las dos bacterias hijas una vez finalizada la división celular. Barra de escala: 500 nm.

Cuando las bacterias en división son expuestas a antibióticos, se detiene dicho proceso a medida que se registra un ablandamiento celular ya sea cuando la célula está en una etapa inicial (Figura 7) o final de división (Figura 8).

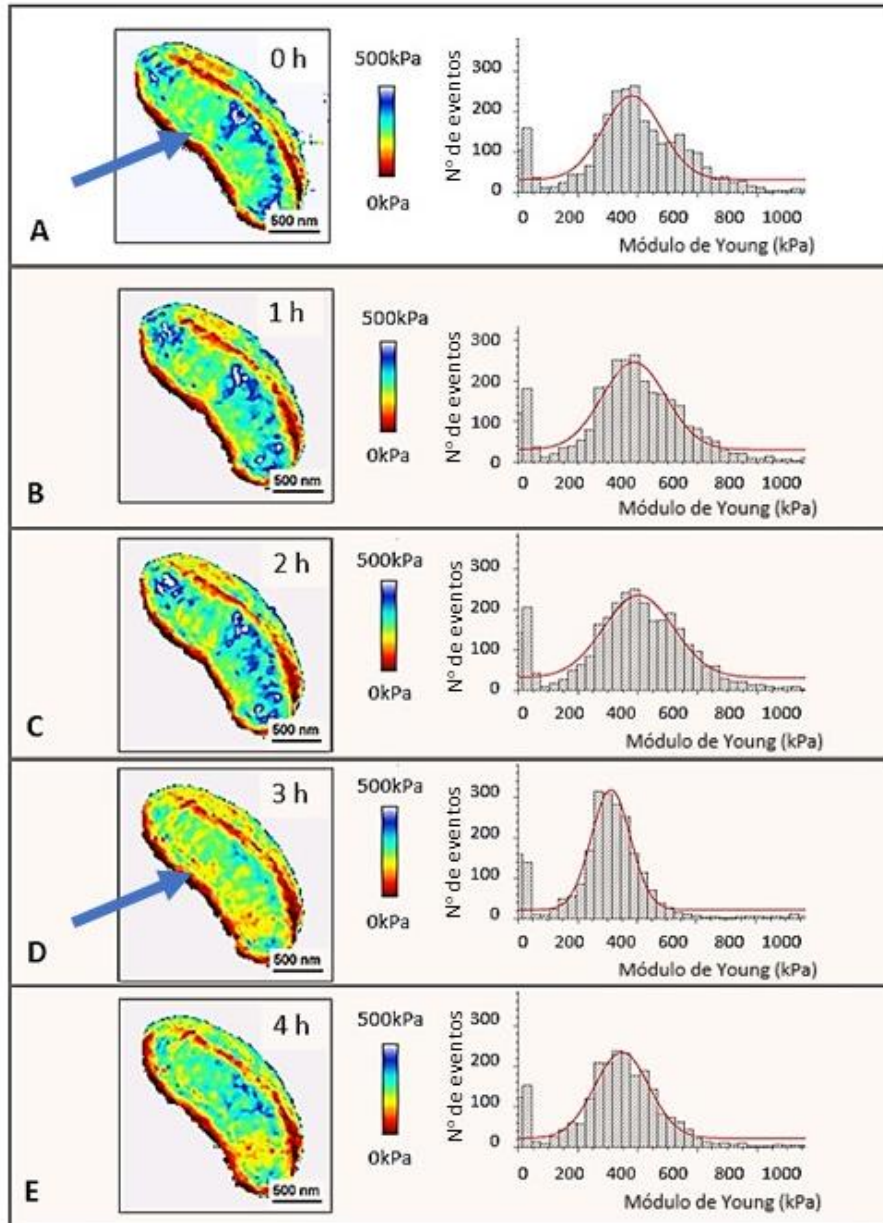


Figure 7. Imágenes de rigidez y sus respectivos histogramas para *B. pertussis* virulenta en proceso de división en medio SS durante la exposición a ampicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (fondo coloreado). Las bacterias son adheridas a la placa de Petri mediante una solución de polilisina 0,01%. Cada recuadro corresponde a: (A) inicio del experimento antes de agregar el antibiótico, (B) una hora, (C) 2 horas, (D) 3 horas y (E) 4 horas de incubación con el antibiótico. Las flechas azules indican la futura zona de división. Barra de escala: 500nm. Los colores blanco y azul representan los valores más altos y el color marrón los valores más bajos.

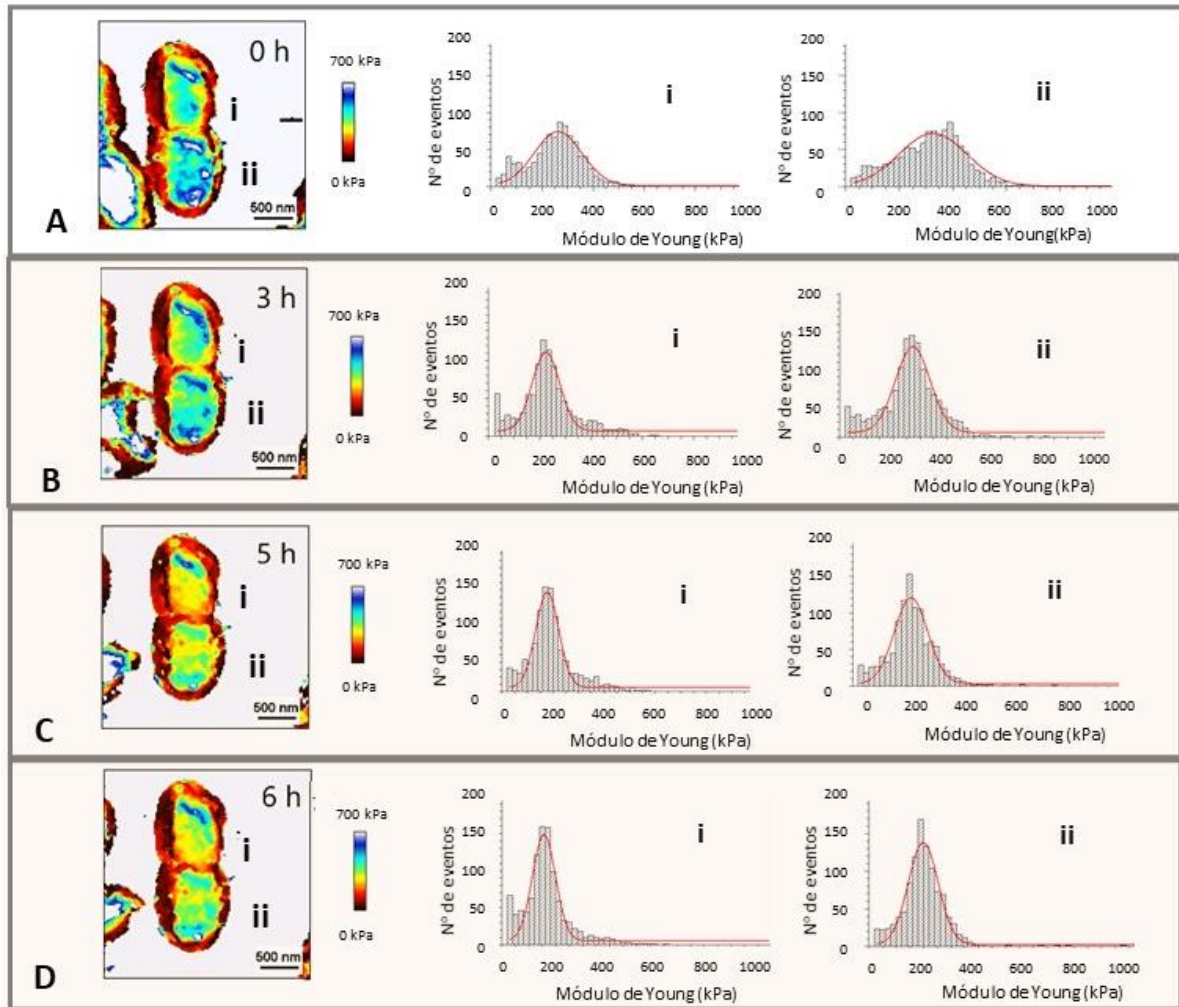


Figure 8. Imágenes de rigidez y sus respectivos histogramas para *B. pertussis* virulenta en proceso de división en medio SS durante la exposición a eritromicina (5 µg/mL) (fondo coloreado). Las bacterias son adheridas a la placa de Petri mediante una solución de polilisina 0,01%. Barra de escala: 500nm. Derecha: Imágenes de altura correspondientes al (A) inicio del experimento en medio sin antibiótico, y a las (B) 3 horas, (C) 5 horas y (D) 6 horas de incubación con eritromicina en concentración 5 µg/mL. Los colores blanco y azul representan los valores más altos y el color marrón los valores más bajos. i- identifica a la región superior y ii- indica la porción inferior de la bacteria en división, las cuales dan lugar a las dos bacterias hijas una vez finalizada la división celular.

III.4.4 Análisis del efecto de antibióticos sobre propiedades morfológicas y nanomecánicas de bacterias en grupos celulares

Es conocida la dificultad de moléculas, tales como las de los agentes antimicrobianos, para penetrar y “moverse” dentro de comunidades bacterianas. La formación de un agregado celular es una estrategia adoptada por las bacterias para sobrevivir en condiciones de estrés. Además, la existencia de microambientes que antagonizan la acción de los antibióticos y la activación de respuestas al estrés, o la aparición de un fenotipo específico en bacterias que forman parte de una comunidad, reducen los efectos

de sustancias antimicrobianas (Stewart 2002; Høiby *et al.*, 2010). Sin embargo, poco se sabe sobre los efectos de antibióticos sobre células creciendo adheridas a superficies en la primera etapa de la adhesión.

Para monitorear estos efectos se empleó AFM como herramienta para evaluar cambios de propiedades de cubierta de *B. pertussis* cuando las mismas forman parte de grupos celulares en comparación con bacterias aisladas. Inicialmente se estudiaron la altura, rugosidad y rigidez de bacterias individuales y agrupadas incubadas en medio SS sin el agregado de antibióticos, pero no se registraron diferencias significativas entre bacterias aisladas o en grupos (Tabla Anexo A2). Sin embargo, al analizar estas características luego de 5 horas de exposición a concentraciones bactericidas de antibióticos, se ha detectado una disminución significativa de altura en bacterias individuales, pero no así en bacterias agrupadas (Tabla II).

Tabla II: Efecto de antibióticos en concentraciones bactericidas sobre la altura y rugosidad de bacterias individuales y agrupadas luego de 5 horas de incubación. Análisis estadístico test *t*-Student, * representa un valor $p < 0,05$ entre las 0 y 5 horas (diferencia significativa). (n: al menos 5 replicados).

	Bacteria individual		Bacteria en grupo de 2 a 4 células		Bacteria en grupo de 5 o más células	
	0 h	5 h	0 h	5 h	0 h	5 h
Exposición a ampicilina (100 µg/mL)						
Altura (nm)	563,4 (±30,5) *	474,4 (±22,1)	544,4 (±43,4)	507,1 (±39,5)	490,4 (±74,1)	533,5 (±47,1)
RMS (nm)	9,9 (±0,8)	11,3(±1,2)	9,5 (±0,5)	9,7 (±0,7)	10,2 (±0,5)	10,0 (±0,4)
Exposición a eritromicina (5 µg/mL)						
Altura (nm)	579,9 (±19,9) *	525,5 (±14,1)	574,2 (±16,4)	580,7 (±20,3)	539,1 (±60,6)	509,2 (±60,4)
RMS (nm)	11,3 (±0,6)	12,0 (±1,6)	11,1 (±0,8)	10,1 (±0,5)	11,3 (±0,4)	10,6 (±0,4)

Respecto a la rigidez celular, cabe remarcar que el efecto de los antibióticos es más importante en células individuales que sobre bacterias agrupadas, incluso los cambios registrados pierden importancia significativa en bacterias que forman parte de un grupo de células (Figura 9). Este resultado es un indicador adicional importante sobre las ventajas que otorga el agrupamiento celular en cuanto a la resistencia a agentes antimicrobianos.

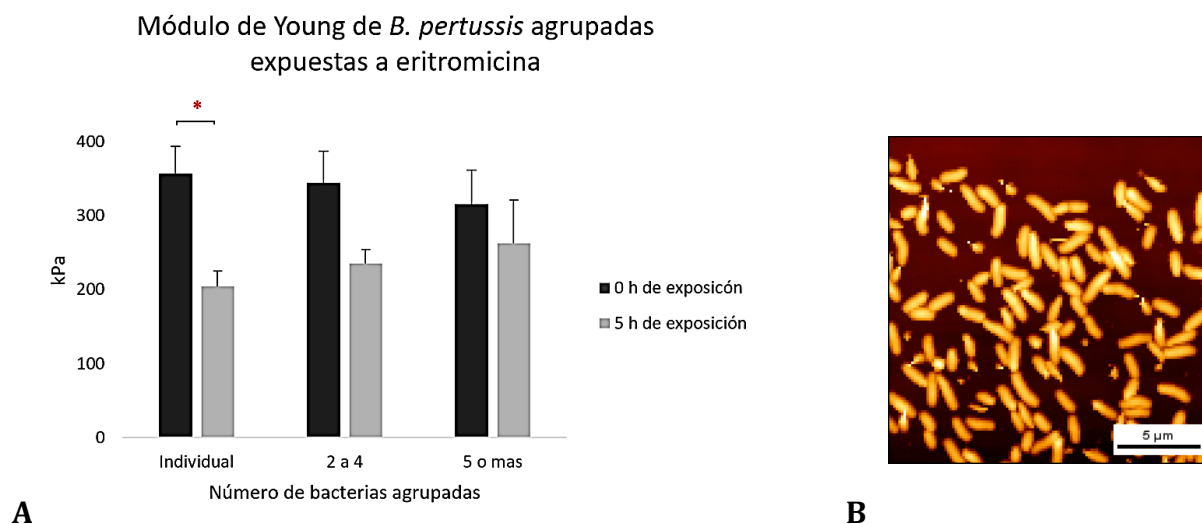


Figura 9. (A) Módulos de Young medios para bacterias individuales y agrupadas antes y después de la exposición a eritromicina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se registran diferencias significativas antes y después de las 5 h de exposición al antibiótico en bacterias individuales. (B) Imagen de altura de bacterias agrupadas (microcolonia de *B. pertussis* de 8 h). Test de Student: * $p < 0,05$.

III.4.5 Análisis de viabilidad mediante tinción de fluorescencia

Asimismo, el efecto de antibióticos a concentraciones bactericidas se analizó mediante una tinción LIVE/DEAD de bacterias individuales y agrupadas luego de la incubación por 5 horas con los antibióticos mencionados previamente, adheridas a cajas de Petri mediante el mismo protocolo que se utiliza para los análisis de AFM. Además, un control sobre bacterias incubadas sin presencia de antibióticos fue realizado para cada caso (Figura 10). El porcentaje de mortalidad obtenido en bacterias agrupadas es significativamente menor a los registrados previamente para bacterias individuales (Tabla III).

Tabla III: Proporción de mortalidad de *B. pertussis* después de 5 horas de tratamiento con antibióticos (ampicilina: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; eritromicina: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Dicha proporción fue definida a partir del análisis de imágenes de fluorescencia luego de la tinción LIVE/DEAD, el parámetro fue calculado como la relación entre la superficie ocupada por bacterias muertas -rojo, PI-, sobre el total de bacterias -verdes, SYTO9-. Análisis estadístico mediante test *t*-Student *** $p < 0,001$ (número de replicados: 6).

	<i>Individual</i>	<i>Agrupadas</i>
Control (sin antibiótico)	0,0030 ($\pm 0,0009$)	0,0025 ($\pm 0,0002$)
Exposición a ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0,85 ($\pm 0,06$)	0,011 ($\pm 0,007$)***
Exposición a eritromicina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0,79 ($\pm 0,12$)	0,025 ($\pm 0,008$)***

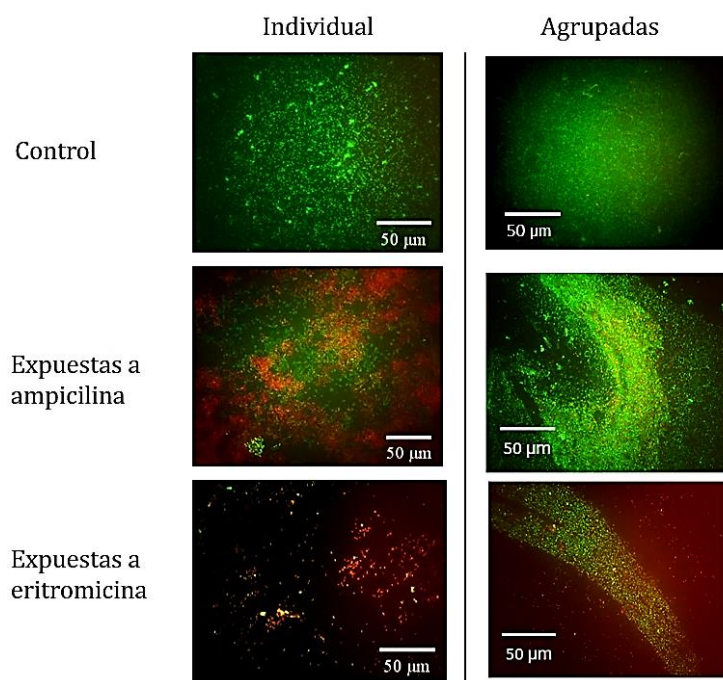


Figura 10. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células de *B. pertussis* individuales. En la primera columna se analizan bacterias individuales procedentes de un cultivo líquido adheridas a la placa de Petri mediante una solución de polilisina 0,01%; en la segunda columna se analizan bacterias adheridas a una caja de Petri mediante la incubación durante 4 horas de manera estática seguida por una segunda incubación de 4 horas en agitación. Las imágenes se registraron luego de 5 horas de incubación en medio SS sólo y con la presencia de antibióticos (CBM). Tinción: PI-SYTO9. No se encuentran diferencias significativas entre los porcentajes de mortalidad de virulentas y avirulentas mediante este mecanismo de análisis.

III.5 DISCUSIÓN

Cuando las bacterias son sometidas a estrés generados por factores potencialmente líticos puede tener lugar un cambio en las propiedades nanomecánicas de la célula. En varios trabajos previos, el estudio de la indentación nanomecánica ha sido utilizado para demostrar el efecto de agentes antimicrobianos en la pared celular bacteriana, así como para evaluar mecanismos de acción de nuevos agentes antimicrobianos sobre cepas resistentes (Formosa *et al.*, 2012; Longo *et al.*, 2012). Estos trabajos demuestran que bacterias tratadas con antibióticos presentan menor módulo de Young que las no tratadas (Gaboriaud *et al.*, 2008; Pogoda *et al.*, 2017); es decir, en general los antimicrobianos generan un “ablandamiento” de la pared celular bacteriana. Particularmente en este trabajo de tesis mediante el análisis de células individuales de *B. pertussis* expuestas a antibióticos, también registramos ese efecto de disminución de la rigidez de la cubierta bacteriana pero solamente en bacterias virulentas. De este modo, dichas modificaciones de la

robustez de una pared celular podrían entonces relacionarse con el debilitamiento de la capacidad de generar una infección exitosa de un microorganismo. Sin embargo, en la fase avirulenta la reducción en el módulo de Young generada por la presencia de antibióticos a las 5 horas de incubación es insignificante, esto podría estar relacionado con la capacidad de respuesta a estrés de la fase avirulenta (Moon *et al.*, 2017).

Es importante considerar los mecanismos de acción de los antibióticos analizados. La ampicilina es un antibiótico bactericida fuerte que actúa interfiriendo en el entrecruzamiento de cadenas de peptidoglicanos presentes mayoritariamente en la pared celular de organismos Gram-positivos, donde impacta disminuyendo la elasticidad. La eritromicina, por el contrario, es un antibiótico bacteriostático que inhibe la síntesis de ARN (ácido desoxirribonucleico) afectando toda la síntesis de proteínas en la célula, incluyendo las que forman parte de la membrana como proteínas de transporte, adhesinas, etc., (Figura 11). El efecto de estos antibióticos, particularmente el caso de ampicilina, sobre la rugosidad de bacterias Gram-negativas no debería ser significativo debido a que la capa externa de peptidoglicano es muy delgada a diferencia de lo que ocurre en bacterias Gram-positivas (Arnoldi 2000). Esto concuerda con las observaciones experimentales anteriormente mencionadas en *B. pertussis* donde no se registraron cambios en la rugosidad después de la exposición a antibióticos tal como fueron observados en bacterias Gram-positivas tales como *Bacillus subtilis* (Laskowski *et al.*, 2018).

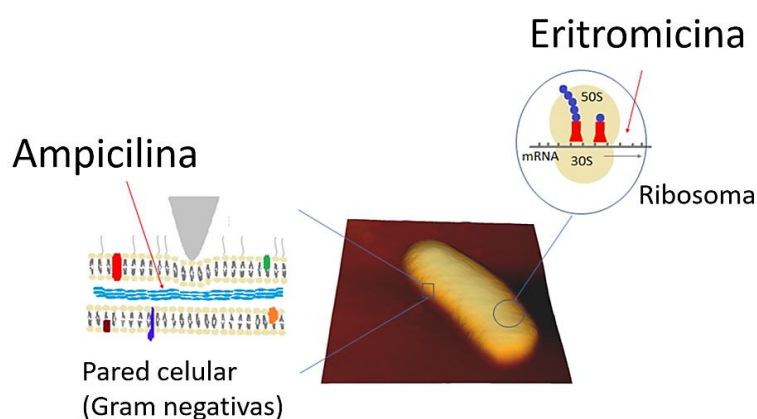


Figura 11. Gráfico representativo del mecanismo de acción de ampicilina y eritromicina.

En este trabajo, hemos observado que, durante el proceso de crecimiento celular, la zona de división se destaca por un incremento en la rigidez de cubierta externa, probablemente debido al reclutamiento de peptidoglicanos y materiales para formar la

nueva pared celular a partir del proceso de transglicosilación y transpeptidación, necesarios para el crecimiento de la capa de mureína y elongación de la pared celular. Considerando el efecto de antibióticos sobre las regiones alejadas de la zona de división celular, se registró nuevamente una disminución de la rigidez celular de las bacterias, tal como fue observado previamente en células virulentas individuales que no estaban en división.

Las infecciones bacterianas y el desarrollo de microcomunidades continúan siendo un desafío en los campos biomédicos. Este modo de vida en microcomunidades adheridas a la superficie permitió detectar un menor porcentaje de disminución de la rigidez luego del tratamiento con antimicrobianos en células que forman parte de grupos celulares con respecto a células que se encuentran aisladas. Es importante mencionar que este efecto de “ablandamiento” es coincidente con el registrado en bacterias virulentas debido a que las bacterias en fase avirulentas no generan agrupamientos celulares por la incapacidad de expresar las proteínas necesarias para la adhesión intercelular.

La membrana externa bacteriana interactúa directamente con el ambiente extracelular y la caracterización de la estructura de esta membrana provee una información crucial para entender los procesos como la adhesión bacteriana y la unión inicial a superficies bióticas o abióticas. La evaluación de los cambios en las propiedades mecánicas de las células vivas proporciona información sobre las transformaciones que ocurren en sus estructuras bajo la influencia de factores ambientales, inmunológicos o químicos. Es así como el estudio de propiedades nanomecánicas de la superficie bacteriana contribuye a entender procesos importantes de viabilidad de los microorganismos. Ampliar el alcance de la investigación sobre el análisis de parámetros mecánicos de células de microorganismos patógenos no solo tiene valor desde el punto de vista de la ciencia básica, sino que también permite el desarrollo de métodos diagnósticos y terapéuticos nuevos, más precisos, y la evaluación de la efectividad de los agentes antibacterianos.

III.6 BIBLIOGRAFÍA

Alves CS, Melo MN, Franquelim HG, Ferre R, Planas M, Feliu L, Bardají E, Kowalczyk W, Andreu D, Santos Alves CS, Melo MN, Franquelim HG, Ferre R, Planas M, Feliu L, Bardají E, Kowalczyk W, Andreu D,

- Santos NC, Fernandes MX, Castanho MA. *Escherichia coli* cell surface perturbation and disruption induced by antimicrobial peptides BP100 and pepR. *J Biol Chem*. 2010, 285(36):27536-44. doi: 10.1074/jbc.M110.130955.
- Arnal L, Grunert T, Cattelan N, de Gouw D, Villalba MI, Serra DO, Mooi FR, Ehling-Schulz M, Yantorno OM. *Bordetella pertussis* Isolates from argentinean whooping cough patients display enhanced biofilm formation capacity compared to Tohama I reference strain. *Front Microbiol*. 2015, 6:1352. doi: 10.3389/fmicb.2015.01352.
- Arnoldi M, Fritz M, Bäuerlein E, Radmacher M, Sackmann E, Boulbitch A. Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*. 2000, 62(1 Pt B):1034-44.
- Cafiero JH, Lamberti YA, Surmann K, Vecerek B, Rodriguez ME. A *Bordetella pertussis* MgtC homolog plays a role in the intracellular survival. *PLoS One*. 2018, 13(8):e0203204. doi:10.1371/journal.pone.0203204.
- Cattelan N, Dubey P, Arnal L, Yantorno OM, Deora R. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog Dis*. 2016, 74(1):ftv108. doi: 10.1093/femspd/ftv108.
- Deora R, Bootsma HJ, Miller JF, Cotter PA. Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol Microbiol*. 2001, 40(3):669-83.
- Dieltjens L, Appermans K, Lissens M, Lories B, Kim W, Van der Eycken EV, Foster KR, Steenackers HP. Inhibiting bacterial cooperation is an evolutionarily robust anti-biofilm strategy. *Nat Commun*. 2020, 11(1):107. doi: 10.1038/s41467-019-13660-x.
- Eaton P, Fernandes JC, Pereira E, Pintado ME, Xavier Malcata F. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopy*. 2008, 108(10):1128-34. doi: 10.1016/j.ultramic.2008.04.015.
- Field LH, Parker CD. Antibiotic susceptibility testing of *Bordetella pertussis*. *Am J Clin Pathol*. 1980, 74(3):312-6.
- Formosa C, Grare M, Jauvert E, Coutable A, Regnouf-de-Vains JB, Mourer M, Duval RE, Dague E. Nanoscale analysis of the effects of antibiotics and CX1 on a *Pseudomonas aeruginosa* multidrug-resistant strain. *Sci Rep*. 2012, 2:575. doi: 10.1038/srep00575.
- Friedman RL, Nordensson K, Wilson L, Akporiaye ET, Yocum DE. Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infection and immunity*. 1992, 60(11):4578-85.
- Gaboriaud F, Gee ML, Strugnell R, Duval JF. Coupled electrostatic, hydrodynamic, and mechanical properties of bacterial interfaces in aqueous media. *Langmuir*. 2008, 24(19):10988-95. doi: 10.1021/la800258n.
- Guillot S, Descours G, Gillet Y, Etienne J, Floret D, Guiso N. Macrolide-resistant *Bordetella pertussis* infection in newborn girl, France. *Emerg Infect Dis*. 2012, 18(6):966-8. doi: 10.3201/eid1806.120091.
- Hellwig SM, Hazenbos WL, van de Winkel JG, Mooi FR. Evidence for an intracellular niche for *Bordetella pertussis* in broncho-alveolar lavage cells of mice. *FEMS immunology and medical microbiology*. 1999, 26(3-4):203-7.
- Høiby N, Bjarneholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010, 35(4):322-32. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.
- Hurdle JG, O'Neill AJ, Chopra I, Lee RE. Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections. *Nat Rev Microbiol*. 2011, 9(1):62-75. doi: 10.1038/nrmicro2474.
- Lamberti Y, Perez Vidakovic ML, van der Pol LW, Rodriguez ME. Cholesterol-rich domains are involved in *Bordetella pertussis* phagocytosis and intracellular survival in neutrophils. *Microbial pathogenesis*. 2008, 44(6):501-11.
- Laskowski D, Strzelecki J, Pawlak K, Dahm H, Balter A. Effect of ampicillin on adhesive properties of bacteria examined by atomic force microscopy. *Micron*. 2018, 112:84-90. doi: 10.1016/j.micron.2018.05.005.
- Longo G, Rio LM, Roudit C, Trampuz A, Bizzini A, Dietler G, Kasas S. Force volume and stiffness tomography investigation on the dynamics of stiff material under bacterial membranes. *J Mol Recognit*. 2012, 25(5):278-84. doi: 10.1002/jmr.2171.
- Longo G, Rio LM, Trampuz A, Dietler G, Bizzini A, Kasas S. Antibiotic-induced modifications of the stiffness of bacterial membranes. *J Microbiol Methods*. 2013, 93(2):80-4. doi: 10.1016/j.mimet.2013.01.022.

- Lönnqvist E, Barkoff AM, Mertsola J, He Q. Antimicrobial susceptibility testing of Finnish *Bordetella pertussis* isolates collected during 2006-2017. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018, 14:12-16. doi: 10.1016/j.jgar.2018.02.012.
- Merkel TJ, Boucher PE, Stibitz S, Grippe VK. Analysis of bvgR expression in *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* 2003, 185:6902-6912.
- Moon K, Bonocora RP, Kim DD, Chen Q, Wade JT, Stibitz S, Hinton DM. The BvgAS Regulon of *Bordetella pertussis*. *mBio.* 2017, 10;8(5):e01526-17. doi: 10.1128/mBio.01526-17.
- Ohtsuka M, Kikuchi K, Shimizu K, Takahashi N, Ono Y, Sasaki T, Hiramatsu K. Emergence of quinolone-resistant *Bordetella pertussis* in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009, 53(7):3147-9. doi: 10.1128/AAC.00023-09.
- Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Res.* 2005, 437: 41-7.
- Perry CC, Weatherly M, Beale T & Randriamahefa A. Atomic force microscopy study of the antimicrobial activity of aqueous garlic versus ampicillin against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Sci Food Agric.* 2009, 89(6), 958-964.
- Pogoda K, Piktel E, Deptuła P, Savage PB, Lekka M, Bucki R. Stiffening of bacteria cells as a first manifestation of bactericidal attack. *Micron.* 2017, 101:95-102. doi: 10.1016/j.micron.2017.06.011.
- Safarchi A, Octavia S, Nikbin VS, Lotfi MN, Zahraei SM, Tay CY, Lamichhane B, Shahcheraghi F, Lan R. Genomic epidemiology of Iranian *Bordetella pertussis*: 50 years after the implementation of whole cell vaccine. *Emerg Microbes Infect.* 2019, 8(1):1416-1427. doi: 10.1080/22221751.2019.1665479.
- Shahcheraghi F, Nakhost Lotfi M, Nikbin VS, Shooraj F, Azizian R, Parzadeh M, Allahyar Torkaman MR, Zahraei SM. The First Macrolide-Resistant *Bordetella pertussis* Strains Isolated From Iranian Patients. *Jundishapur J Microbiol.* 2014, 7(6):e10880. doi: 10.5812/jjm.10880.
- Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019, 16;8:76. doi: 10.1186/s13756-019-0533-3.
- Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol.* 2002, 292(2):107-13.
- Tuomanen E, Schwartz J, Sande S, Light K, Gage D. Unusual composition of peptidoglycan in *Bordetella pertussis*. *J Biol Chem.* 1989, 264(19):11093-8.
- Trollfors B. Effect of erythromycin and amoxycillin on *Bordetella pertussis* in the nasopharynx. *Infection.* 1978, 6(5):228-30.
- Wayne P. Twenty second informational supplement CLSI document M100-S22. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, 2012.

CAPÍTULO IV

Estudio de la respuesta de *B. pertussis* a distintas condiciones ambientales, definidas por la presencia de antibióticos y agentes de cambio de virulencia, mediante sensores de nanomovimientos

IV.1 INTRODUCCIÓN

Las altas tasas de mutaciones microbianas y la subsecuente adaptación, facilitan a las nuevas poblaciones bacterianas a tener mayor aptitud para persistir en entornos con dosis elevadas de antimicrobianos (Lomazzi *et al.*, 2019). La rápida propagación de patógenos resistentes es uno de los principales problemas del siglo XXI (Ventola, 2015; Li & Webste, 2018). Incluso, se espera para 2050 que la resistencia a los antimicrobianos sea responsable de más muertes que el cáncer y el SIDA combinados (O'Neill, 2016). Varias organizaciones importantes como el *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*, *Infectious Diseases Society of América*, *World Economic Forum*, y la Organización Mundial de la Salud (OMS o sus siglas en inglés: *WHO*) han declarado a la resistencia a antibióticos como un grave problema de salud pública a nivel global (Michael *et al.*, 2014; Spellberg *et al.*, 2016). Asimismo, en las infecciones bacterianas es necesario lograr un control de la enfermedad en el paciente, como de la propagación y diseminación de la misma. Para ello se requiere un análisis de resistencia a antibióticos rápido y estudios sobre la transmisión bacteriana. Sin embargo, estos métodos requieren de varias horas especialmente cuando se trabaja con bacterias de metabolismo lento, como *B. pertussis*. En esta especie bacteriana, la reciente detección de resistencia a antibióticos en aislados de distintos países como la dispersión de estas cepas resistentes hacia otras regiones es preocupante (Bartkus *et al.*, 2003; Ohtsuka *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013).

En *B. pertussis* los diversos estados de virulencia han sido asociados con el ciclo de infección-trasmisión bacteriana (Kinneer *et al.*, 2001; Trainor *et al.*, 2015; Moon *et al.*, 2017). Durante la transición de la fase virulenta a la avirulenta, *B. pertussis* pierde la capacidad de sintetizar toxinas y otros factores asociados con la patogenicidad. Estos incluyen la toxina pertussis (PT), fimbrias (Fim), adenilato ciclase (Cya), toxina dermonecrótica (TDN), pertactina (PRN), hemaglutinina filamentosa (FHA). Además, la síntesis de los mismos depende de intermediarios generados por vías metabólicas centrales o secundarias inhibidas durante la fase avirulenta, por ejemplo: exopolisacáridos, sideróforos y moléculas de *quorum sensing*. También, se ha registrado que la expresión génica de proteínas de transporte asociadas a la membrana está menos regulada en un estado avirulento (Moon *et al.*, 2017). Además, se ha mencionado en bacterias en fase

avirulenta la regulación positiva de la expresión de genes de choque frío, o genes que intervienen en la biosíntesis de lipopolisacáridos y polisacáridos capsulares (Moon *et al.*, 2017), los cuales interceden en la protección a cambios ambientales y pueden representar una adaptación para asegurar la supervivencia fuera del huésped humano, como en los aerosoles involucrados en la transmisión. De este modo, la adopción de una fase avirulenta implica cambios metabólicos significativos relacionados con la transmisión, persistencia y resistencia a condiciones de estrés (Hot *et al.*, 2003; Karataev, *et al.*, 2016; van Beek, *et al.*, 2018).

En este capítulo proponemos emplear un sensor nanomecánico de movimiento como una posible herramienta para analizar *in situ* la actividad metabólica y procesos de nanomovimiento y disipación de energía generados por células de *B. pertussis* adheridas a un cantilever ultrasensible. De este modo, pretendemos evaluar la respuesta frente a entornos definidos por la presencia de diversas concentraciones de antibióticos, específicamente de macrólidos, eritromicina y claritromicina, utilizados de preferencia en la práctica clínica, y de cotrimoxazol. Este último antibiótico se considera como alternativa en pacientes alérgicos a macrólidos y actúa inhibiendo la síntesis bacteriana del ácido tetrahidrofólico, cofactor necesario en la síntesis del ADN bacteriano (Moriani *et al.*, 2002; Altunaiji *et al.*, 2007). Además, con el objetivo de ampliar el estado del conocimiento sobre el proceso de modulación fenotípica de *B. pertussis*, llevamos a cabo un análisis del patrón de oscilación de cantilevers con bacterias de esta especie adheridas a los mismos expresando distintas fases de virulencia y, durante los procesos de transición de fases y adaptación al ambiente virulento o avirulento en tiempo real.

IV.1.1 Configuración del equipo sensor de nanomovimientos

La muestra de bacterias a estudiar se adhiere a cantilevers comerciales de AFM cuya fluctuación es detectada a través de un sistema óptico. El equipo nanosensor posee un diseño de dimensión relativamente pequeño, es liviano, de fácil instalación y desplazamiento (Figura 1). El dispositivo posee una celda de análisis de 500 μ l o 2 mL, dependiendo la versión a utilizar, con cierre hermético donde se ubica el cantilever empleado en el experimento. Este sistema permite llevar a cabo estudios en condiciones fisiológicas donde la población microbiana se encuentra inmersa en una solución líquida que puede ser medio de cultivo, buffer fosfato, etc. La celda de análisis posee en sus dos

extremos conectores de entrada y de salida, a los que se adaptan mangueras constituyendo de esta manera un sistema de flujo de líquido mediante el cual es posible cargar la cámara y realizar un recambio de fluido. En uno de los extremos se utiliza un sistema de inyección con jeringas contenedoras de los diversos líquidos a estudiar. Un haz de radiación láser se hace incidir sobre el cantilever con ayuda de espejos ubicados en el interior del equipo por encima a la celda. La señal reflejada es registrada mediante un sistema similar al utilizado en AFM, constituido por un fotodiodo que permite realizar la cuantificación de las deflexiones del cantilever (Figura 1). Por debajo de la celda de análisis se encuentra una cámara de video que permite realizar una correcta alineación del láser.

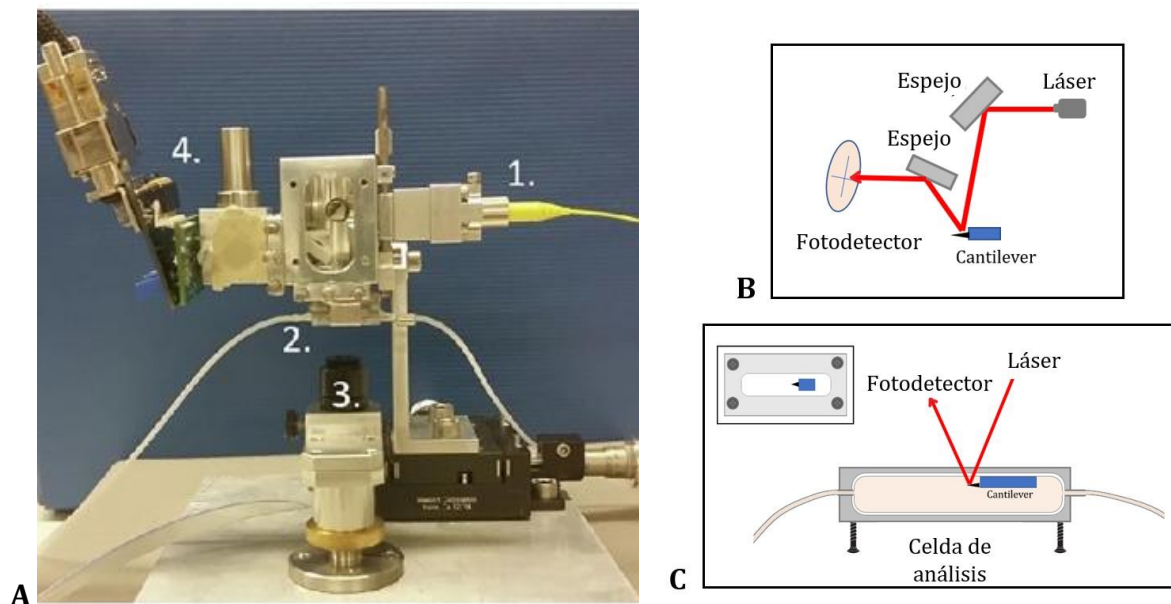


Figura 1. (A) Fotografía del equipo nanosensor, donde se indican sus partes básicas: 1. Fuente de emisión de luz láser, 2. Celda de análisis, 3. Cámara y 4. Fotodetector. (Imagen tomada de Kohler *et al.*, 2019). (B) Esquema representativo del camino de la incidencia y reflexión del láser. (C) Representación gráfica del sistema y de la celda de análisis del equipo donde se ubica el cantilever. En azul se representa el cantilever y en rojo el haz del láser. Recuadro interno en C: esquema ampliado de la vista inferior de la celda de análisis cerrada herméticamente con tornillos ajustables (círculos color gris).

IV.1.2 Principios del método

El sensor de nanomovimiento ha sido empleado en el estudio de varios sistemas biológicos como levaduras, mitocondrias y células eucariotas (Kasas *et al.*, 2015; Ruggeri *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017). En todos los casos la muestra biológica de interés se adhiere sobre la

superficie del cantilever (Figura 2) y si la muestra está metabólicamente activa el mismo oscila, pero tan pronto como la actividad metabólica y / o la viabilidad general de la población disminuye, la oscilación también lo hace. Esta técnica es capaz de investigar el metabolismo bacteriano cuando las muestras están expuestas a diferentes estímulos ambientales, (incluidos fármacos bactericidas), al monitorear las oscilaciones nanométricas del cantilever que son el resultado de la actividad metabólica de células vivas adheridas a la superficie del mismo (Longo *et al.*, 2013). En la Figura 3 está representado el mecanismo básico: antes de la fijación de las muestras vivas al sensor, las fluctuaciones del mismo son pequeñas (Figura 3A), pero cuando las células se inmovilizan en el cantilever, sus fluctuaciones aumentan (Figura 3B). Finalmente, si se matan los microorganismos, a través de un agente químico o físico, el sensor revierte a pequeñas fluctuaciones (Figura 3C).

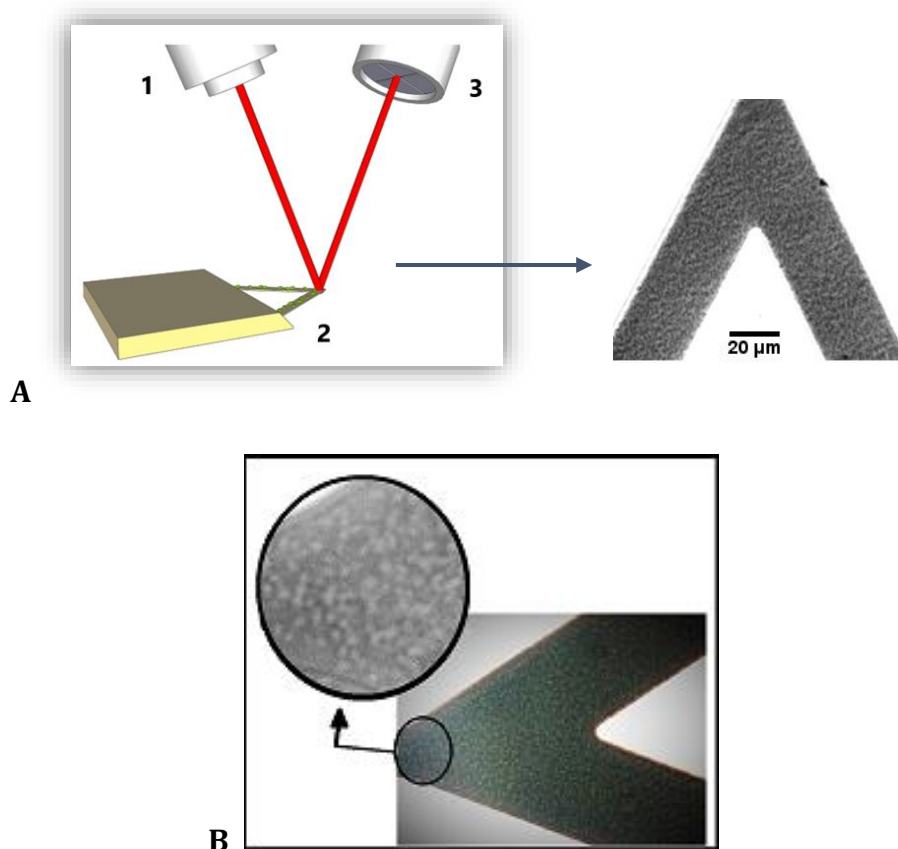


Figura 2. (A) Representación esquemática del principio básico del equipo y la imagen óptica de un cantilever con células de *B. pertussis* adheridas. 1: Fuente de emisión de radiación láser; 2: cantilever; 3: fotodiodo. (B) Imagen óptica de un cantilever con células de *B. pertussis* adheridas y un zoom de la zona apical del mismo.

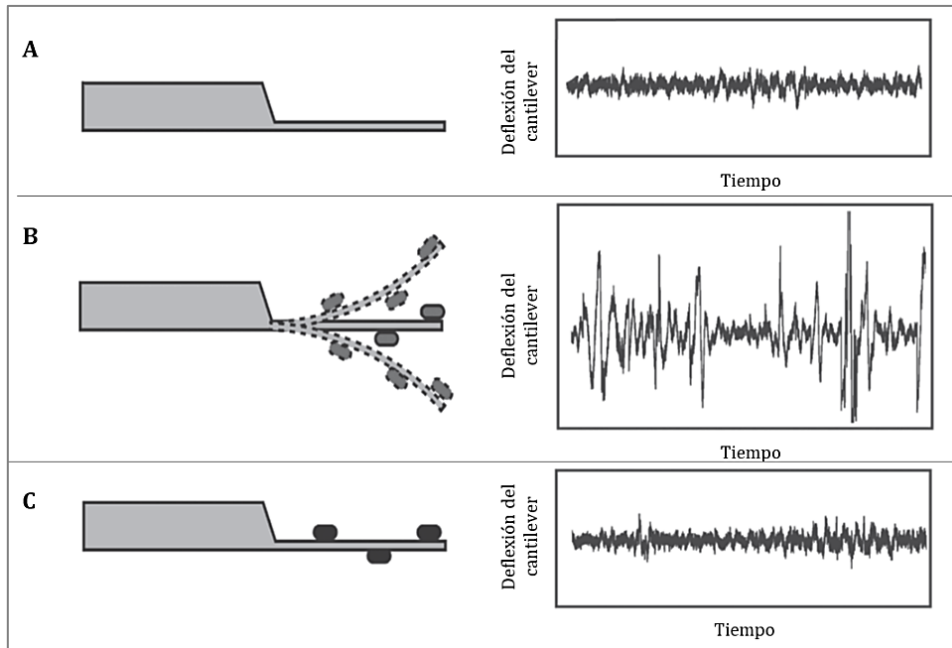


Figura 3. Representación gráfica detallada de un experimento de detección mediante el nanosensor (A) sin bacterias adheridas, (B) con bacterias adheridas vivas y (C) con bacterias adheridas muertas. (Imagen adaptada de Villalba *et al.*, 2018).

Las fluctuaciones pueden ser causadas por diversas fuentes relacionadas con la actividad metabólica de las células eucariotas o procariotas, que combinan el consumo y disipación de energía con el movimiento local o la redistribución de moléculas (Figura 4), esto incluye la reorganización de proteínas, movimientos relacionados con fenómenos de adhesión, producción y tráfico de vesículas, activación de canales iónicos, interacción de la membrana con el sensor o cambios conformacionales de proteínas individuales (Alonso-Sarduy *et al.*, 2014; Kohler *et al.*, 2019). **Por lo tanto, el equipo permite estimar el grado de actividad de las bacterias adheridas en conjunto y la respuesta de los microorganismos vivos a los estímulos externos en un tiempo breve, esto es, antes de completar su ciclo de replicación y durante el proceso de reproducción mismo.**

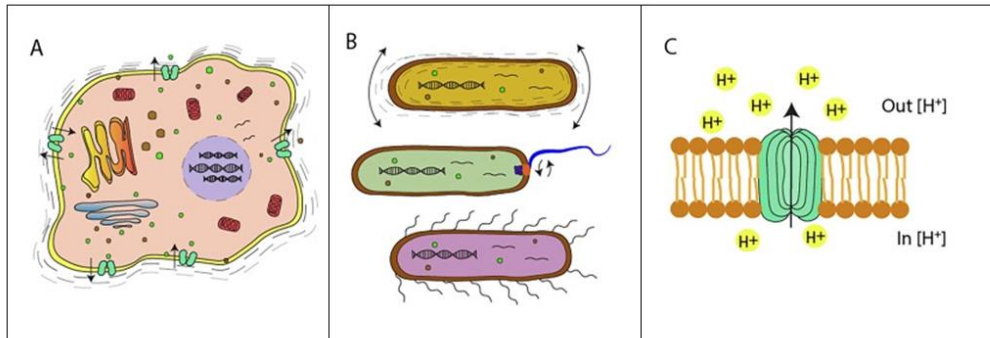


Figura 4. Imagen tomada de Kohler *et al.*, 2019. Mecanismos generales susceptibles de causar el nanomovimiento de células eucariotas y procariotas. (A) Diversos procesos metabólicos podrían generar movimiento de la membrana celular en general, y ser parte de los numerosos mecanismos que causan este nanomovimiento celular, en este esquema se representa un organismo eucariota. (B) Apéndices extracelulares, como pili o flagelos, que son componentes móviles utilizados para la locomoción. (C) Canales iónicos (verde) los cuales cambian la conformación para permitir la entrada o salida de iones específicos (representados con H^+ en amarillo). Esta reorganización de la estructura afecta la bicapa lipídica de las células y podría ser parte del nanomovimiento de las células.

IV.2 OBJETIVOS

*Estudiar la respuesta basada en nanomovimientos de *B. pertussis* en presencia de agentes antimicrobianos en tiempo real y analizar la susceptibilidad a antibióticos en un tiempo reducido.

*Analizar los patrones de nanomovimiento obtenidos mediante el nanosensor de bacterias en diversas fases de virulencia y durante los procesos de cambio del estado de virulencia en tiempo real en ambientes propicios a la modulación de virulencia.

IV.3 MATERIALES Y MÉTODOS

IV.3.1 Bacterias y condiciones de cultivo

Las cepas que se utilizaron en esta etapa del trabajo fueron: *B. pertussis* Tohama I (*Collection of Institute Pasteur, Paris, France -CIP 8132-*); BPSM, una cepa de *B. pertussis* derivada de Tohama I, resistente a estreptomicina (Smr) y la cepa *B. pertussis* 537 (mutante avirulento). Las cepas se crecieron en placas de ABG suplementado con 15% v/v de sangre desfibrinada de carnero durante 72 h a 37°C. Las colonias fueron transferidas a una nueva placa ABG e incubadas por otras 48 h. Luego, el cultivo celular fue inoculado, con una densidad óptica inicial $DO_{650}:0,2$, en erlenmeyers de 100 mL conteniendo 30 mL de medio de cultivo SS, e incubado por 24 h a 37°C en agitación (160 rpm). Después de 24 h de crecimiento, las bacterias se lavaron tres veces en PBS, entre cada enjuague se sedimentaron por centrifugación a 8500 rpm durante 5 minutos, y finalmente se suspendieron en medio SS para obtener una concentración entre 10^6 - 10^8 UFC / mL. A partir de este momento la muestra bacteriana está lista para adherirse al nanosensor. Para estudios comparativos donde el fenotipo virulento se modula a fase avirulenta y viceversa, se cultivó la cepa *B. pertussis* Tohama I en medio líquido SS suplementado con $MgSO_4$ 50 mM (modulador de virulencia).

Los antibióticos usados fueron: eritromicina (Sigma- E6376); claritromicina (Sigma A3487); cotrimoxazol: asociación entre trimetoprima-sulfametoxazol 1:19 (Sigma T7883 y Sigma S7507, respectivamente), y estreptomicina (Sigma S6501). Los dos primeros son macrólidos usados en el tratamiento clínico, el cotrimoxazol es la opción recomendada en pacientes a los cuales no se les puede suministrar macrólidos y la estreptomicina se utilizó específicamente en ensayos comparativos de cepas resistentes vs susceptibles con la cepa BPSM. Las soluciones fueron preparadas minutos antes de ser usadas. En los cultivos de la cepa BPSM al medio líquido SS se le agregó estreptomicina en una concentración de 50 µg/mL (Serra *et al.*, 2011).

IV.3.2 Sección A: Análisis de respuesta a antimicrobianos y puesta a punto de la metodología

IV.3.2.a Controles y puesta a punto del equipo: alineamiento del láser y pureza del medio durante el registro de datos

Como sucede con las medidas de AFM convencional, el alineamiento del sistema de transducción del láser es primordial para un adecuado registro de los movimientos del cantilever, debido a la alta sensibilidad de deflexión de unos pocos ángstroms. Un alineamiento incorrecto durante largos períodos de tiempo de medida puede inducir una reducción de la sensibilidad y causar una mala interpretación de la variación resultante en amplitud de la señal de fluctuación, atribuyéndosele a una respuesta biológica. Como un test de sensibilidad constante del equipo nos basamos en el análisis de Fourier de la señal adquirida mediante el registro de la amplitud y controlamos la forma de la curva de frecuencia de resonancia del cantilever durante la medición. Para estudiar este tipo de perturbación hemos decidido realizar diversos registros de datos con alineaciones incorrectas de manera programada, generando incidencias alejadas del centro del fotodiodo hacia el extremos superior o inferior o hacia los lados.

Estrechamente relacionado con el paso anterior debe realizarse un control preciso de las causas que pueden afectar la deflexión del láser y que no provienen del sistema en estudio. Para ello, debe ser tenida en cuenta la presencia de pequeñas partículas en el medio de cultivo contenido en la cámara de análisis debido a que un incorrecto lavado previo del sistema o de la presencia de partículas en suspensión, pueden modificar el “camino” del láser afectando notablemente los resultados. A modo de un test previo a los ensayos, se realizó un registro de la oscilación del cantilever sin muestras biológicas adheridas como control para los experimentos siguientes.

Para llevar a cabo este análisis del efecto de las partículas en suspensión en la celda de análisis, primero se realizó un registro comparativo de nanomovimiento del cantilever inmerso en medio líquido SS sin filtrar, luego se analizó el mismo medio de cultivo, pero filtrado, y finalmente el medio filtrado y centrifugado. La filtración se realizó mediante membranas de 0,22 micrones y la centrifugación se llevó a cabo a una velocidad de 10000 rpm durante 10 minutos. De esta manera se analizó el efecto sobre el registro de datos de los diversos grados de interferencias de partículas en suspensión en el medio.

Con el objetivo de continuar con este análisis se llevó a cabo un registro de la varianza en un medio de cultivo SS con bacterias libres en el interior de la cámara de medida. Esto

se desarrolló en dos ensayos independientes, uno con bacterias vivas y el otro con bacterias muertas (mediante exposición previa a alcohol 70%).

IV.3.2.b Método convencional de determinación de concentraciones inhibitorias mínimas y concentraciones bactericidas mínimas

La determinación de la CIM y CBM se llevó a cabo mediante la técnica convencional. Brevemente, la técnica incluye el subcultivo de bacterias procedentes de un cultivo de 24 h en medio SS, en tubos con el mismo medio SS adicionado con diluciones crecientes de antibióticos (serie de dilución seriada de concentración), durante 24 h a 37°C en un agitador a 160 rpm. Fueron analizadas entre 10 y 20 diluciones de cada antibiótico y se utilizaron tubos sin antibióticos como control positivo y sin inocular como control negativo. Luego de 24 h, fue determinada la CIM como la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano en medio de cultivo líquido (correspondiente a los cultivos donde la densidad óptica alcanzada es la misma que el control negativo). Las suspensiones resultantes de los cultivos de 24 h fueron crecidas en placas ABG durante 48 h a 37°C, y la CBM fue determinada como la mínima cantidad de antibiótico capaz de lograr la muerte celular del 99,9 % de una población microbiana inoculada en condiciones estandarizadas y se determina convencionalmente mediante la inhibición del crecimiento bacteriano en placas ABG. Este método fue descrito detalladamente en el capítulo anterior.

Durante el desarrollo de estos ensayos se utilizaron concentraciones entre 0-24 µg/mL de macrólidos (claritromicina y eritromicina), 0-160 µg/mL de cotrimoxazol (en este caso se hace referencia a la trimetoprima, la cantidad de sulfametoxazol usada se calcula en proporción 1:19) y 0-200 µg/mL de estreptomina. Las soluciones fueron preparadas minutos antes de ser usadas. En los cultivos de la cepa BPSM al medio líquido SS se le agregó estreptomina en una concentración de 50 µg/mL (Serra *et al.*, 2011).

IV.3.2.c Proceso de funcionalización y adhesión de bacterias a la sonda

El principal objetivo de este protocolo, que resulta de gran importancia en el desarrollo de los experimentos, es lograr una adecuada adhesión de células viables a la superficie del cantilever. Existen varios caminos posibles para asegurar una adhesión bacteriana correcta, dependiendo de la naturaleza y abundancia de la población microbiana. Para el desarrollo de los experimentos de este trabajo de tesis, se llevó a cabo un protocolo de

funcionalización química de la superficie del cantilever utilizando una solución acuosa de glutaraldehído. El método es relativamente simple y solo necesita una pequeña cantidad de agente de funcionalización de la superficie del cantilever.

El proceso de preparación del cantilever se realiza en una placa de Petri fuera del sistema. Se utilizaron cantilevers de Si_3N_4 con constante de fuerza k de 0,06 y 0,12 N/m. Se optó por éstos ya que los de mayor constante (más “duros”) generan menor amplitud de oscilación, pero los blandos pueden romperse más fácilmente durante la manipulación y son más sensibles a interferencias térmicas. Los cantilevers fueron incubados con 10 μL de glutaraldehído (GA) 0,5% durante 10 minutos, y luego se lavaron con agua Milli-Q (ultrapura). La pureza y calidad de la solución de glutaraldehído es muy importante por lo cual fueron preparadas las soluciones frescas para cada experimento. El tiempo de exposición del cantilever a los agentes de funcionalización del sensor determina la cantidad de producto químico adherido a su superficie. Aquí el GA se utilizó con inmovilizador sobre la superficie de la sonda, las bacterias no fueron inmersas en una solución de GA. En el capítulo anterior se detectó la viabilidad de *B. pertussis* luego de la inmovilización con GA.

Una vez funcionalizado, el sensor con GA, éste es incubado con 10 μL de suspensión bacteriana (DO_{595} : 0,7 en una dilución 1:11), la cual procede de un cultivo de 24 h centrifugado a 8000g. El paso de centrifugación fue repetido 5 veces para realizar lavados sucesivos del cultivo. Los cantilevers modificados con *B. pertussis* adheridas en su superficie fueron lavados por inmersión en PBS. Cada paso de inmersión puede producir el desprendimiento de la muestra de la sonda debido a fuerzas capilares, por eso es recomendable realizarlos suavemente. Debe asegurarse una adhesión continua y la viabilidad de los especímenes durante todo el período del experimento. Para esto llevamos a cabo una tinción con el kit de viabilidad: LIVE/DEAD *BacLight*TM y tomamos imágenes de fluorescencia para chequear la viabilidad. Este tipo de experimentos deben ser realizados aparte de las medidas de oscilación, ya que el proceso de tinción podría modificar el metabolismo bacteriano y alterar la señal de nanomovimiento.

IV.3.2.d Automatización del equipo y adquisición de datos utilizando el nanosensor

Luego de insertar el sensor con bacterias adheridas en la cámara de análisis, se carga la celda con el líquido de interés dejando estabilizar el sistema al menos 5 minutos.

Primero, se realizó la medida con medio de cultivo SS sin antibiótico y luego el medio fue reemplazado por medio fresco con diversas concentraciones de agentes antimicrobianos. El movimiento oscilatorio del cantilever fue registrado durante 40 minutos, excepto en los experimentos llevados a cabo a lo largo de 13 horas con la finalidad de analizar en ese lapso temporal el efecto debido al crecimiento bacteriano adherido a la superficie. Las medidas fueron hechas a temperatura ambiente. Cada experimento fue repetido al menos 3 veces para verificar la consistencia de la información obtenida. El medio SS con o sin antibiótico y el PBS fueron filtrados utilizando membranas de 0,22 μm antes de comenzar los experimentos para evitar la interferencia de pequeñas partículas flotando en las proximidades del sensor.

Los experimentos fueron realizados utilizando un equipo diseñado y desarrollado por el grupo del “*Laboratoire de Physique de la Matière Vivante*” de la EPFL. Este dispositivo permite un registro de datos adecuado minimizando la influencia de ruidos durante la medida. El equipo es conectado a un módulo integrado para la entrada y / o salida de señales digitales de sistemas informáticos (USB I/O) (*National Instruments* - Austin, Texas, USA), que es un dispositivo periférico capaz de interactuar con los elementos externos al sistema de forma bidireccional, es decir, permite introducir datos o información en la computadora para que ésta los procese u ordene. Las oscilaciones son usualmente adquiridas y procesadas por un software externo que requiere una alta frecuencia de adquisición de datos debido a la variabilidad innata de la señal medida. Para ello se utiliza el software Labview (*National Instruments* - Austin, Texas, USA) mediante una rutina casera desarrollada en el laboratorio del EPFL.

Las medidas se han registrado con frecuencias de adquisición de datos 20 kHz (20000 puntos por segundo) a 16 bits. Se utiliza una tasa de muestreo lo suficientemente alta para asegurar que las fluctuaciones permitan calcular la frecuencia de resonancia del cantilever (en líquido el pico de resonancia reflejado en un gráfico de amplitud vs frecuencia es más ancho que el registrado en medidas al aire, con un máximo típicamente superior a 3 kHz para la mayoría de los cantilevers blandos). En todos los casos, la información más importante que proviene de la actividad metabólica de la muestra biológica se encuentra a frecuencias mucho menores (principalmente hasta 1000 Hz) que la frecuencia de resonancia del sensor (3 a 30 kHz).

La reducción del ruido de origen externo puede tener un gran impacto en experimentos de nanomovimiento. Las medidas fueron realizadas con el instrumento ubicado sobre mesas con aislación vibracional, manteniendo el nivel de iluminación y temperatura de la habitación donde se lleva a cabo la medida y evitando todo tipo de movimiento incluyendo conversaciones cercanas.

IV.3.2.e Análisis de datos registrados con el nanosensor

El análisis de datos requiere varios pasos para extraer información de importancia biológica, la cual puede ser automatizada usando diversos programas informáticos. De este modo inicialmente los resultados de un experimento de nanomovimiento se presentan en un gráfico de las fluctuaciones del cantilever en función del tiempo. De esta manera, información básica tal como la actividad metabólica de las bacterias puede ser extraída de los datos registrados. Se puede realizar un promedio de los valores de deflexión en las diferentes condiciones experimentales y representarlo en un gráfico donde cada barra representa la deflexión media de la deformación como medida cuantitativa final que determina el resultado.

Sin embargo, para continuar con el objetivo de extraer la información biológicamente relevante y lograr una caracterización más profunda, los datos colectados en nuestros experimentos fueron analizados utilizando una rutina del software MatLab desarrollada por Petar Stupar del LPMV-EPFL (Venturelli *et al.*, 2020). De este modo se lleva a cabo el cálculo de la varianza de las oscilaciones: la información se divide en pequeños segmentos de 10 segundos y se calcula la varianza de cada uno de éstos. El gráfico resultante obtenido usando el software mencionado, representa la evolución de la varianza de la señal a través del experimento (Figura 5). Este gráfico es una representación muy útil, ya que evidencia cualquier valor atípico, sus tendencias y, lo que es más importante, los cambios de señal obtenidos. Adicionalmente para un análisis más completo se puede obtener un promedio de los valores de varianza de deflexión.

La respuesta de sistemas biológicos vivos frente a la exposición a antibióticos puede ser extremadamente variable lo que puede generar resultados falsos-positivos o falsos-negativos en la señal. Por ejemplo, en algunos casos, las fluctuaciones se alteran siendo más frecuentes en el momento del contacto inicial con la droga o por el contrario se reducen y retoman a una oscilación normal después de unos pocos minutos, debido a esto

deben evitarse los primeros minutos de registro de datos. Durante este trabajo la señal comenzó a analizarse luego de 5 minutos en los cuales dimos lugar a la estabilización de la muestra y del líquido recién inyectado a la celda de análisis.

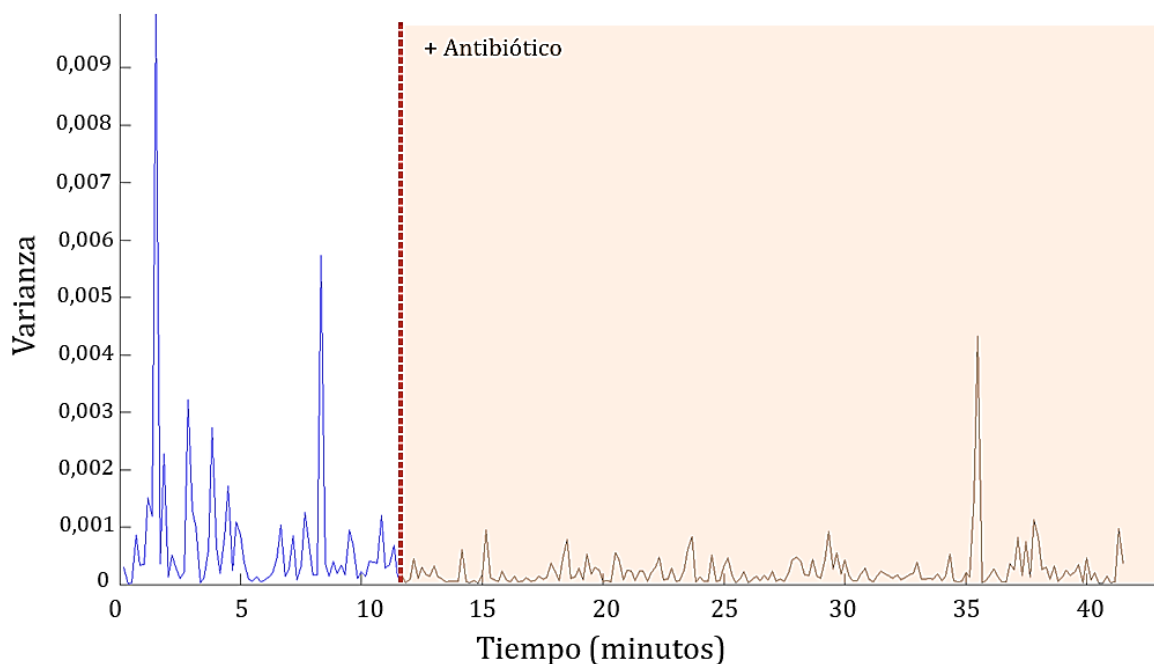


Figura 5. Gráfico representativo de la varianza de la amplitud de oscilación del sensor vs tiempo transcurrido desde el comienzo del experimento obtenido mediante el análisis con MatLab de un experimento de exposición bacteriana a antibióticos (sector en trazo azul: sin exposición a antimicrobianos; sector negro con fondo coloreado: exposición a antibióticos). El pico observado luego de 35 minutos podría corresponder a una interferencia durante el registro de datos.

IV.3.2.f Ensayo de resistencia a antibióticos mediante el uso de técnicas colorimétricas: cloruro de tetrazolio (TTC)

Para validar los resultados de susceptibilidad a antibióticos adquiridos con el equipo de nanomovimientos y evaluar con un método alternativo la sensibilidad del nanosensor ante cambios de la actividad metabólica los resultados obtenidos se compararon con métodos de análisis de actividad metabólica reportados como convencionales, específicamente mediante técnicas colorimétricas (Moussa *et al.*, 2013). El cloruro de tetrazolio (TTC) es un indicador redox usado para analizar la actividad metabólica de las bacterias. Esta molécula incolora vira hacia el color rojo a través de un proceso de reducción como consecuencia de la respiración celular. Consecuentemente, la actividad

metabólica es proporcional a la intensidad del color rojo obtenido, la cual se analiza colorimétricamente a través de la medición de la absorbancia (Figura 6).

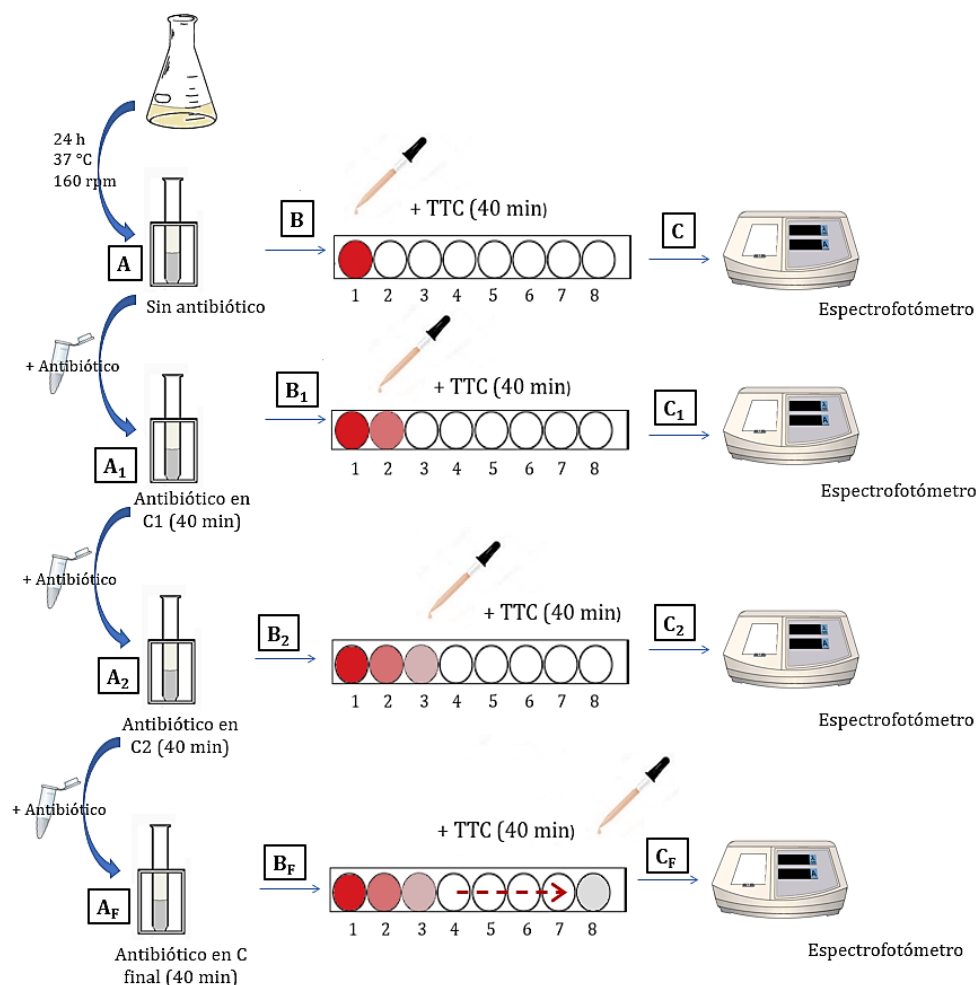


Figura 6. Ensayo de susceptibilidad a antibióticos con el test TTC. A partir de un inóculo crecido sin la presencia de antibióticos se realizan exposición sucesiva de la muestra a concentraciones crecientes de antibióticos en el tiempo, representado en los pasos A, B y C, los cuales se repiten hasta completar la secuencia sucesiva de concentraciones de antibióticos a las cuales es expuesta durante el ensayo de susceptibilidad. Se toma una muestra del cultivo líquido de 24 h y se expone sucesivamente a concentraciones crecientes de antibióticos durante 40 minutos cada etapa, (B1 hasta B final). Luego de los 40 minutos y antes de incrementar la concentración del antimicrobiano, se toma una muestra la que se incubó con TTC para realizar la posterior medida colorimétrica. Los pasos B-C se repiten a medida que incrementa la concentración de antibiótico.

En estos ensayos se prepara una suspensión bacteriana de $DO_{650}=2,5$ a partir de células provenientes de un cultivo líquido de 24 h, la cual fue expuesta de manera sucesiva a concentraciones crecientes de antibióticos durante 40 minutos (de manera similar al protocolo a implementar con el nanosensor en los ensayos de análisis de resistencia a antibióticos). Luego de cada incubación, se tomó una muestra de 200 μ L de dicha suspensión bacteriana y se incubó con 20 μ L de TTC en concentración 0,01%

durante 40 minutos en placas multipocillo a temperatura ambiente y al resguardo de la luz. Finalmente, se midió la densidad óptica mediante el registro de absorbancias a 490 nm por un espectrómetro.

IV.3.3 Sección B: Análisis de la respuesta a agentes que inducen un cambio de fase de virulencia

IV.3.3.a Equipo nanosensor utilizado mediante ensayos de Espectroscopía de nanomovimiento

Estos ensayos se ejecutaron con la versión II del nanosensor (Figura 7). El dispositivo en este caso consta de dos celdas de análisis con sus respectivos sistemas láser, fotodetectores y equipo electrónico, que permite realizar dos experimentos al mismo tiempo. La celda de análisis tiene una capacidad de 1 a 2 mL.

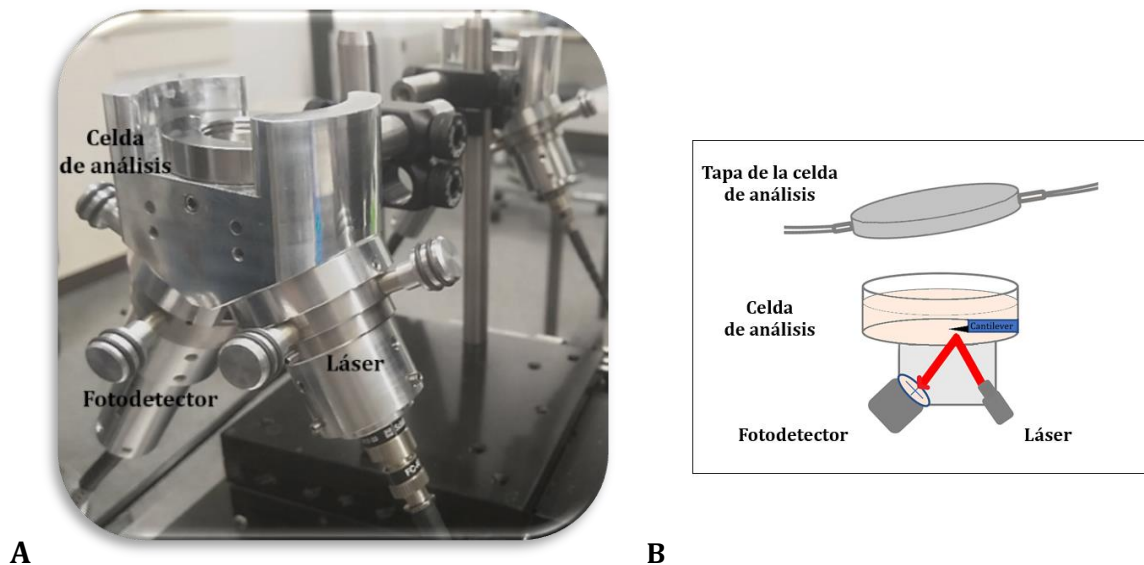


Figura 7. (A) Equipo nanosensor versión II. Posee dos sistemas de análisis (en la foto se ubica uno al frente donde están señaladas las partes principales y el otro idéntico detrás). Este nuevo diseño es más fácil de manipular y permite llevar a cabo análisis simultáneos y un adecuado posicionamiento debajo de un microscopio óptico. (B) Esquema representativo de la incidencia y reflexión del láser. En azul se representa el cantilever y en rojo el haz del láser.

Antes de la medición, el medio líquido se filtró con un filtro de 0,22 μm . Para eliminar la interferencia inducida por la temperatura sobre el cantilever, las medidas se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Después del montaje del chip con el nanosensor ensamblado en la cámara de análisis, se deja estabilizar el conjunto por 5 minutos. La preparación de la muestra bacteriana y la adquisición de datos se realizan mediante el mismo protocolo mencionado en la sección A de este capítulo. El dispositivo empleado en los experimentos está equipado con un microscopio óptico y una cámara posicionada en la parte superior que permite recopilar imágenes del nanosensor a lo largo de cada experimento y verificar la ubicación de incidencia del láser.

IV.3.3.b Preparación del cantilever

En esta etapa, se utilizaron cantilevers comerciales con una longitud de 130 μm , frecuencia de resonancia de 32 kHz y una constante de fuerza de 0,1 N/m, con un recubrimiento de Au de 60 nm de espesor (cantilever sin punta SD-qp-CONT, NANOSENSORS, Nanoandmore, GmbH, Alemania) y un chip de soporte de silicio (SD-ALIGN, NANOSENSORS TM, NanoWorld AG). Además, se utilizó el protocolo de inmovilización celular mediante polilisina. Los cantilevers se incubaron durante 5 minutos con una gota (20 μL) de solución de poli-L-lisina al 0,1% (SIGMA). Luego, se dejaron secar al aire durante 3 minutos y se incubaron con la suspensión bacteriana durante 40 minutos a 37°C. Se realizaron tres lavados con PBS para eliminar las bacterias no adheridas o débilmente adheridas y, finalmente, el cantilever con bacterias adheridas se colocó en el soporte de silicio e inmediatamente se introdujo en la cámara de análisis con el medio de cultivo para llevar a cabo las medidas.

La Figura 8 representa imágenes ópticas del cantilever con bacterias adheridas al dispositivo. La presencia de las bacterias en la superficie del cantilever es bastante evidente, pero para verificar la densidad y el estado de las bacterias adheridas al sensor a una resolución más alta, una vez finalizado el registro de datos se realizó una tinción de células con SYTO9, y se verificó que las células de *B. pertussis* permanecen firmemente unidas a los cantilevers.

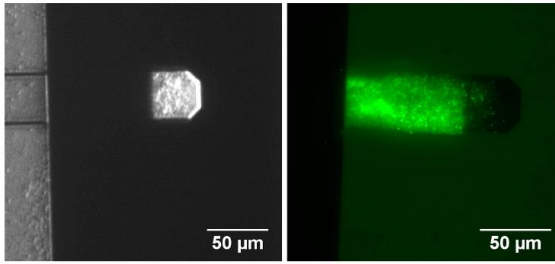


Figura 8. Imagen óptica de un cantilever SD-qp-CONT con *B. pertussis* adheridas ubicado en el nanosensor.

IV.3.3.c Desarrollo experimental y análisis de datos

Los experimentos típicos duraron 120-180 minutos durante los cuales las oscilaciones del cantilever se registraron a una velocidad de muestreo de 20 kHz. En esta sección del capítulo el procesamiento de datos consistió en dividir la señal registrada, es decir, el desplazamiento oscilatorio del cantilever, en fracciones de 10 segundos de duración. Para eliminar los movimientos del cantilever que no se consideran biológicamente relevantes, a cada una de estas secciones le fue restado el ajuste lineal de la señal. Luego, los desplazamientos verticales del cantilever fueron reflejados en histogramas. Cada columna del histograma representa cuántas veces se movió el cantilever a cada distancia dada. Finalmente, para aumentar la legibilidad, mostramos los histogramas como diagramas de violín, mediante el procesamiento utilizando MatLab2013. La Figura 9 muestra la forma en que se construyen dichos gráficos, también denominados espectrogramas de nanomovimiento, donde se representa cuántas veces (eje de abscisas del espectrograma) el cantilever se movió una distancia dada (eje de ordenadas) durante un lapso de 10 segundos.

El gráfico violín es un híbrido entre un diagrama de caja (boxplots) y un gráfico de densidad o histograma, donde se logra mostrar de manera visualmente simple la distribución de los datos y su densidad de probabilidades. La interpretación de la forma del violín es exactamente la misma que un gráfico de densidad: la parte más gruesa significa que los valores en esa sección del violín tienen una frecuencia más alta, y la parte más delgada implica una frecuencia más baja. Si bien los boxplots también permiten comparar grandes conjuntos de datos de manera simple, pueden ser engañosos ya que tiende a ocultar detalles importantes sobre la distribución de los valores y no permite determinar si es una distribución bimodal o multimodal. Además, a diferencia de los gráficos de barras con medias y barras de error, los gráficos de violín contienen todos los

puntos de datos, lo que los convierte en una excelente herramienta para visualizar también muestras con menor número de datos.

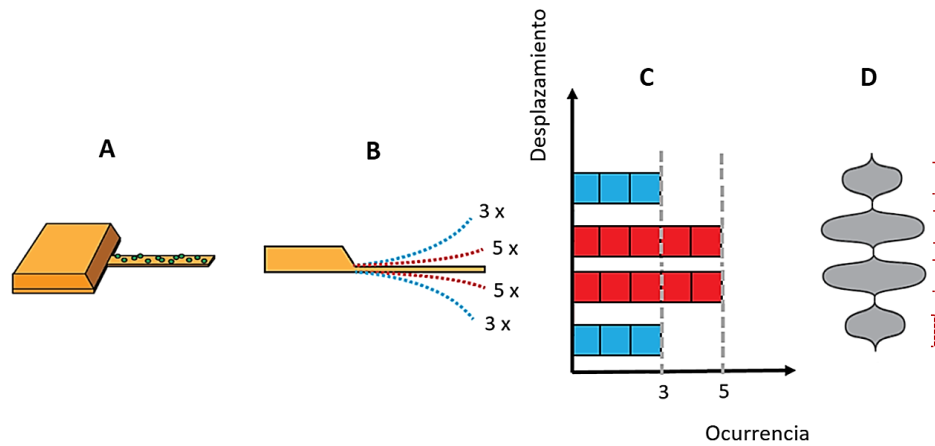


Figura 9. Descripción esquemática de la forma en que se generan los espectrogramas de nanomovimiento. El cantilever con las bacterias adheridas, (A), se desvía 5 veces a una distancia corta (líneas discontinuas rojas) y 3 veces a una distancia mayor (líneas de color azul claro) (B). El número de ocurrencias de desplazamiento se traza como un histograma en (C). Finalmente, el histograma se vuelve a dibujar como un diagrama de violín vertical (denominado espectrograma de nanomovimiento) en (D). La amplitud del movimiento del cantilever se muestra a lo largo del eje vertical, mientras que el número de ocurrencias de movimiento se muestran simétricamente a lo largo del eje horizontal del gráfico. En el gráfico violín se pueden distinguir fácilmente 4 protuberancias, marcadas con un corchete llave color rojo.

IV.4 RESULTADOS

IV.4.1 Sección A: Puesta a punto del equipo. Adaptación al estudio y análisis de *B. pertussis* expuesta a entornos definidos por la presencia de antimicrobianos

V.4.1.a Análisis de alineamiento del láser y cambios en la sensibilidad del equipo. Estudio del efecto de la pureza del líquido de la celda de análisis del nanosensor

El registro adecuado de datos mediante el equipo nanosensor depende de la correcta incidencia del láser. La optimización de las condiciones de lectura de la muestra demostró que el láser debe ser focalizado justo en la región apical del cantilever y su reflexión debe enfocarse en la parte central del fotodiodo. Mediante el análisis de una curva de

resonancia, es decir del registro de la amplitud vs la frecuencia, pudimos detectar cómo la señal disminuye a causa de una mala alineación (Figura 10).

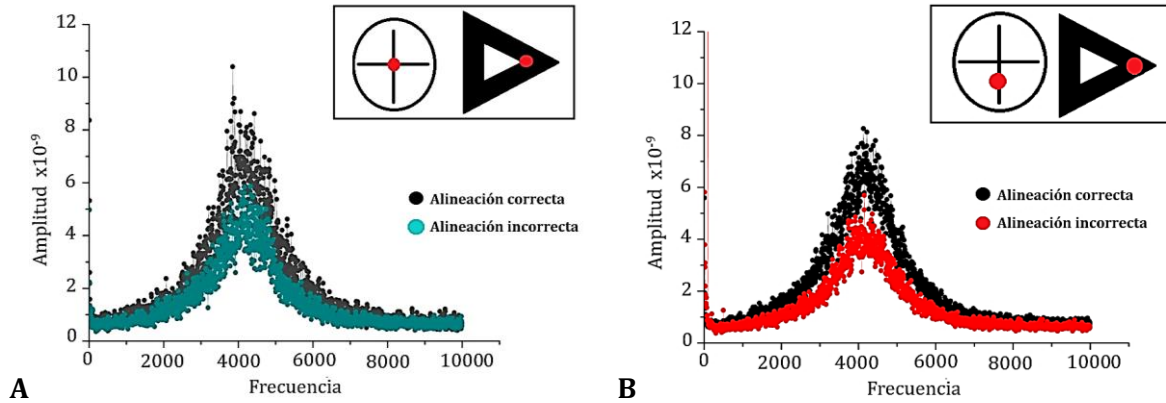


Figura 10. Relación entre la incorrecta alineación del láser y la forma del pico de resonancia del cantilever. El láser debe ser focalizado en el ápice del cantilever y reflejado en el centro del fotodetector. Cualquier mala alineación compromete la sensibilidad de la señal (disminución del pico-amplitud). En (A) se representa un error de alineación donde el láser incide de manera errónea sobre el cantilever pero no sobre el fotodetector, (esquematizado en el recuadro superior), y se soluciona mediante un ajuste del mismo. En el error indicado en (B), el láser incide en la posición correcta sobre el cantilever pero no se refleja en la parte central del fotodetector, (recuadro superior), y logra solucionarse mediante un ajuste en la posición del fotodetector.

Además, la varianza registrada del cantilever demostró que cambia según la presencia de partículas en suspensión en el medio, siendo siempre menor el valor de la correspondiente al medio filtrado que la correspondiente al medio sin procesos de purificación (Figura 11).

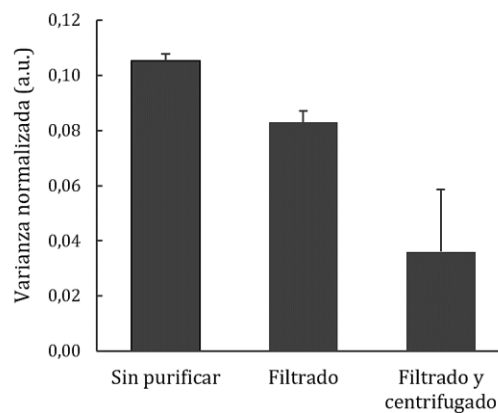


Figura 11. (A) Varianzas normalizadas de medidas realizadas en medio sin purificación, filtrado y filtrado y centrifugado.

IV.4.1.b Análisis de sensibilidad a antibióticos de poblaciones de *B. pertussis* mediante sensores de nanomovimientos

Previamente a las medidas con el nanosensor, se determinó el valor de la CIM y CBM de estreptomicina para la cepa *B. pertussis* Tohama I, los cuales son 2,5 µg/mL y 10 µg/mL, respectivamente. Por el contrario, como era de esperar la cepa resistente a este antibiótico: BPSM, fue capaz de crecer en concentraciones tan altas como 200 µg/mL (Figuras 12).

Luego, se monitorearon en primer lugar las oscilaciones del sensor con la cepa resistente a estreptomicina adherida, *B. pertussis* BPSM, inmerso en medio líquido en presencia (50 µg/mL) y ausencia del antibiótico en la cámara de análisis (Figura 13 A y B). Como era de esperar, la varianza en la oscilación del sensor es similar cuando la cepa BPSM se analiza en medio SS con o sin estreptomicina lo que nos indica que la actividad metabólica de la bacteria resistente al antibiótico no se modifica en presencia de este agente antimicrobiano. Sin embargo, la varianza de la señal decrece significativamente cuando la bacteria es incubada con otro antibiótico tal como el cotrimoxazol, lo que sugiere una caída en la actividad metabólica específicamente a causa de la presencia de un antibiótico al que es sensible (Figura 13 C y D).

De esta manera podemos afirmar que el equipo es lo suficientemente sensible como para registrar y diferenciar células metabólicamente activas de células que no lo están, en particular como en este caso, cuando una cepa de *B. pertussis* es expuesta a un antibiótico al que es resistente y cuando es expuesta a uno al que es sensible.

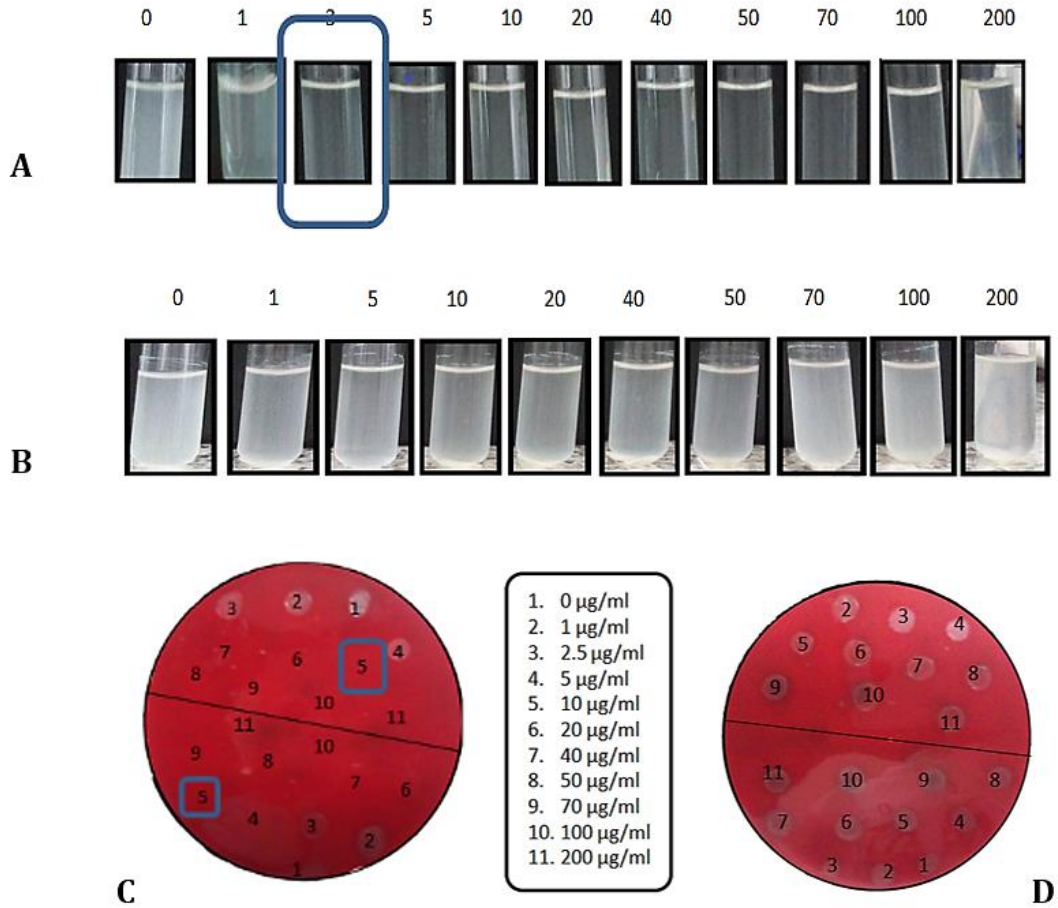


Figura 12. Determinación de la CIM mediante el método convencional de crecimiento en medio líquido: (A) *B. pertussis* Tohama I, MIC: 2,5 µg/mL para estreptomicina y (B) *B. pertussis* BPSM empleada como control, CIM > 200 µg/mL para estreptomicina. En A y B, los números sobre cada cultivo indican la concentración de estreptomicina (µg/mL) en cada uno de ellos. En (C) se muestra la determinación de la CBM mediante el método convencional de subcultivo en agar de *B. pertussis* Tohama I, CBM: 10 µg/mL y (D) de *B. pertussis* cepa BPSM empleada como control, CBM > 200 µg/mL. Las referencias del recuadro intermedio expresan las concentraciones de estreptomicina respectivas a cada punto de siembra en placa.

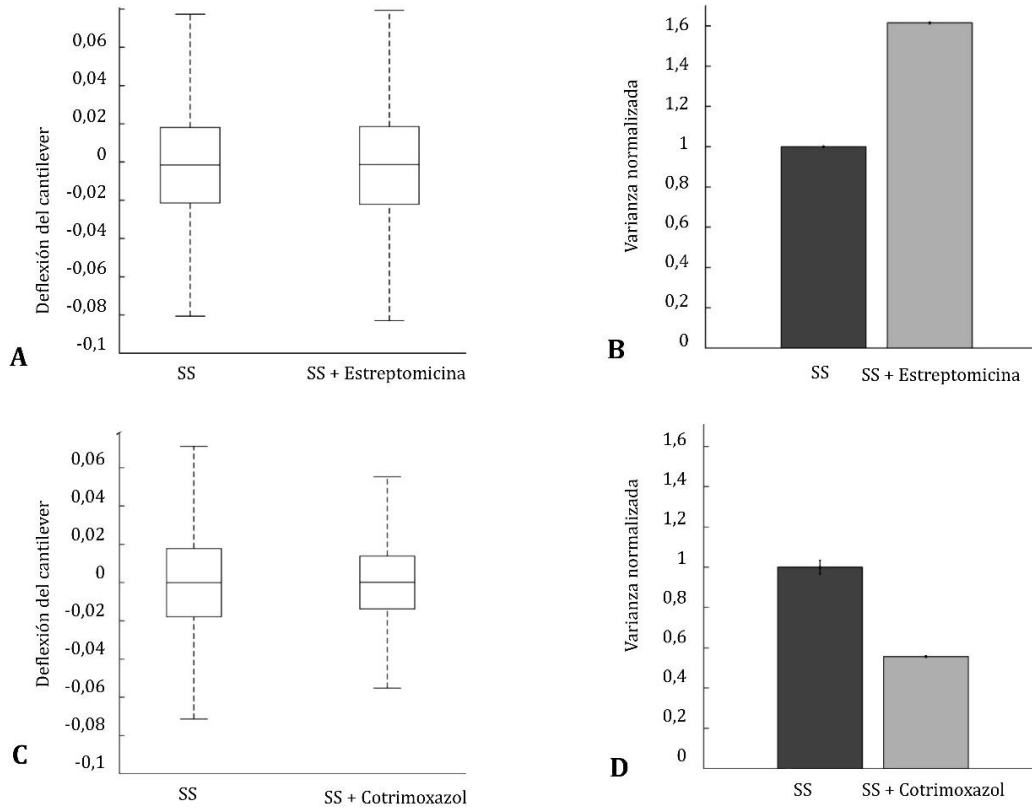


Figura 13. Respuesta de *B. pertussis* BPSM, cepa resistente a estreptomicina, a la presencia de antibióticos evaluada a través de la amplitud de la oscilación del nanosensor. (A) Boxplots de la deflexión del cantilever y (B) gráfico de barras de la varianza normalizada antes y después de la introducción de estreptomicina; el gráfico de barras de varianza muestra un incremento en las oscilaciones del cantilever, es decir, la bacteria continúa su ciclo de vida. (C) Boxplot de la deflexión del cantilever y (D) gráfico de barras de la varianza de la señal obtenidos de ensayos con y sin cotrimoxazol (las barras corresponden a un promedio de la señal registrada durante 15 minutos luego de 40 minutos de incubación con el antibiótico en concentración: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Bacterias adheridas al cantilever mediante GA 0,5%.

IV.4.1.c Registro de oscilaciones del sensor con *B. pertussis* adheridas a su superficie a lo largo de 13 h en medio líquido SS

Una vez demostrada la capacidad del sensor de nanomovimiento de diferenciar entre bacterias vivas y muertas, (o susceptibles/resistentes), se llevó a cabo un análisis de la oscilación del cantilever con células de *B. pertussis* Tohama I adheridas en su superficie, en medio SS durante 13 horas, sin la presencia de condiciones estresantes tales como las que impondría el antibiótico. Durante el experimento, el medio de incubación de la celda de análisis fue reemplazado por medio fresco cada 1 h con el fin de eliminar posibles partículas desprendidas de las bacterias adheridas o precipitados resultantes de posibles cambios de pH del medio, cristalizaciones del medio, etc., que podrían llegar a

distorsionar la medida o generar una pérdida de sensibilidad del equipo. En la Figura 14 se muestra la varianza del movimiento del cantilever con bacterias adheridas obtenida a lo largo del tiempo. Para lograr una clara representación, los valores de varianza fueron normalizados respecto a la varianza del movimiento del cantilever de la primera medida (2 horas). A partir de las 6 horas desde el inicio del experimento se observó un aumento de las oscilaciones del sensor en el tiempo. Este fenómeno podemos asociarlo con la replicación de las células adheridas al nanosensor, las cuales podrían estar iniciando la fase de crecimiento exponencial típica de la curva de crecimiento bacteriana.

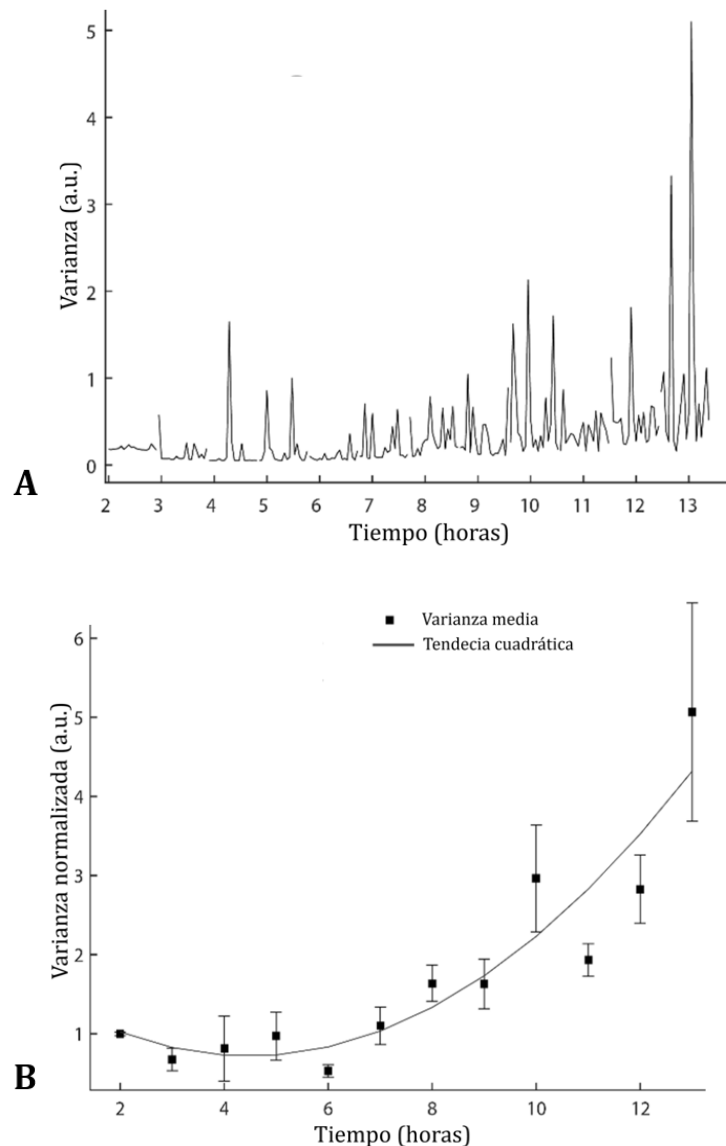


Figura 14. Varianza de la señal oscilatoria del cantilever con células de *B. pertussis* adheridas, mediante GA 0,5%, a la sonda analizadas durante 13 h de incubación en medio SS. (A) Gráfico de varianza, normalizada respecto al valor inicial registrado, a lo largo del tiempo. El valor inicial fue registrado a las 2 horas y se consideró como la unidad (1). (B) Varianzas promedio registradas cada 1 h donde se refleja el incremento de la oscilación a lo largo del tiempo.

La forma del gráfico de varianza normalizada obtenido fue similar a una curva de crecimiento típica de *B. pertussis* reportada por nuestro grupo previamente (Arnal *et al.*, 2015). Esto corrobora que luego del proceso de adhesión las células continúan con el crecimiento sobre el cantilever.

IV.4.1.d Análisis de la respuesta de *B. pertussis* a la presencia de macrólidos utilizando el equipo nanosensor de movimiento

En el capítulo anterior indicamos los valores de CIM y CBM para eritromicina de *B. pertussis* obtenidos mediante la técnica convencional. Aquí llevamos a cabo la determinación de los mismos para otro macrólido utilizado en el tratamiento clínico de pertussis: claritromicina, y obtuvimos valores de CIM: 0,03- 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y CBM: 2,5-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *B. pertussis*. Teniendo en cuenta estos resultados seleccionamos un rango de concentraciones de antibióticos a efectos de analizar con el nanosensor la respuesta evaluada por nanomovimientos de células de *B. pertussis* frente a la presencia de los mismos. Optamos por comenzar con el análisis de la exposición de *B. pertussis* Tohama I a los valores de CBM durante 3 horas, donde se registró una reducción en la amplitud de la oscilación del nanosensor y de su correspondiente varianza luego de la exposición del cantilever con bacterias adheridas al antibiótico (Figura 15). Este resultado fue corroborado con la tinción de fluorescencia LIVE/DEAD *BacLight*TM, tras la incubación en presencia del antibiótico, donde se observó su gran efecto sobre las bacterias adheridas, según indicaba el color del yoduro de propidio (indicador de ruptura de membrana) (Figura 15).

La misma concentración fue chequeada nuevamente, pero en un tiempo reducido de 40 minutos para ambos macrólidos, y una vez más la varianza de la oscilación del cantilever disminuyó significativamente en presencia de la CBM de eritromicina y claritromicina (Figura 16).

De esta manera observamos la reducción de la amplitud de deflexión, así como de la varianza debido al efecto de los macrólidos, y confirmamos que 40 minutos es un tiempo suficiente para registrar el efecto de los antibióticos en células de *B. pertussis* Tohama I.

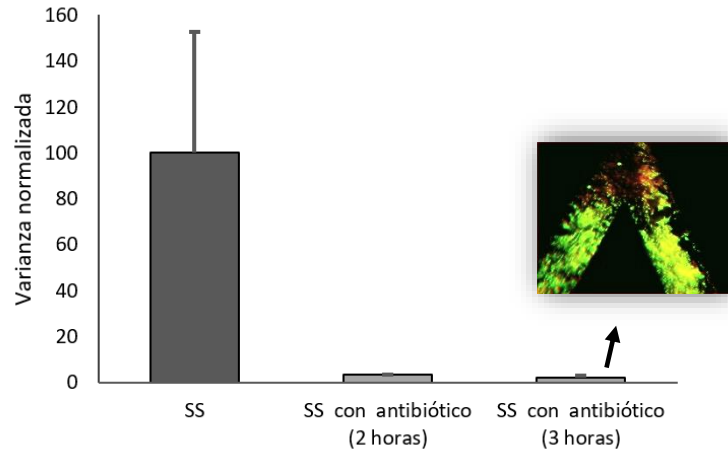


Figura 15. Varianza normalizada del movimiento oscilatorio del sensor con células de *B. pertussis* adheridas a su superficie en presencia de claritromicina (CBM) en el medio de cultivo registrada a las 2 h y 3 h. Recuadro: Imagen de fluorescencia del cantilever luego de finalizar el ensayo; tinción kit comercial LIVE/DEAD, las bacterias están principalmente muertas.

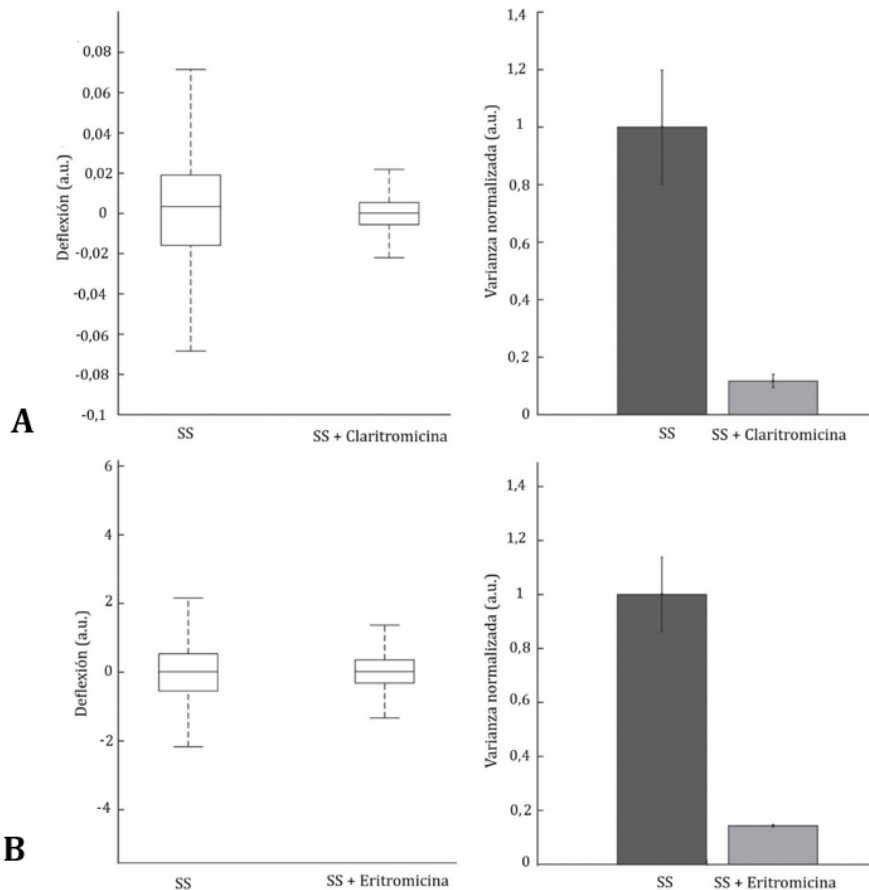


Figura 16. Efecto de la CBM de los antibióticos claritromicina y eritromicina sobre la oscilación del cantilever con células de la cepa *B. pertussis* Tohama I adheridas: (A) claritromicina (parte superior) y (B) eritromicina (gráficos de la parte inferiores). Datos tomados durante 40 min de exposición. En los gráficos de la izquierda se ve la amplitud de la deflexión y en los de la derecha la varianza normalizada respecto al valor adquirido en las medidas adquiridas en medio de cultivo sin la presencia de antibióticos.

IV.4.1.e Exposición a concentraciones variables de antibióticos: Test de sensibilidad evaluado por nanomovimientos

En este apartado se discutirán los resultados sobre el estudio del efecto de diversas concentraciones de eritromicina y claritromicina sobre la cepa *B. pertussis* Tohama I, con el fin de llevar a cabo un análisis similar al test de susceptibilidad de uso convencional mediante el registro de la oscilación del sensor durante la exposición a concentraciones crecientes de antibióticos en el medio de cultivo. De esta manera se incubó cada cepa en medio SS con concentraciones crecientes de antibióticos desde 0 a 10 µg/mL. Este rango de concentraciones incluye los valores de CIM y CBM para dichos macrólidos obtenidos en ensayos previos (CIM: entre 0,6 y 0,12 µg/mL; CBM: entre 2,5 y 5,0 µg/mL).

En la Figura 17 se detallan los resultados obtenidos. Sorpresivamente se registró un aumento inicial de la varianza seguido de un descenso gradual del movimiento oscilatorio detectado hasta llegar a un punto donde se mantiene relativamente estable, con un movimiento muy pequeño, casi basal. Al comparar con los resultados obtenidos mediante el test de sensibilidad convencional verificamos que el máximo de varianza coincide con el rango de CIM detectado previamente por métodos convencionales; es decir, la actividad metabólica y la energía disipada alrededor del cantilever, que causa el movimiento de la sonda con células de *B. pertussis* adheridas a la superficie, se incrementaron cuando las células fueron expuestas a concentraciones de antibióticos menores a la CIM hasta llegar al valor de dicha concentración. A partir del valor de CIM, las varianzas registradas disminuyeron drásticamente a medida que la concentración del antibiótico aumentaba hasta alcanzar los valores coincidentes con los correspondientes a la CBM determinada por el método convencional. Desde entonces, la varianza de la señal oscilatoria disminuyó a los valores más bajos registrados durante los experimentos.

En base a la reproducibilidad de los ensayos, es posible confirmar la correlación entre el test convencional de resistencia a antibióticos y el método de nanomovimientos, y determinar mediante el uso de este innovador sensor la susceptibilidad a antimicrobianos. Las concentraciones de CIM y CBM obtenidas con los métodos convencionales y las obtenidas con el nanosensor resultaron coincidentes.

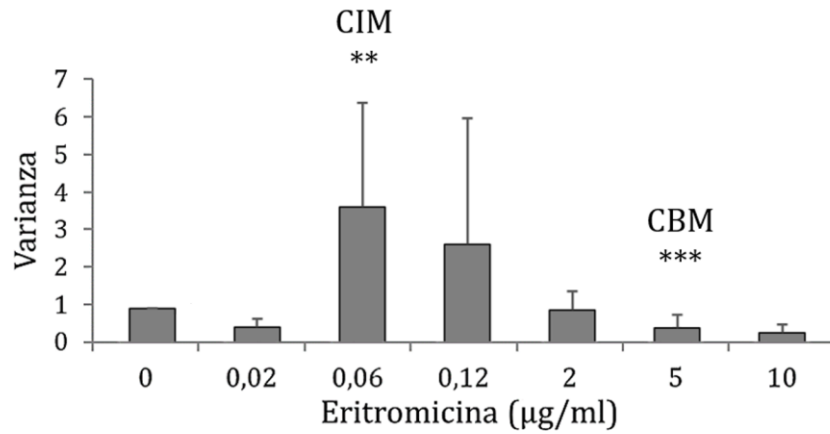


Figura 17. Varianzas normalizadas del movimiento del sensor obtenido cuando *B. pertussis* Tohama I está expuesta a distintas concentraciones de eritromicina. Los valores de CIM y CBM obtenidos por el método convencional se encuentran indicados. Cada barra pertenece a promedios de varianza de un periodo de tiempo correspondiente a media hora. Análisis estadístico mediante *t*-Student de las diferencias de varianza con el valor promedio sin la presencia de antibiótico en el medio, primera barra, ** $p < 0,05$ y *** $p < 0,01$.

Posteriormente, para confrontar los resultados del nanosensor con técnicas convencionales de análisis de actividad metabólica, se llevó a cabo un ensayo de resistencia a antibióticos mediante el uso de técnicas colorimétricas empleando el agente Cloruro de tetrazolio (TTC). Siguiendo los mismos tiempos utilizados en las medidas con el nanosensor, se tomó un inóculo de un cultivo *over-night* que fue sometido a incubaciones de 40 minutos con distintas concentraciones de antibióticos. Luego de cada incubación se registró la respectiva medida de absorbancia. Se puede observar mediante esta técnica un pequeño incremento de la absorbancia a valores cercanos a la CIM como en valores cercanos a la CBM, pero no es posible distinguir con claridad el efecto de las distintas concentraciones de antibióticos (Figura 18).

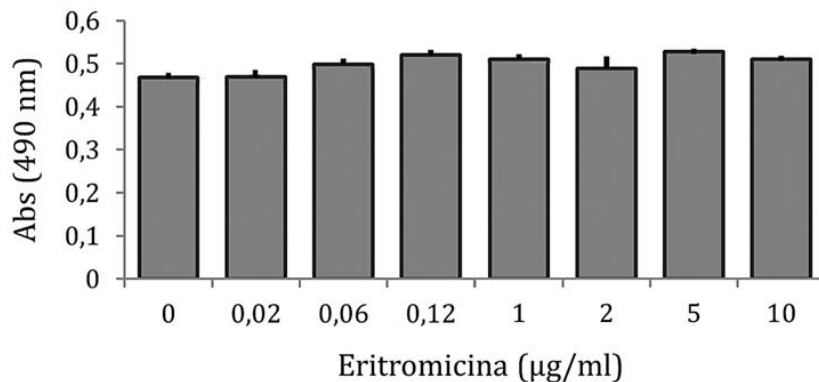


Figura 18. Análisis por TTC luego de la exposición de *B. pertussis* Tohama I a eritromicina en una serie de concentraciones crecientes durante 40 minutos.

Finalmente, para chequear la viabilidad de las bacterias durante el llamativo pico de varianza registrado en concentraciones antimicrobianas perteneciente al rango de la CIM, llevamos a cabo un subcultivo en placas con medio ABG y una tinción de fluorescencia celular LIVE/DEAD *BacLight*TM luego de 40 minutos de incubación de células de *B. pertussis* con antibióticos (concentraciones: CIM). Los resultados mostraron que las células adheridas incubadas en dicha condición durante ese corto período de tiempo no estaban muertas en su totalidad, lo que justificaría este elevado nivel oscilatorio derivado posiblemente de un mecanismo de respuesta a la acción del antibiótico (Figura 19). Postulamos que las bacterias permanecen viables debido a que el mecanismo de acción de este tipo de antibiótico inhibe su reproducción pero no genera la muerte inmediata (Kano S & Rubin, 2010).

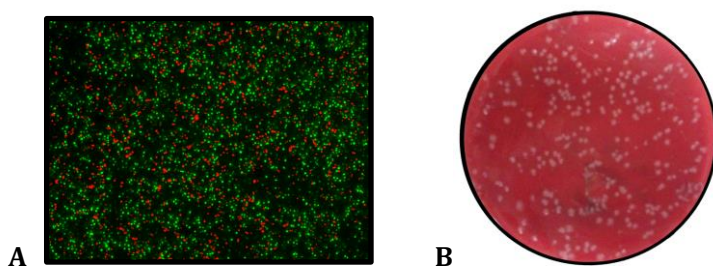


Figura 19. (A) *B. pertussis* Tohama I adherida con solución acuosa de glutaraldehído 0,5% a la superficie e incubados por 40 minutos con MIC de macrólidos (en el caso de las imágenes: eritromicina), teñido con el kit comercial Live/Dead (verde: viable; rojo: muertas); y (B) sembradas en placa ABG luego de la incubación con eritromicina. Las bacterias permanecen vivas luego de ese corto periodo de incubación.

IV.4.2 Sección B: Evaluación de células de *B. pertussis* en fases virulenta, avirulenta y en ambientes moduladores mediante Espectroscopía de nanomovimiento.

B. pertussis durante su ciclo de vida tiene la capacidad de modificar su fenotipo virulento dependiendo de las condiciones fisicoquímicas del ambiente entre fases de virulencia y avirulencia. En cada una de las dos fases de virulencia se expresan diferentes sets o conjunto de genes, incluso se han detectado cambios metabólicos relacionados con la colonización y persistencia según el estado adquirido (Hot *et al.*, 2003; Karataev, *et al.*, 2016; van Beek, *et al.*, 2018). Debido a esto se decidió explorar mediante el nanosensor cada condición de virulencia siguiendo los procedimientos de análisis de datos utilizado en la

sección anterior. Sin embargo, el análisis de varianzas no presenta diferencias significativas entre bacterias virulentas o avirulentas (Figura 20).

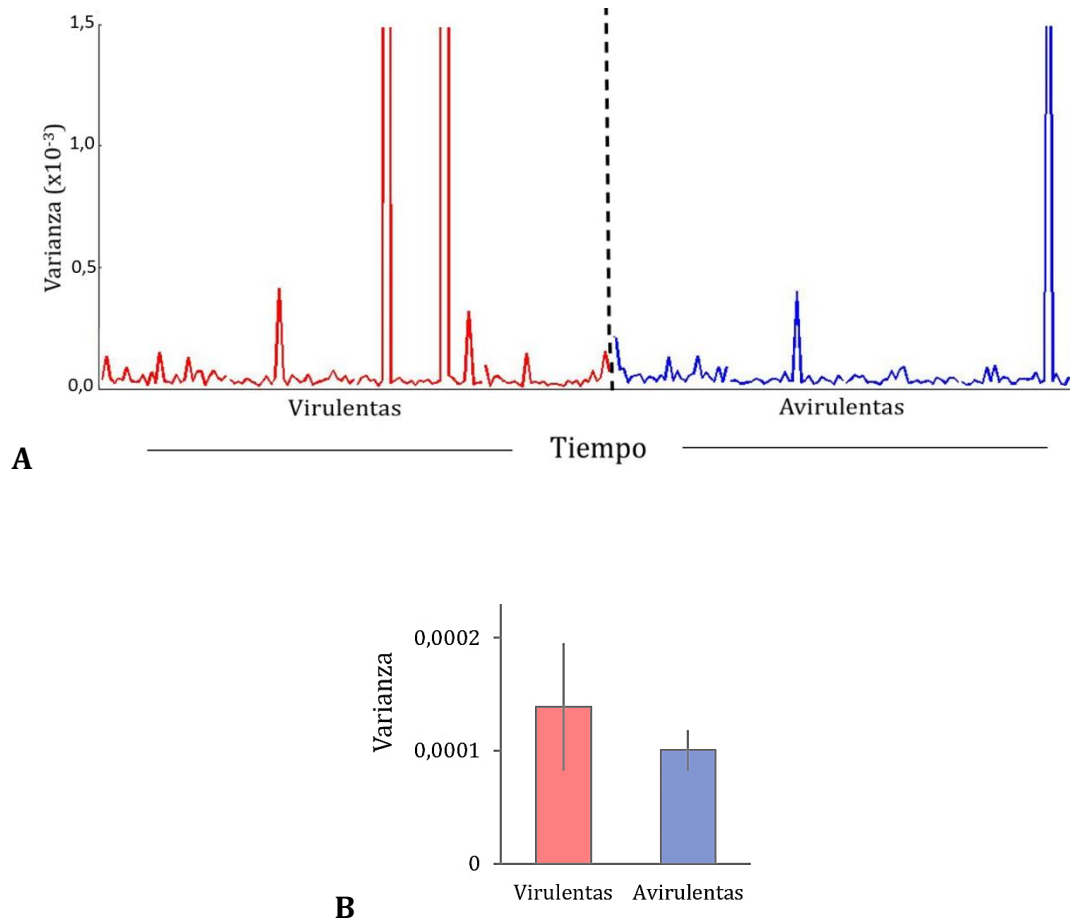


Figura 20. (A) Representación de varianza a lo largo del tiempo en bacterias virulentas y avirulentas. (B) Varianza promedio para cada fase de virulencia obtenida a partir de 15 periodos de 5 minutos provenientes de 3 ensayos diferentes para cada caso. La barra de error representa el error estándar, los resultados no presentan diferencias significativas (t Student $p > 0,1$).

Para llevar a cabo un estudio más detallado de *B. pertussis* expresando cada fenotipo (virulento o avirulento), se planteó un nuevo modo de análisis de los datos correspondientes a los desplazamientos del cantilever. Los movimientos del sensor fueron representados utilizando los gráficos violines. Estos gráficos o espectrogramas de nanomovimiento, permiten reflejar de una manera sencilla la intensidad de cada movimiento y el número de repeticiones del mismo. La explicación detallada fue dada previamente en la sección IV.3.3.c. La Figura 21 A y B representa espectrogramas de

nanomovimientos típicos, registrados con el nanosensor, de células de *B. pertussis* en fase virulenta y avirulenta respectivamente.

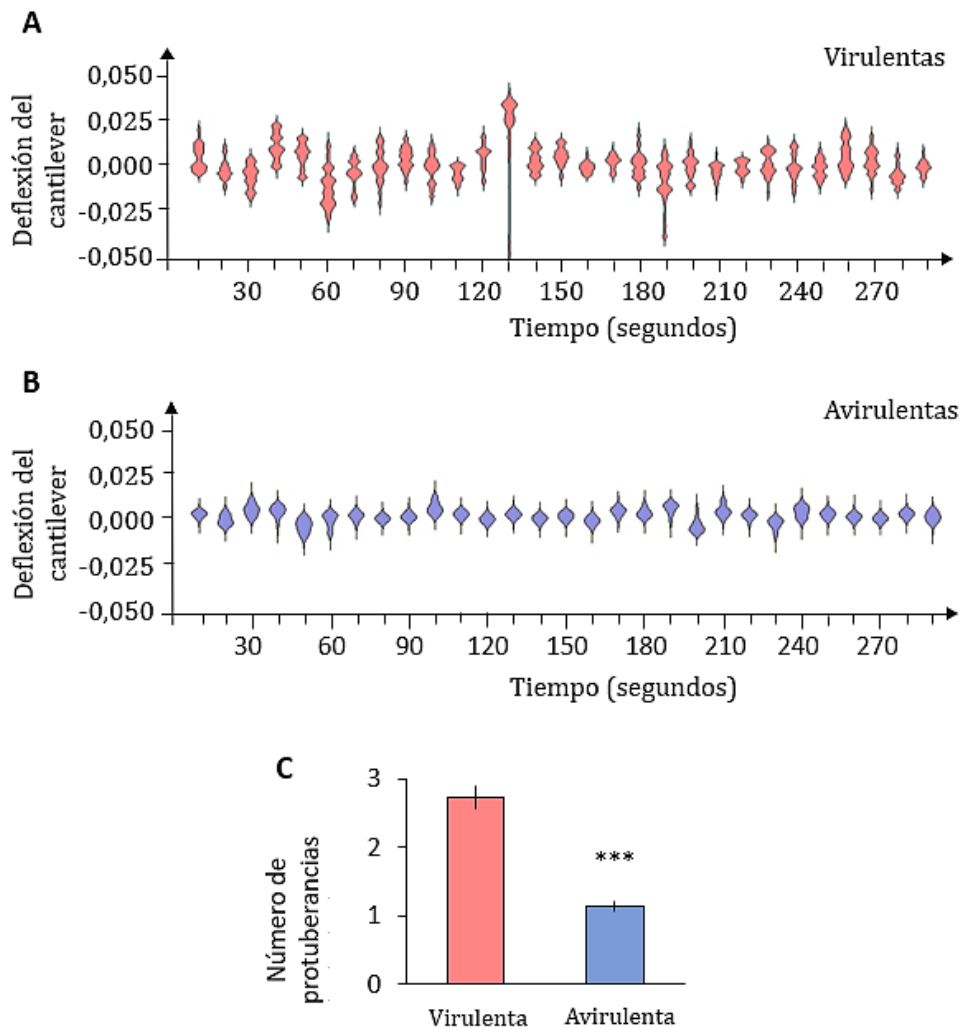


Figura 21. Espectrogramas de nanomovimientos de bacterias virulentas (A) y avirulentas (B) de *B. pertussis*. Cada espectrograma muestra el número de ocurrencias de desplazamiento del cantilever durante un lapso de tiempo de 10 segundos. (C) Número promedio de protuberancias contadas en espectrogramas consecutivos de 10 segundos durante 5 minutos en células virulentas y avirulentas de *B. pertussis* Tohama I (tres repeticiones para cada condición). En los espectrogramas registrados en bacterias virulentas, el número de protuberancias promedio por cada violín de 10 segundos es 2,8 ($\pm 0,2$), mientras que en bacterias avirulentas se reduce a 1,2 ($\pm 0,1$). Las barras de error representan el error estándar, *** $p < 0,01$ (test de Wilcoxon).

Los violines de *B. pertussis* avirulentos parecen mucho más simples que los de las variantes virulentas. Estos últimos poseen varias protuberancias y se conocen como multimodales, a diferencia de los primeros que en su mayoría solo poseen una protuberancia y son monomodales. Es importante destacar que la presencia de

espectrogramas multimodales indica que el movimiento del cantilever no es aleatorio, sino que ocurren algunos desplazamientos bien definidos con mayor frecuencia que otros.

Para clasificar los espectrogramas de nanovimientos de acuerdo con su complejidad, contamos la cantidad de protuberancias presentes en cada violín resultante de datos adquiridos durante 10 segundos. Como se muestra en la Figura 21C, el número promedio de protuberancias registrado en cada violín de 10 segundo, es significativamente mayor en los espectrogramas obtenidos a partir de *B. pertussis* virulenta que de los de sus homólogos avirulentos. Esta metodología nos permite reflejar millones de datos en gráficos de simple comprensión y sin abarcar demasiado espacio, donde se puede reflejar claramente la distribución de cada set de datos. Por ejemplo, cada espectrograma de 5 minutos a partir de segmentos consecutivos de 10 segundos cada uno, como se grafica en esta sección, representan 6 millones de datos (es decir, 30 violines de 10 segundos a 20kHz, $10 \times 20000 \times 30 = 6$ millones de datos).

Teniendo en cuenta que los movimientos del cantilever se registran en una cámara mantenida a temperatura ambiente, lo que podría inducir la expresión de un fenotipo avirulento, primero decidimos monitorear si el registro de la fase virulenta se modificó en esas condiciones experimentales a lo largo de las 3 h de medición. De este modo, pudimos detectar que esta temperatura no modifica los patrones de movimiento de los nanosensores del fenotipo virulento (Figura 22). El resultado concuerda con los reportados previamente por Seydlova *et al.*, (2017), quienes mostraron que *B. pertussis* Tohama I mantuvo la producción de factores de virulencia a temperaturas subóptimas (24°C).

Luego analizamos una mutante avirulenta a lo largo de 3 horas, para confirmar el patrón de nanomovimiento registrado en bacterias avirulentas (Figura 23). Los gráficos multimodales y monomodales de las bacterias virulentas y avirulentas, respectivamente, se mantienen a lo largo del tiempo en los ensayos donde se conserva el estado de virulencia en cada caso.

A continuación, se estudió el proceso de transición de fase de virulencia en *B. pertussis* registrado en ambientes donde se induce el cambio de fase: desde virulenta a una fase avirulenta (Figura 24) y a partir de avirulenta a una fase virulenta (Figura 25). En el

primer caso mediante el agregado de $MgSO_4$ al medio de líquido de cultivo SS a una concentración final de 50 mM, y en el segundo mediante la incubación en medio sin agente modulante con bacterias procedentes de cultivos con una concentración 50 mM de $MgSO_4$, es decir inicialmente avirulentas.

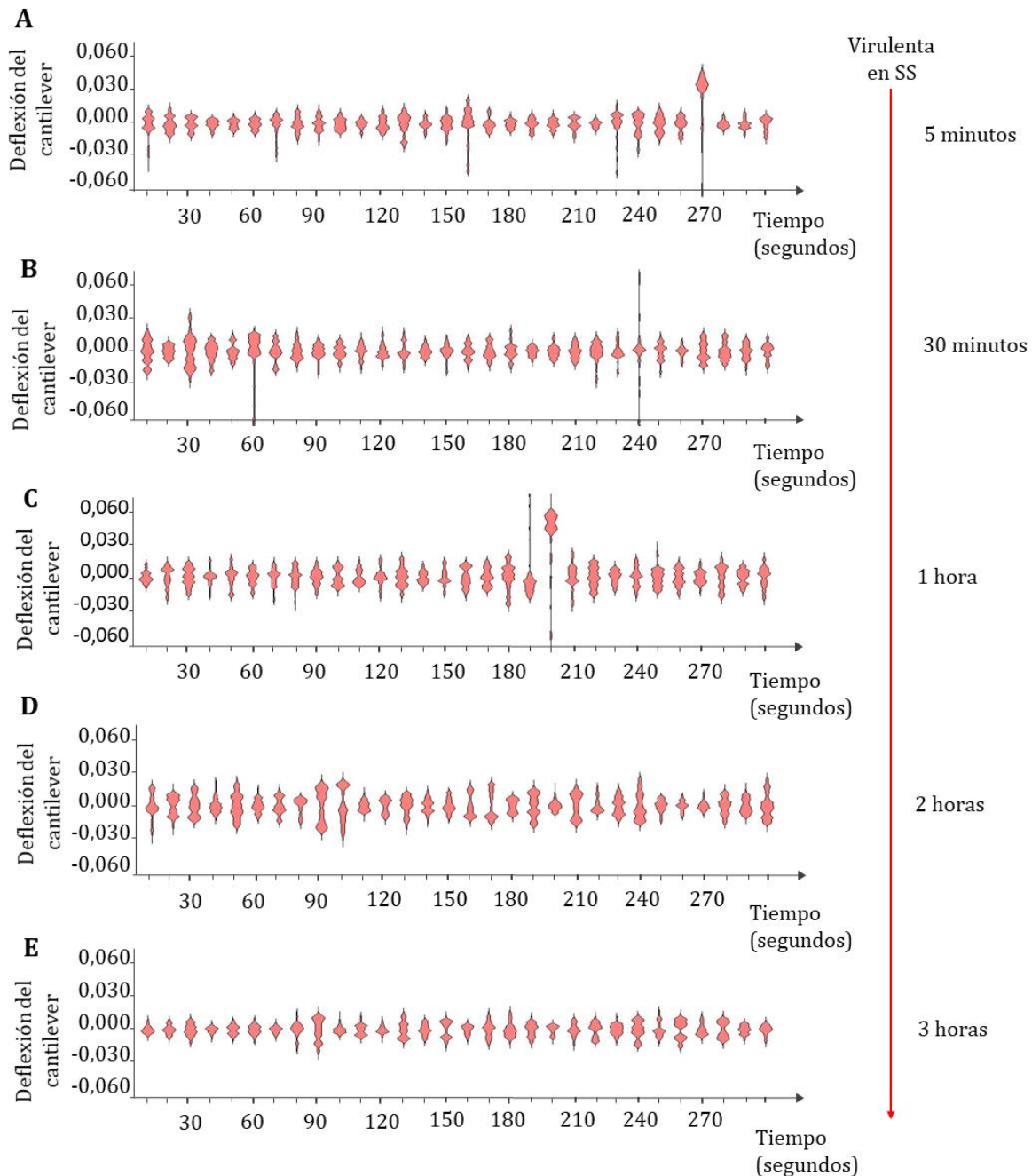


Figura 22. Gráficos de espectroscopias de nanomovimiento de la cepa de *B. pertussis* Tohama I en medio SS a lo largo del tiempo: a los 5 minutos de iniciado el registro de datos (A), luego de 30 minutos (B), y después de una (C), dos (D) y tres horas (E). El estado de virulencia no varía. Cada violin muestra el número de ocurrencias de desplazamiento del cantilever durante un lapso de tiempo de 10 segundos.

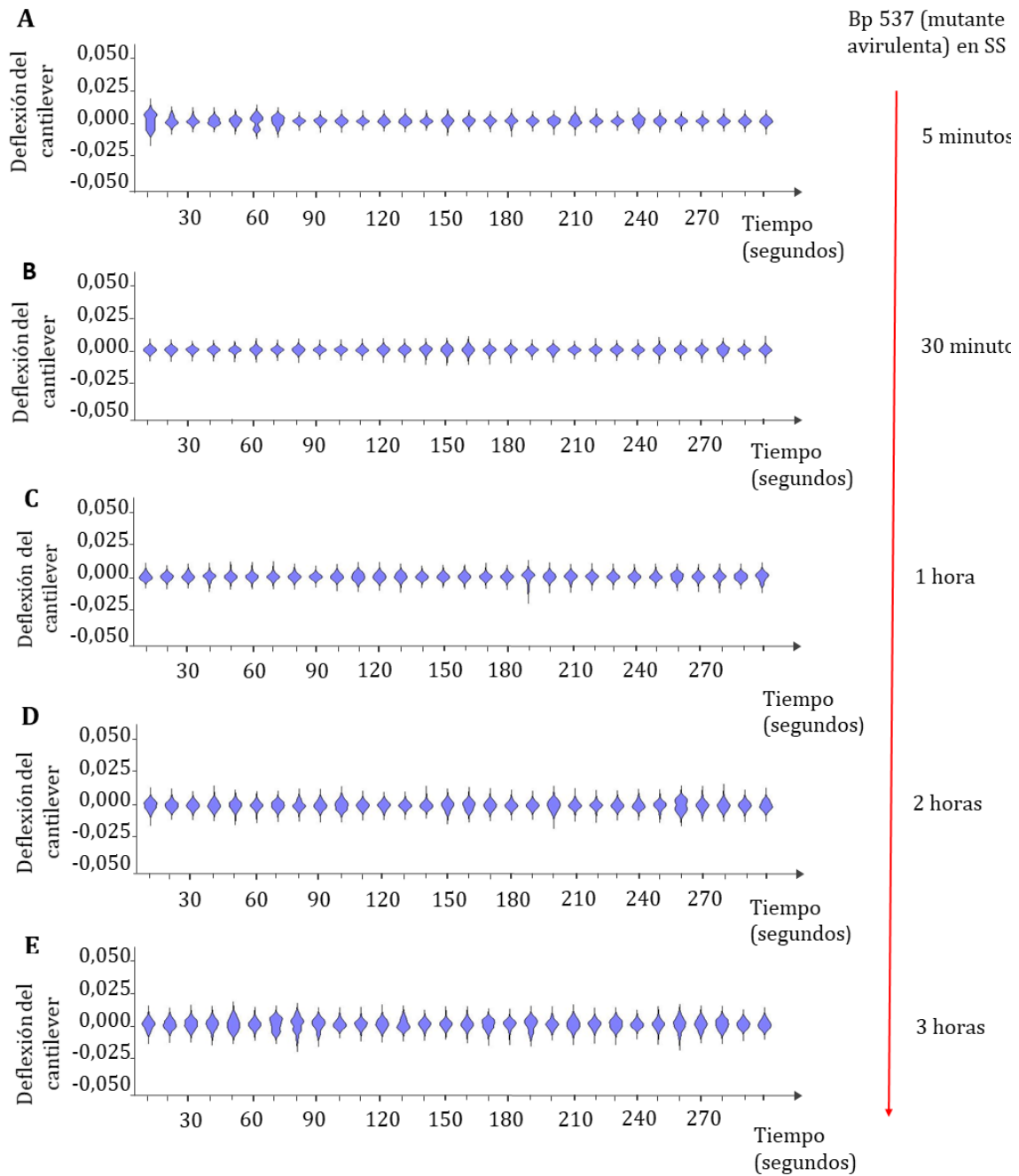


Figura 23. Gráficos de espectroscopias de nanomovimiento de la cepa de *B. pertussis* 537, mutante avirulenta, en medio SS a lo largo del tiempo: 5 minutos de iniciado el registro de datos (A), luego de 30 minutos (B), y después de una (C), dos (D) y tres horas (E). El estado de virulencia no varía. Cada violin muestra el número de ocurrencias de desplazamiento del cantilever durante un lapso de tiempo de 10 segundos.

Los espectrogramas de nanomovimientos registrados en estos experimentos de "transición" confirmaron nuestros resultados anteriores y revelaron el patrón de

movimiento multimodal de *B. pertussis* si expresa un fenotipo virulento y el patrón monomodal de las bacterias en fase avirulenta.

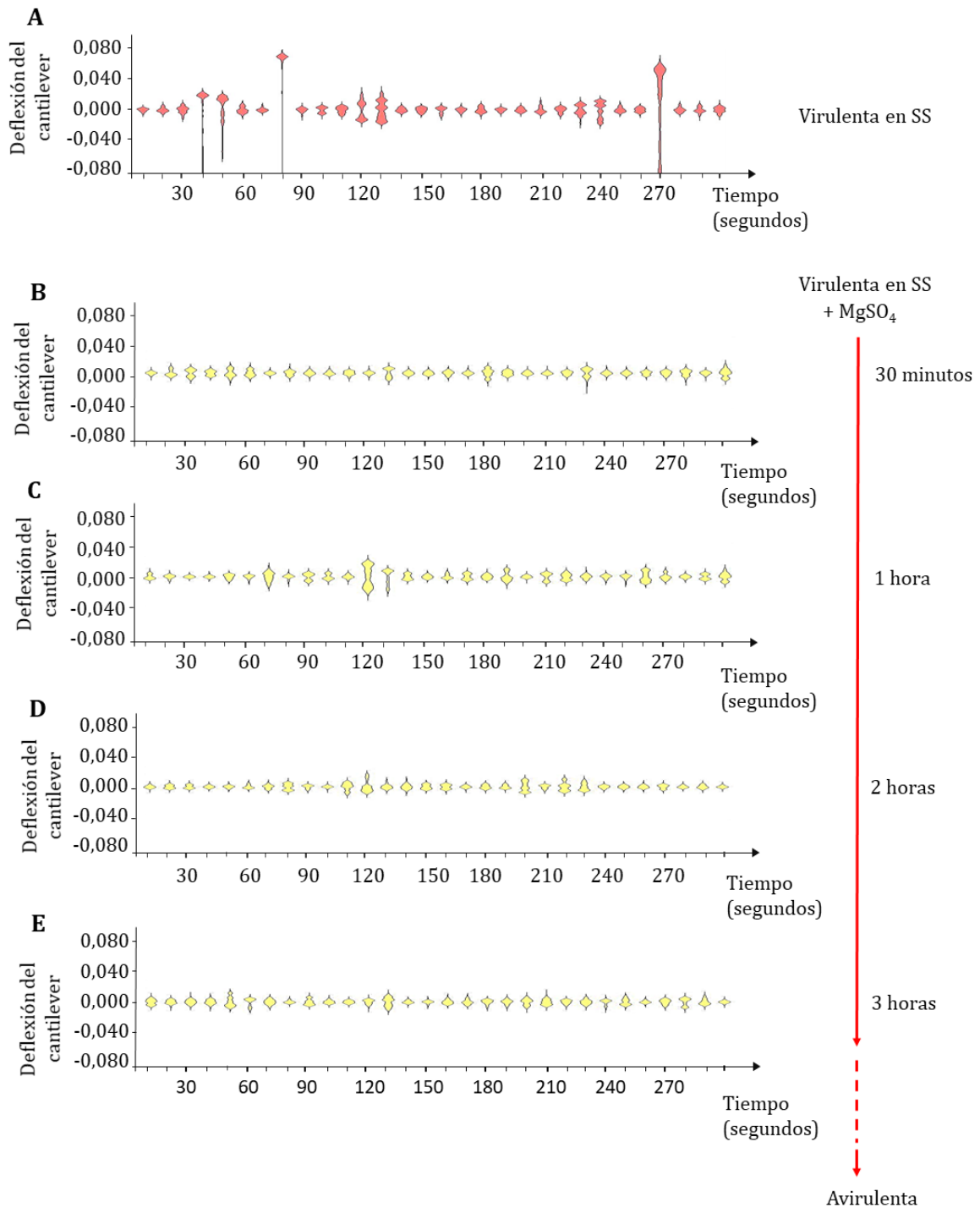


Figura 24. Gráficos de espectroscopias de nanomovimiento de la cepa de *B. pertussis* Tohama I proveniente de un cultivo en condiciones virulentas (sin presencia de $MgSO_4$) (A), y durante la transición mediante la incubación en medio SS con el agente de modulación (50 mM de $MgSO_4$) a lo largo del tiempo: 30 minutos de iniciado el registro de datos (B), y después de una (C), dos (D) y tres horas (E) de incubación. Cada violín muestra el número de ocurrencias de desplazamiento del cantilever durante un lapso de tiempo de 10 segundos.

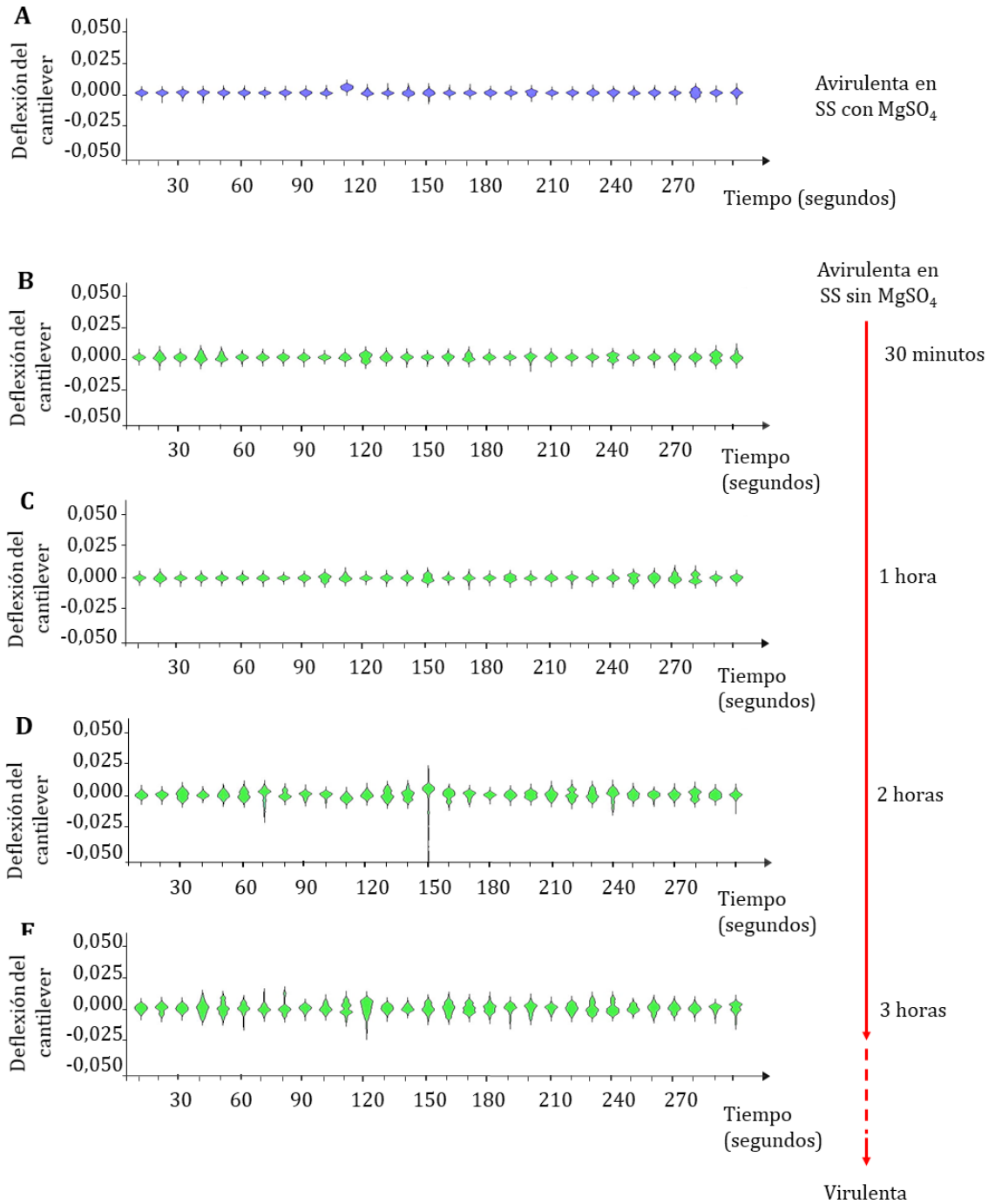


Figura 25. Gráficos de espectroscopias de nanomovimiento de la cepa de *B. pertussis* Tohama I proveniente de un cultivo en condiciones avirulentas (50 mM de MgSO₄) (A), y durante la transición mediante la incubación en medio SS sin el agente de modulación a lo largo del tiempo: 30 minutos de iniciado el registro de datos (B), y después de una (C), dos (D) y tres horas (E). Cada violin muestra el número de ocurrencias de desplazamiento del cantilever durante un lapso de tiempo de 10 segundos

Además, mostraron que a los pocos minutos de la incubación en medios que comienza a inducir una transición del estado de virulencia a avirulencia, ya se registran cambios

(Figura 24). En sentido contrario, comienzan a detectarse los gráficos multimodales a las horas de incubación en medio sin agente modulante (Figura 25).

Finalmente, se analizó el número de protuberancias adoptadas por cada violín de 10 segundos para los distintos períodos de tiempo analizado (inicio, 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 3 horas) (Figura 26).

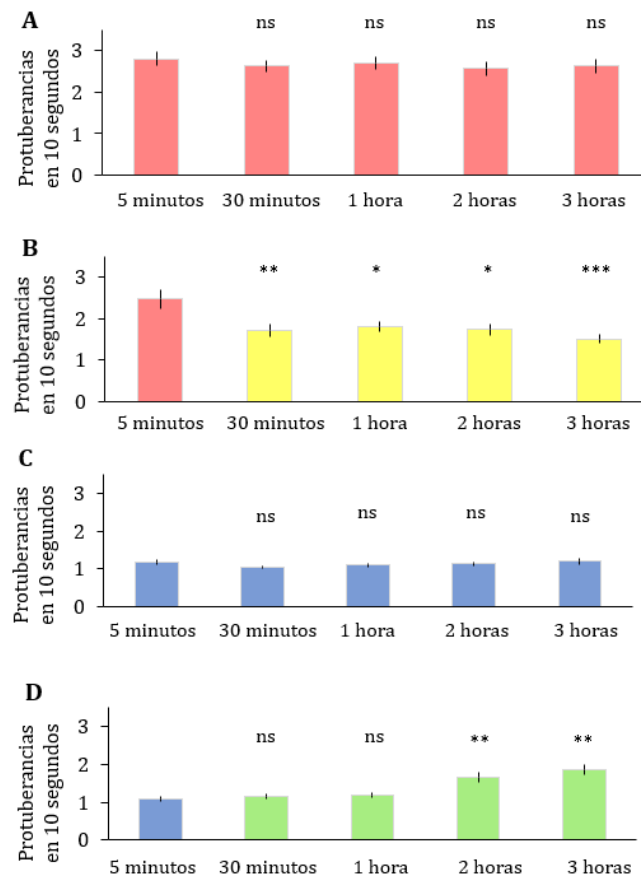


Figura 26. Número de protuberancias medio en cada gráfico de 10 segundos registrados durante 5 minutos a lo largo de períodos de tiempo del experimento, en condiciones de conservación de un estado virulento (A), de transición hacia el estado avirulento (B), de conservación del estado avirulento (C) y de transición hacia el estado virulento (D). Las barras de error representan el error estándar, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns: diferencias no significativas (test de Wilcoxon).

Cuando la bacteria conserva su estado, no se registran cambios significativos (Figura 26A y 26C). Sin embargo, cuando la bacteria virulenta es expuesta a 50mM de $MgSO_4$, a los 30 minutos ya presenta diferencias significativas en el número de protuberancias (Figura 26B). En sentido contrario, desde un estado inicial avirulento hacia la adquisición

de un estado virulento, las diferencias significativas surgen más tarde, a las 2 horas (Figura 26D). Es interesante señalar cómo durante la modulación de la fase avirulenta a virulenta, el número de protuberancias aumenta en cerca de un 100% después de 3 h de incubación, lo que reflejaría el aumento progresivo de la síntesis de factores de virulencia. En resumen, los cambios en las formas de los espectrogramas y el número de protuberancias ocurren más rápidamente durante la transición de fase virulenta a avirulenta que en la fase avirulenta a virulenta.

IV.5 DISCUSIÓN

Los antibióticos macrólidos utilizados en este trabajo interfieren en la síntesis proteica en el interior celular y requieren tiempo para lograr la detención de la reproducción bacteriana; los mismos presentaron una relación CBM/CIM > 4, demostrando dicha actividad bacteriostática para las concentraciones utilizadas en los experimentos de *B. pertussis* durante el desarrollo de la tesis (Pankey & Sabath, 2004). Contrastando con la técnica convencional de determinación de valores de CIM y de CBM, la ventaja del análisis con este equipo se basa en la rapidez para lograr la obtención de resultados, lo que es de suma importancia en la clínica médica. Dada la alta sensibilidad para detectar actividad metabólica podemos observar la acción de antibióticos sobre *B. pertussis* al exponer a la población al antimicrobiano. De este modo, **el empleo del nanosensor nos permitió monitorear la respuesta a antibióticos de *B. pertussis* optimizando el tiempo de análisis requerido por bacterias de crecimiento lento expuestas a antibióticos de mecanismo de acción no inmediata.** Esto constituye un avance muy importante ya que hasta el momento era necesario esperar al menos 20 h para observar una respuesta mediante el empleo de cultivos en medio líquido o en medio sólido en placas. Además, nuestros resultados muestran que, a concentraciones de antibióticos similares a la CIM, se detecta un pico de máxima actividad metabólica. Esto podría entenderse como una respuesta a una condición extrema de estrés la cual se podría interpretar como un intento de las bacterias a potenciar su metabolismo para poder sobrevivir.

Actualmente, se encuentran disponibles varios métodos de laboratorio para caracterizar la susceptibilidad a antibióticos de los microorganismos *in vitro*. Entre ellos se incluyen métodos de difusión en disco, pruebas de difusión de gradiente antimicrobiano y técnicas de dilución de caldo como las recomendadas por el *Clinical and*

Laboratory Standards Institute (CLSI) o por el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (Wayne, 2012; *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, 2017). Sin embargo, los resultados obtenidos por estas técnicas requieren mucho tiempo, al menos 24 h o hasta un mes en caso de *Micobacterium tuberculosis*. Durante las últimas décadas, los dispositivos automáticos y semiautomatizados, como Becton Dickinson Phoenix, Siemens MicroScan Walk Away o Vitek 2, se han utilizado ampliamente a nivel hospitalario (Snyder *et al.*, 2008; Mittman *et al.*, 2009; Chatzigeorgiou *et al.*, 2011). No obstante, estos equipos tienen un alto costo, se usan principalmente para la determinación de resistencia a antimicrobianos con organismos de crecimiento rápido y, además, no están disponibles para todo el espectro de bacterias. Si bien la actividad metabólica celular puede estudiarse por el test del TTC, como mostramos previamente en la sección **IV.4.1.e**, éste no resultó en nuestro caso lo suficientemente sensible para determinar la CIM y CBM. Aunque es posible diferenciar entre bacterias vivas y muertas, no permite registrar diferencias significativas a lo largo de un rango amplio de concentraciones de antibióticos.

Al presente, los métodos para evaluar el estado de virulencia incluyen análisis fenotípicos los cuales emplean bacterias crecidas en medios sólidos, *real time PCR* (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real), microarray o RNA-seq. Sin embargo, estos métodos requieren de manipulación específica y tiempo considerable (de Gouw *et al.*, 2014; Lesne *et al.*, 2018). Por el contrario, el análisis mediante espectrogramas de nanomovimientos toma unas pocas horas y ha demostrado que *B. pertussis* en fase virulenta genera un patrón diferente que su contraparte avirulenta. El espectrograma simple y monomodal registrado en cepas avirulentas probablemente está poniendo de relieve una expresión génica y actividad metabólica diferente en las dos fases de virulencia estudiadas. Se ha mencionado previamente que la adopción de un estado avirulento tiene cambios metabólicos significativos y esta fase está relacionada con la persistencia bacteriana (Karataev *et al.*, 2016; Moon *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos nos indican que el cambio de virulenta hacia la fase avirulenta aparenta ser más rápido que en sentido contrario, la reprogramación rápida del metabolismo y la expresión genética hacia la adquisición de la fase avirulenta podría ayudar a tener una respuesta rápida al estrés ambiental y nutricional y ser una ventaja para la persistencia en el hospedador (Karataev *et al.*, 2016; Lesne *et al.*, 2018; Gonyar *et al.*, 2019). Durante la transición hacia la fase

avirulenta, *B. pertussis* pierde la capacidad de sintetizar factores de virulencia asociados con la patogenicidad. La inhibición de la síntesis de factores de virulencia, que comienza a los 10 minutos de incubación (Scarlato & Rappuoli, 1991), ocurre gradualmente como puede registrarse en nuestros resultados y fue reportado por Metz *et al.*, (2017), mediante análisis proteómico. En relación a la modulación de fase avirulenta a virulenta, se ha reportado la regulación temporal de los genes de virulencia (*vags: fha, fim, prn, cya*) tanto in vivo como in vitro (Veal-Carr & Stibitz, 2005). Es importante tener en cuenta que estos genes se han categorizado en tres clases temporales: genes tempranos, intermedios y tardíos, dependiendo del momento de expresión a partir de la activación del sistema regulador BvgAS. Los genes tempranos (o de clase II) incluyen aquellos que codifican FHA y Fim que se activan rápidamente (10 min) en respuesta a condiciones de no modulación, pero los genes tardíos (o de clase I) incluyen aquellos que codifican Cya y PT, se activan 2-4 h después de la activación del locus BvgAS. Los genes que codifican Prn pertenecen a la clase de genes intermedios que se expresan aproximadamente 1 h después de la activación del locus BvgAS (Dorji *et al.*, 2018). Como se muestra en la Figura 25 en nuestras condiciones experimentales, las diferencias significativas en el proceso de transición de fase avirulenta a virulenta se detectan después de 2 h de incubación de bacterias avirulentas en condiciones no moduladoras. Este resultado concuerda con lo informado por Veal-Carr y Stibitz, (2005), sobre la cinética de expresión de factores de virulencia de *B. pertussis in vitro* y podría reflejar un cambio en la actividad metabólica asociado al inicio de la expresión de los genes *vags* mencionados anteriormente.

En conclusión, en este trabajo se demostró que el uso del nanosensor de movimientos permite detectar la respuesta de *B. pertussis* a diversos estímulos externos como antibióticos o agentes moduladores de virulencia, en pocos minutos. Además, da lugar a un futuro método de determinación de sensibilidad a antibióticos rápido para diseñar el tratamiento correcto, reducir el uso preventivo de antibióticos y en consecuencia contribuir a disminuir el desarrollo de resistencia. Este equipo fue utilizado previamente con bacterias de metabolismo rápido, linfocitos y mitocondrias (Kohler *et al.*, 2019), pero no había sido adaptado ni utilizado en bacterias de crecimiento lento. Por otro lado, la espectroscopía de nanomovimiento resultó ser útil para discriminar la virulencia de cepas de *B. pertussis* sin la necesidad de análisis por técnicas moleculares o microscópicas complejas. Nuestros resultados reflejan directamente por primera vez las variaciones en

la actividad metabólica asociadas con la síntesis o represión de factores de virulencia y el cambio en tiempo real del estado de virulencia de *B. pertussis*. Los espectrogramas de nanomovimiento podrían ser un parámetro nuevo y pertinente, que sin duda merecen estudios adicionales y más profundos.

IV.6 BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Sarduy L, De Los Rios P, Benedetti F, Vobornik D, Dietler G, Kasas S, Longo G. Real-time monitoring of protein conformational changes using a nano-mechanical sensor. *PLoS One*. 2014, 9(7):e103674. doi: 10.1371/journal.pone.0103674.
- Altunaiji S, Kukuruzovic R, Curtis N, Massie J. Antibiotics for whooping cough (pertussis). *Cochrane Database Syst Rev*. 2007, 18(3):CD004404. doi: 10.1002/14651858.CD004404.pub3.
- Arnal L, Grunert T, Cattelan N, de Gouw D, Villalba MI, Serra DO, Mooi FR, Ehling-Schulz M, Yantorno OM. *Bordetella pertussis* isolates from argentinean whooping cough patients display enhanced biofilm formation capacity compared to Tohama I reference strain. *Front Microbiol*. 2015, 6:1352. doi: 10.3389/fmicb.2015.01352.
- Bartkus JM, Juni BA, Ehresmann K, Miller CA, Sanden GN, Cassidy PK, Saubolle M, Lee B, Long J, Harrison AR, Jr, Besser JM. Identification of a mutation associated with erythromycin resistance in *Bordetella pertussis*: implications for surveillance of antimicrobial resistance. *J Clin Microbiol*. 2003, 41:1167-1172.
- Chatzigeorgiou KS, Sergentanis TN, Tsiodras S, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Phoenix 100 versus Vitek 2 in the identification of gram-positive and gram-negative bacteria: a comprehensive meta-analysis. *J Clin Microbiol*. 2011, 49(9):3284-91. doi: 10.1128/JCM.00182-11.
- de Gouw D, Hermans PW, Bootsma HJ, Zomer A, Heuvelman K, Diavatopoulos DA, Mooi FR. Differentially expressed genes in *Bordetella pertussis* strains belonging to a lineage which recently spread globally. *PLoS One*. 2014, 9(1):e84523. doi: 10.1371/journal.pone.0084523. Erratum in: *PLoS One*. 2014, 9(1). doi: 10.1371/annotation/1b2cfe52-aaea-4148-aa72-a74c78550192.
- Dorji D, Mooi F, Yantorno O, Deora R, Graham RM, Mukkur TK. *Bordetella pertussis* virulence factors in the continuing evolution of whooping cough vaccines for improved performance. *Med Microbiol Immunol*. 2018, 207(1):3-26. doi: 10.1007/s00430-017-0524-z.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2017. Disponible en: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Version_5/Manual_v_6.0_EUCAST_Disk_Test_final.pdf.
- Gonyar LA, Gelbach PE, McDuffie DG, Koepfel AF, Chen Q, Lee G, Temple LM, Stibitz S, Hewlett EL, Papin JA, Damron FH, Eby JC. In Vivo Gene Essentiality and Metabolism in *Bordetella pertussis*. *mSphere*. 2019, 4(3):e00694-18. doi: 10.1128/mSphere.00694-18.
- Hot D, Antoine R, Renaud-Mongénie G, Caro V, Hennuy B, Levillain E, Huot L, Wittmann G, Poncet D, Jacob-Dubuisson F, Guyard C, Rimlinger F, Aujame L, Godfroid E, Guiso N, Quentin-Millet MJ, Lemoine Y, Loch C. Differential modulation of *Bordetella pertussis* virulence genes as evidenced by DNA microarray analysis. *Mol Genet Genomics*. 2003, 269(4):475-86. doi: 10.1007/s00438-003-0851-1.
- Kanoh S, Rubin BK. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clin Microbiol Rev*. 2010, 23(3):590-615. doi: 10.1128/CMR.00078-09.
- Karataev GI, Sinyashina LN, Medkova AY, Semin EG, Shevtsova ZV, Matua AZ, Kondzariya IG, Amichba AA, Kubrava DT, Mikvabia ZY. Insertional inactivation of virulence operon in population of persistent *Bordetella pertussis* bacteria. *Genetika*. 2016, 52(4):422-30.
- Kasas S, Ruggeri FS, Benadiba C, Maillard C, Stupar P, Tournu H, Dietler G, Longo G. Detecting nanoscale vibrations as signature of life. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015, 112(2):378-81. doi: 10.1073/pnas.1415348112.
- Kinnear SM, Marques RR, Carbonetti NH. Differential regulation of Bvg-activated virulence factors plays a role in *Bordetella pertussis* pathogenicity. *Infect Immun*. 2001, 69(4):1983-93. doi: 10.1128/IAI.69.4.1983-1993.2001.
- Kohler AC, Venturelli L, Longo G, Dietler G, Kasas S. Nanomotion detection based on atomic force microscopy cantilevers, *The Cell Surface*. 2019, (5) 100021, ISSN 2468-2330.

- Lesne E, Coutte L, Solans L, Slupek S, Debrie AS, Dhennin V, Froguel P, Hot D, Loch C, Antoine R, Jacob-Dubuisson F. Distinct virulence ranges for infection of mice by *Bordetella pertussis* revealed by engineering of the sensor-kinase BvgS. *PLoS One*. 2018, 13(10):e0204861. doi: 10.1371/journal.pone.0204861.
- Li B, Webster TJ. Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections. *J Orthop Res*. 2018, 36(1):22-32. doi: 10.1002/jor.23656.
- Lomazzi M, Moore M, Johnson A, Balasegaram M, Borisch B. Antimicrobial resistance moving forward?. *BMC Public Health*. 2019, 19(1):858. doi:10.1186/s12889-019-7173-7.
- Longo G, Alonso-Sarduy L, Rio LM, Bizzini A, Trampuz A, Notz J, Dietler G, Kasas S. Rapid detection of bacterial resistance to antibiotics using AFM cantilevers as nanomechanical sensors. *Nat Nanotechnol*. 2013, 8(7):522-6. doi: 10.1038/nnano.2013.120.
- Metz B, Hoonakker M, Uittenbogaard JP, Weyts M, Mommen GP, Meiring HD, Tilstra W, Pennings JL, van der Pol LA, Kuipers B, Sloots A, van den IJssel J, van de Waterbeemd B, van der Ark A. Proteome analysis is a valuable tool to monitor antigen expression during upstream processing of whole-cell pertussis vaccines. *J Proteome Res*. 2017, 16(2):528-537. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00668.
- Michael CA, Dominey-Howes D, Labbate M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Front Public Health*. 2014, 2:145.
- Mittman SA, Huard RC, Della-Latta P, Whittier S. Comparison of BD phoenix to vitek 2, microscan MICroSTREP, and Etest for antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2009, 47(11):3557-61. doi: 10.1128/JCM.01137-09.
- Moon K, Bonocora RP, Kim DD, Chen Q, Wade JT, Stibitz S, Hinton DM. The BvgAS Regulon of *Bordetella pertussis*. *mBio*. 2017, 8(5):e01526-17. doi: 10.1128/mBio.01526-17.
- Moriana JC, Cárdenas MJ, Racero I. Sulfamidas. Cotrimoxazol. Quinolonas. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2002, 8: 3887-3896.
- Moussa S, Tayel A, Al-Hassan A, Farouk A. Tetrazolium/formazan test as an efficient method to determine fungal chitosan antimicrobial activity. *J Mycol*. 2013, Article ID 753692, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/753692>.
- Ohtsuka M, Kikuchi K, Shimizu K, Takahashi N, Ono Y, Sasaki T, Hiramatsu K. Emergence of quinolone-resistant *Bordetella pertussis* in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009, 53(7):3147-9. doi: 10.1128/AAC.00023-09.
- O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance. 2016. Disponible en: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
- Pankey GA, Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2004, 38(6):864-70.
- Ruggeri FS, Mahul-Mellier AL, Kasas S, Lashuel HA, Longo G, Dietler G. Amyloid single-cell cytotoxicity assays by nanomotion detection. *Cell Death Discov*. 2017, 3:17053. doi: 10.1038/cddiscovery.2017.53. eCollection 2017.
- Scarlato V & Rappuoli R. Differential response of the bvg virulence regulon of *Bordetella pertussis* to MgSO₄ modulation. *J Bacteriol*. 1991, 173(22):7401-7404.
- Serra DO, Conover MS, Arnal L, Sloan GP, Rodriguez ME, Yantorno OM, Deora R. FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One*. 2011, 6(12):e28811. doi: 10.1371/journal.pone.0028811.
- Seydlova G, Beranova J, Bibova I, Dienstbier A, Drzmisek J, Masin J, Fiser R, Konopasek I, Vecerek B. The extent of the temperature-induced membrane remodeling in two closely related *Bordetella* species reflects their adaptation to diverse environmental niches. *J Biol Chem*. 2017, 292(19):8048-8058. doi: 10.1074/jbc.M117.781559.
- Snyder JW, Munier GK, Johnson CL. Direct comparison of the BD phoenix system with the MicroScan WalkAway system for identification and antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae and nonfermentative gram-negative organisms. *J Clin Microbiol*. 2008, 46(7):2327-33. doi: 10.1128/JCM.00075-08.
- Spellberg B, Srinivasan A, Chambers HF. New societal approaches to empowering antibiotic stewardship. *JAMA*. 2016, 315(12):1229-1230.
- Trainor EA, Nicholson TL, Merkel TJ. *Bordetella pertussis* transmission. *Pathog Dis*. 2015, 73(8):ftv068. doi: 10.1093/femspd/ftv068.
- van Beek LF, de Gouw D, Eleveld MJ, Bootsma HJ, de Jonge MI, Mooi FR, Zomer A, Diavatopoulos DA. Adaptation of *Bordetella pertussis* to the respiratory tract. *J Infect Dis*. 2018, 217(12):1987-1996. doi: 10.1093/infdis/jiy125.

- Veal-Carr WL & Stibitz S. Demonstration of differential virulence gene promoter activation in vivo in *Bordetella pertussis* using RIVET. *Molecular Microbiology*. 2005, 55(3), 788–798.
- Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*. 2015, 40(4):277-83.
- Venturelli L, Kohler AC, Stupar P, Villalba MI, Kalauzi A, Radotic K, Bertacchi M, Dinarelli S, Girasole M, Pešić M, Banković J, Vela ME, Yantorno O, Willaert R, Dietler G, Longo G, Kasas S. A perspective view on the nanomotion detection of living organisms and its features. *J Mol Recognit*. 2020, 30:e2849. doi: 10.1002/jmr.2849.
- Villalba MI, Stupar P, Chomicki W, Bertacchi M, Dietler G, Arnal L, Vela ME, Yantorno O, Kasas S. Nanomotion detection method for testing antibiotic resistance and susceptibility of slow-growing bacteria. *Small*. 2018, 14(4). doi: 10.1002/sml.201702671.
- Wang Z, Li Y, Hou T, Liu X, Liu Y, Yu T, Chen Z, Gao Y, Li H, He Q. Appearance of macrolide-resistant *Bordetella pertussis* strains in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013, 57(10):5193-4. doi: 10.1128/AAC.01081-13.
- Wayne P, Twenty Second Informational Supplement CLSI document M100-S22. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, 2012.
- Wu S, Zhang Z, Zhou X, Liu H, Xue C, Zhao G, Cao Y, Zhang Q, Wu X. Nanomechanical sensors for direct and rapid characterization of sperm motility based on nanoscale vibrations. *Nanoscale*. 2017, 9(46):18258-18267. doi:10.1039/c7nr03688d.

CAPÍTULO V

Análisis de la adhesión bacteriana y formación de biofilm de *B. pertussis* expuestos a fuerzas de corte

V.1 INTRODUCCIÓN

Si bien históricamente se consideró que los microorganismos vivían como células libres y de manera independiente en medios líquidos, (denominado crecimiento planctónico), desde hace más de 40 años se demostró que la mayoría de ellos vive formando parte de comunidades conocidas como biofilms. Típicamente el 5-35 % del volumen del biofilm está formado por microorganismos mientras que el volumen restante es la matriz extracelular formada por exopolímeros (EPS), cationes y otras biomoléculas. La matriz es producida principalmente por los propios organismos que forman el biofilm y su composición varía entre especies y condiciones de crecimiento; pero básicamente está compuesta por proteínas (>2%), polisacáridos (1-2%), moléculas de ADN extracelular (ADNe) (>1%), ARN (>1%), lipopolisacáridos, iones y finalmente 97% de agua (Sutherland, 2001; Sun *et al.*, 2005; Lu & Collins, 2007;). Los biofilms bacterianos y la expresión específica de genes por las células sésiles, les confieren a las mismas muchas ventajas en comparación a su modo de vida planctónica. Ha sido ampliamente demostrado que las bacterias en biofilms son más tolerantes a agentes antimicrobianos o moléculas del sistema inmune del hospedador (Hoyle & Costerton 1991; Donlan 2000; Mah y O'Toole 2001; Leid *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2005; Patel 2005; Percival *et al.*, 2011; Balcázar *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2017; Alav *et al.*, 2018), y que la diversidad genética y fenotípica otorga robustez a la comunidad bacteriana, siendo capaces de desarrollarse en zonas de flujo turbulento alto y de esta forma lograr colonizar nuevos ambientes. La formación de biofilms bacterianos es un proceso complejo basado en una serie de pasos los cuales incluyen en general 4 etapas básicas (Figura 1).

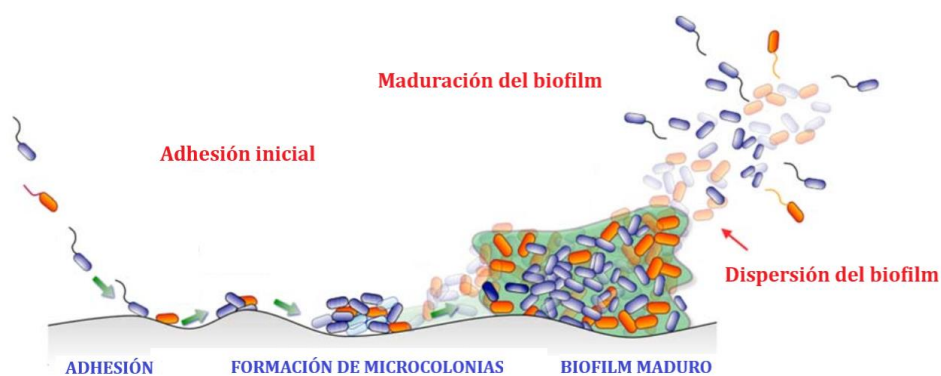


Figura 1. Proceso de formación de biofilms microbianos. (Imagen adaptada de Rendueles y Ghigo 2015).

1-Contacto inicial y adhesión a la superficie: el primer paso es la adhesión de las células microbianas a la superficie. Los microorganismos llegan al lugar de establecimiento del futuro biofilm de manera azarosa o por quimiotaxis dirigida donde comienzan a entrar en juego fuerzas atractivas y repulsivas entre las células y la superficie (Srivastava & Bhargava, 2016). Inicialmente la adhesión es dinámica y reversible, estas células preparan la superficie para la posterior unión irreversible de microorganismos, los cuales pueden resistir a las fuerzas de corte. La adhesión reversible estaría asociada al sustrato y el medio ambiente, mientras que en la adhesión irreversible intervienen los componentes propios de las células tales como adhesinas, pilis y/o flagelos.

2-Formación de microcolonias: luego de que se consolida la adhesión, a partir de las células unidas irreversiblemente, emergen las microcolonias por crecimiento clonal (Bjarnsholt *et al.*, 2013). De este modo, comienza la etapa de crecimiento, división y multiplicación celular gracias a un proceso de señalización química en el interior de la matriz de EPS, mediante señales tipo *quorum sensing*. Este incremento en el número de células da lugar a la formación de microcomunidades que intercambian sustancias y se comunican entre sí (Costerton *et al.*, 1995; Kostakioti *et al.*, 2013; Jamal *et al.*, 2018).

3-Maduración y arquitectura: en la etapa de maduración se generan huecos intersticiales en la matriz de EPS los que conforman el sistema de circulación de nutrientes, oxígeno, enzimas, metabolitos y desechos mediante canales de circulación de agua entre las microcolonias de los biofilms. **Un aspecto muy importante al que se le ha comenzado a prestar atención en los últimos años está referido a las condiciones hidrodinámicas en las que se desarrollan los biofilms.** Se ha reportado que las mismas tienen una gran influencia en la formación, estructura, espesor, biomasa y procesos metabólicos que ocurren dentro de las biopelículas. El establecimiento de biofilms está afectado por las fuerzas de cizallamiento a la que están expuestos como resultado del movimiento de fluidos alrededor de la estructura del mismo. Por ejemplo, respecto a la arquitectura de las comunidades bacterianas, los biofilms que crecen bajo altas velocidades de flujo son más esféricos y poseen más canales de agua, sin embargo, los que crecen en condiciones de baja turbulencia son alargados y filamentosos (Davey & O'Toole, 2000; Stoodley *et al.*, 2002; Kokare *et al.*, 2009).

4-Desprendimiento y dispersión de biofilms: mientras el biofilm madura, la liberación de masas celulares o células individuales que forman parte del mismo se convierte en una opción, causando una reducción de la biomasa. Estas células o agrupamientos celulares adquieren libertad, convirtiéndose en formas móviles capaces de propagarse y comenzar un nuevo ciclo de desarrollo de biofilm en otro lugar. Biológicamente, este proceso es la forma en que las bacterias regresan al modo de vida planctónico. Diversos mecanismos pasivos, relacionados con el cizallamiento y abrasión, pueden generar el desprendimiento o la erosión. El primero es el proceso mediante el que se elimina parte del biofilm como un “bulto” de la superficie y, por lo tanto, es la pérdida rápida de biomasa; por el contrario, la erosión es un proceso en el que una sola célula o una pequeña porción de biofilm se separan gradual y continuamente del exterior de la estructura. También se generan mecanismos activos de reducción de biomasa los cuales surgen de causas biológicas, (no relacionados con la fuerza de corte y roce), como la dispersión por siembra, es decir la liberación rápida de células individuales o una pequeña porción de células desde la región central de la biofilm, dejando cavidades huecas (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Sauer *et al.*, 2004; Boles *et al.*, 2005; Karatan & Watnick, 2009; Ma *et al.*, 2009; Schleheck *et al.*, 2009; Kostakioti *et al.*, 2013; Kim & Lee, 2016).

Como fue mencionado en la introducción general de la tesis, no solamente se ha reportado que *B. pertussis* puede colonizar y crecer dentro de células eucariotas, sino que también puede adoptar la forma de crecimiento en biofilm tanto *in vitro* como *in vivo* (Mishra *et al.*, 2005; Sloan *et al.*, 2007; Conover *et al.*, 2010, 2011; Serra *et al.*, 2011; Sugisaki *et al.*, 2013; Dorji *et al.*, 2018). Específicamente, esta especie bacteriana forma microcolonias de formas irregulares separadas por canales de líquidos embebidas en la matriz de EPS con ADNe (ácido desoxirribonucleico extracelular), proteínas y polisacáridos (Parise *et al.*, 2007; Sloan *et al.*, 2007; Serra *et al.*, 2008; Conover *et al.*, 2011; Nicholson *et al.*, 2012; Ganguly *et al.*, 2014; Cattelan *et al.*, 2016). En un trabajo previo del grupo hemos reportado que aislados clínicos de *B. pertussis* muestran mayor capacidad de formación de biofilms que las cepas de referencia, lo que apoya la consideración del biofilm como posible estrategia adaptativa para infectar y sobrevivir dentro del huésped (Cattelan *et al.*, 2017).

A pesar de que la comunidad científica ha reconocido que las perturbaciones mecánicas del ambiente en que se encuentran los microorganismos desempeñan un rol

significativo en la infección bacteriana (Persat *et al.*, 2015), la mayoría de los análisis sobre fisiología microbiana se llevan a cabo en medios líquidos en condiciones que no se aproximan al que encuentran las células en su hospedador. Naturalmente, el contacto inicial bacteria-huésped ocurre a nivel de la mucosa: boca, nariz, pulmón, intestino, ojo, etc., donde existe un flujo de aire o líquido a lo largo de la superficie epitelial. Este movimiento del fluido genera una fuerza mecánica denominada: tensión de corte/*shear stress*/fuerza de cizalla, definida como la fuerza tangencial por unidad de área ejercida por un fluido moviéndose cerca de una superficie estacionaria, expresado en dinas/cm². De este modo, **los procesos de transmisión, adhesión y formación de biofilms de *B. pertussis* son afectados por el *shear* hidromecánico**. Dicho flujo genera una fuerza mecánica sobre el patógeno que es un mecanismo de defensa natural contra la colonización bacteriana (Wang *et al.*, 1995; Dickinson *et al.*, 1997; Pratt & Kolter 1998; Shive *et al.*, 1999). Sin embargo, algunos estudios en otros organismos sugieren que la interacción bacteria-superficie y la colonización pueden ser favorecidos por estas fuerzas de corte (Li *et al.*, 2000; Mohamed *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2002; Nilsson *et al.*, 2006; Saur *et al.*, 2017). Incluso, se ha especulado que el flujo favorece la adhesión y formación de biofilm confiriéndole a estas estructuras mayor resistencia a la rotura o desprendimiento mecánico (Donlan & Costerton, 2002).

En vista de lo anteriormente indicado, nos planteamos que **es importante tratar de dilucidar en el caso de *B. pertussis* cómo influyen las fuerzas de *shear* hidromecánico en la etapa de adhesión de bacterias a una superficie y en la subsecuente formación de biofilm** (Figura 2). Comprender dicho efecto es un paso crítico en el avance del estudio de la colonización e infección. En este capítulo llevamos a cabo un análisis de la adhesión de la cepa de referencia Bp Tohama I y un aislado clínico Bp 2723 en fase virulenta y avirulenta a superficies de polipropileno bajo fuerzas de corte, empleando un valor de *shear stress* similar al reportado como fisiológico. A su vez estudiamos el desarrollo de *biofilms* y llevamos a cabo un estudio estructural de los mismos bajo la influencia de un valor de estrés hidrodinámico similar al valor promedio reportado para las vías respiratorias (Tarran *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2020).

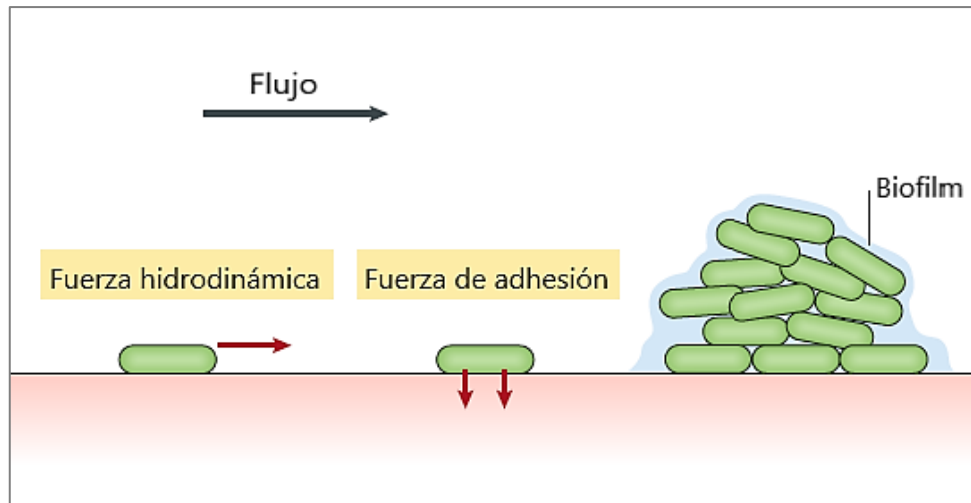


Figura 2. Esquema representativo de los mecanismos y fuerzas a analizar en el desarrollo de este capítulo: efecto del *shear* hidromecánico sobre la adhesión y formación del biofilm. Imagen adaptada de Dufrene & Persat, 2020.

V.2 Objetivos

*Estudiar comparativamente la respuesta al *shear stress* de la cepa de referencia vacunal *B. pertussis* Tohama I y el aislado clínico Bp 2723.

*Analizar los efectos del *shear stress* en la adhesión de *B. pertussis* a superficies en diversas condiciones iniciales de virulencia.

*Comparar el desarrollo de biofilms bacterianos bajo efectos de la fuerza de corte fisiológica de la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I y el aislado clínico Bp 2723.

V.3 MATERIALES Y MÉTODOS

V.3.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

Las cepas de *B. pertussis* empleadas durante el desarrollo de este capítulo fueron: Bp Tohama I, cepa de referencia (Colección Instituto Pasteur, Paris, Francia); Bp SM: cepa resistente a estreptomicina derivada de Bp Tohama I (Menozzi *et al.*, 1994); Bp 573: cepa bloqueada en fase avirulenta derivada de Bp Tohama I (Relman *et al.*, 1990); y el aislado clínico hospitalario Bp 2723 recuperado de un paciente con tos convulsa en el Hospital de Niños “Sor Maria Ludovica” de la ciudad de La Plata. Todas las cepas fueron cultivadas y mantenidas en placas ABG suplementadas con 15% (v/v) de sangre de carnero desfibrinada. Las placas inoculadas con las distintas cepas de *B. pertussis* se incubaron a 37°C durante 72 h cuando provienen de un stock conservado en frío (-80°C o -20° C) o durante 48 h en estufa a 37° C si provienen de un cultivo previamente crecido en placa.

Las cepas de *B. pertussis* fueron moduladas a la condición avirulenta (Bvg-) por pasajes sucesivos en medio sólido ABG, adicionado con 50 mM de MgSO₄ (concentración final). La presencia de organismos en fase Bvg- se verificó por ausencia del halo de hemólisis en las colonias producto de la ausencia de la expresión de la toxina Adenilato Ciclasa.

V.3.1.a Cultivos planctónicos

Para este tipo de cultivo, colonias procedentes de bacterias crecidas por 48 h en placas ABG fueron transferidas a frascos Erlenmeyers con medio líquido sintético Stainer-Scholte (SS). Generalmente para los cultivos se utilizaron 30 mL del medio en un frasco Erlenmeyer de 100 mL de capacidad, de esta manera se conserva la relación volumen de medio/volumen de frasco que en principio nos asegura un adecuado suministro de oxígeno en el cultivo. Los frascos inoculados fueron incubados durante toda la noche a 37°C en agitación (160 rpm). Los cultivos correspondientes a cada cepa fueron inoculados ajustando la densidad óptica a 650 nm (DO₆₅₀) a 0,2, y la misma concentración inicial se utiliza al realizar subcultivos provenientes de un cultivo líquido previo. MgSO₄ en una concentración final de 50 mM, fue adicionado en el medio líquido para conservar la condición avirulenta de las bacterias.

V.3.1.b Cultivos sésiles.

Se emplearon dos sistemas de cultivo diferentes dependiendo del análisis posterior a realizar de los biofilms. La implementación de cada sistema de cultivo se llevó a cabo siguiendo los procedimientos previamente descritos en la literatura y ajustando las condiciones necesarias para su puesta a punto. Los sistemas de cultivo que se utilizaron fueron: i) crecimiento sobre cubreobjetos de vidrio contenidos en cajas de Petri como sistema de cultivo (semi-batch) y ii) celdas con flujo continuo de nutrientes, las cuales se describen a continuación.

Para el desarrollo de cultivos en condiciones semi-batch, se crecieron: **i) biofilms en cajas de Petri con cubreobjetos** en su interior como superficie de adhesión. Previamente todo el sistema de cultivo fue esterilizado en autoclave. Se incubó inicialmente en contacto con la superficie una suspensión de células de DO₆₅₀:1 a 37°C manteniendo 4 h de adhesión sin agitación. Luego se llevó a cabo un recambio de medio por medio fresco y se mantuvo el cultivo en agitación a 160 rpm, reemplazando cada 24 h el medio de cultivo parcialmente agotado.

El método que consideramos como más adecuado para llevar a cabo el análisis de biofilm es: **ii) crecimiento en celdas operadas bajo flujo continuo de nutrientes**. Este sistema puede representar de una manera más cercana las condiciones del cultivo bacteriano *in vivo*. Para este tipo de ensayos, se utilizaron dos cámaras de cultivo de diseño diferente operadas cada una bajo flujo continuo de medio nutritivo líquido. En una primer etapa para los ensayos de adhesión, se llevó a cabo un crecimiento en cámaras “caseras”, constituídas por una recipiente de acrílico de 7,5 cm de largo, 2,5 cm de ancho y 0,5 cm de altura, con una perforación en la parte central de 4,5 cm de largo y 1,5 cm de ancho, cubierta en la superficie inferior y superior por cubreobjetos de vidrio, los cuales funcionaron como superficie de adhesión (dimensiones: 2,5 mm x 60 mm x 0,13 mm), y dos perforaciones laterales enfrentadas en cada extremo que se conectan con la central en los cuales se insertan tips o puntas que cumplen el rol de conectores, con mangueras de siliconas de 3x5 mm por donde se hace circular el medio de cultivo. En el extremo inicial del sistema se encuentran los frascos Erlenmeyer destinados al inóculo y al medio de cultivo. En el extremo final, un recipiente de tamaño suficiente es el encargado de recibir el medio de cultivo parcialmente agotado. A su vez, una de las mangueras es

conectada a una bomba peristáltica (Gilson, Miniplus Evolution), que permite la circulación del líquido con la velocidad deseada en cada caso. Entonces, a modo de resumen, el movimiento de fluido dentro del sistema se produce desde el frasco Erlenmeyer de inóculo y reservorio de medio de cultivo siguiendo por los tips conectores, la perforación central, las mangueras y finalmente los líquidos son colectados en un recipiente ubicado a la salida de desechos formando así un sistema totalmente cerrado y aislado. El sistema se arma fijando las superficies de la cámara, los tips conectores, así como las mangueras y cubreobjetos con silicona neutra (Multiflex, Argentina) (Figura 3). La fijación homogénea de los cubreobjetos y el nivelado de las superficies son los puntos críticos para evitar un desnivel o entrada de aire que impida el bombeo adecuado o el flujo y adhesión “pareja” de la población a analizar.

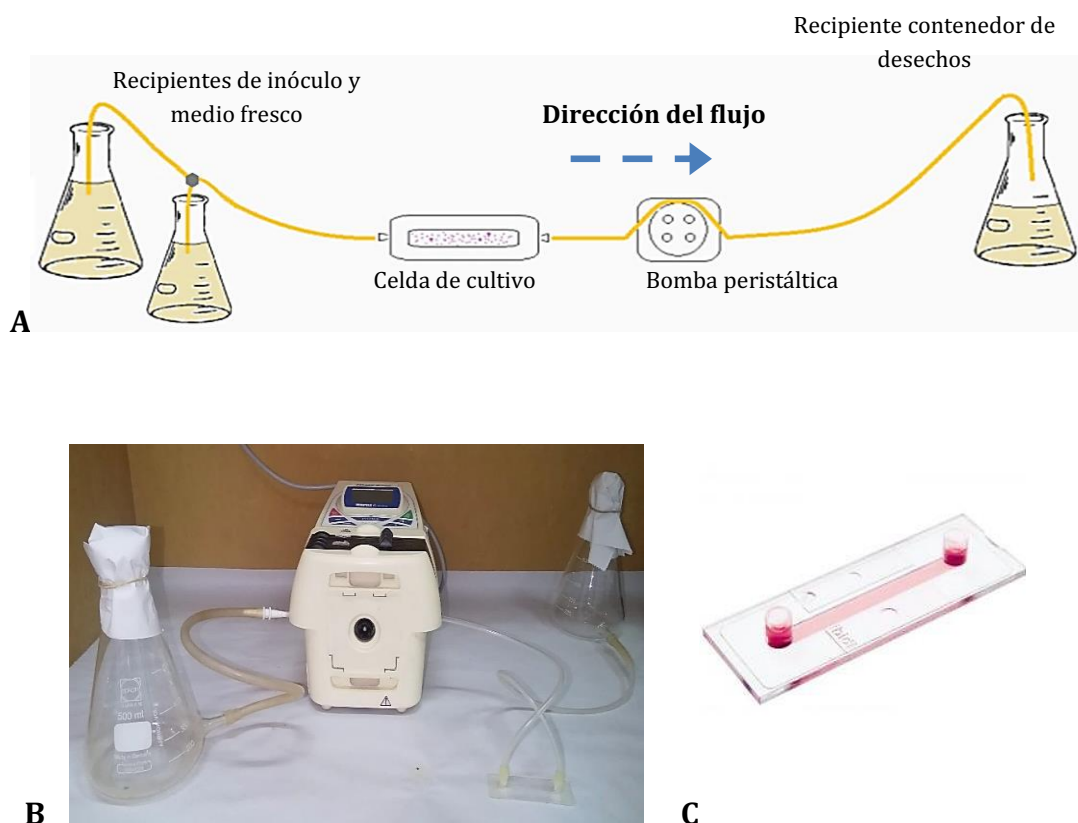


Figura 3. (A) Representación esquemática del sistema de cultivo en biofilm operado bajo flujo continuo de nutrientes. (B) Foto del sistema utilizado durante el desarrollo de estos experimentos. (C) Cámaras de cultivo comerciales marca IBIDI utilizadas en los experimentos.

Con la intención de llevar a cabo un análisis sobre formación de biofilm y buscando la reducción del volumen del medio de cultivo a emplear en los ensayos, teniendo en cuenta particularmente que los experimentos demandan largos períodos de incubación y

requieren mucho volumen de un medio de cultivo de alto costo, en una segunda etapa del trabajo las cámaras desarrolladas de manera casera fueron reemplazadas por celdas comerciales. Estas celdas son de menor tamaño y permiten generar valores de *shear stress* más altos utilizando menos volumen de medio y biomasa para el inóculo del cultivo. De esta forma fueron utilizadas las celdas diseño: μ -Slide I Luer de la marca comercial IBIDI, (Germany), cuyas dimensiones son: 17 mm de longitud, 3,8 mm de ancho y 0,4 mm de alto. Cabe aclarar nuevamente que el sistema de flujo de nutrientes y la cámara de cultivo siempre fueron esterilizados antes de ser usados mediante autoclave y una circulación de hipoclorito de sodio al 5 % seguida de un enjuague con agua destilada estéril.

V.3.2 Microscopías

V.3.2.a Microscopía de Fluorescencia y análisis de imágenes

La adquisición de imágenes mediante Microscopia Electrónica de Fluorescencia se llevó a cabo con un microscopio de fluorescencia DMLB acoplado a una cámara DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Suiza), disponible en el CINDEFI-UNLP. Se utilizaron dos tipos de tinciones con los colorantes naranja de acridina y SYTO 9 (Thermo Fisher scientific), ambos compuestos funcionan como agentes intercalantes de ADN. El software de adquisición de imágenes utilizado es el de la cámara del microscopio *Leica Application Suite*. Luego se llevó a cabo un análisis de las fotografías adquiridas mediante el software IMAGE J, utilizando la herramienta *Analyze particles* para el análisis de las imágenes obtenidas en los ensayos de adhesión bajo condiciones de *shear* hidrodinámico.

Los mecanismos de tinción para el registro de datos en el microscopio de fluorescencia consistieron en los siguientes pasos: i) fijación con paraformaldehído (PFA) 4% v/v durante 40 minutos, luego se lavó dos veces con PBS para eliminar los residuos del fijador; a continuación, se tiñó con naranja de acridina 0,1% p/v durante 20 minutos y finalmente se llevó a cabo un enjuague con PBS y el cargado del medio líquido final en la cámara de cultivo para la observación al microscopio. ii) Para este tipo de análisis también se utilizó una tinción con SYTO9 durante 25 minutos, seguida de un lavado del

biofilm con PBS estéril, y finalmente una fijación con PFA 4%, el enjuague final y la observación al microscopio.

V.3.2.b Microscopía de barrido láser confocal y análisis de imágenes

Los análisis estructurales de los biofilms fueron realizados a partir de imágenes adquiridas en el microscopio de escaneo láser confocal (CLSM del inglés: *confocal laser scanning microscopy*) Leica TCS SP5 disponible en la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Se tomaron imágenes adquiridas en planos XYZ y esa información fue analizada utilizando el software *Leica Application Suite* y el software gratuito de procesamiento de imágenes IMAGE J. El análisis cuantitativo de la estructura de los biofilms se realizó utilizando el *plug-in* COMSTAT2, el cual puede descargarse de modo gratuito en www.comstat.dk (Heydorn *et al.*, 2000; Vorregaard, 2008).

Se llevó a cabo el registro de datos adquiridos en el microscopio CLSM Leica TCS SP5 de los biofilms formados a distintos períodos de tiempo: 24, 48 o 72 h. Los mecanismos de tinción para el registro de imágenes consistieron en los siguientes pasos, similares a los utilizados para el microscopio de fluorescencia: i) fijación con PFA 4% durante 40 minutos, luego se lavó dos veces con PBS para eliminar los residuos del fijador; a continuación, se tiñó con naranja de acridina 0,1% p/v, durante 20 minutos, finalmente se llevó a cabo un enjuague con PBS y se cargó nuevamente la cámara de cultivo de líquido para llevar a cabo la adquisición de imágenes. ii) Para este tipo de análisis también se utilizó una tinción con SYTO9, seguida de un lavado del biofilm con PBS estéril, y finalmente fijación con PFA 4% y enjuague previo a la adquisición de imágenes.

V.3.3 Análisis desarrollados

V.3.3.a Análisis estructural de biofilms maduros crecidos en sistema semicontinuo con recambio de nutrientes (semi-batch)

Los biofilms destinados a ensayos de análisis estructural y arquitectónico se obtuvieron a partir del cultivo en cámaras operadas bajo flujo de nutrientes semicontinuos. Estos cultivos fueron llevados a cabo en cajas de Petri de vidrio, con cubreobjetos en su interior, con la finalidad de disponer de una superficie de adhesión y

crecimiento de biofilm de fácil manipulación. El biofilm formado después de 72 h fue sometido a dos lavados suaves con PBS, se fijó con PFA 4% y se tiñó con naranja de acridina para finalmente someterse a un enjuague final con PBS. El cubreobjeto con el biofilm fijado y teñido sobre su superficie fue montado sobre un soporte casero formado por un portaobjetos con dos superficies de vidrio adheridos en los extremos con la función de extensores de altura (Figura 4).



Figura 4. vista lateral del soporte utilizado para la observación al CLSM donde se llevó a cabo el montaje del cubreobjetos con el biofilm desarrollado sobre uno de sus lados.

Las imágenes fueron obtenidas utilizando el CLSM disponible en la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Para la obtención de la información cuantitativa de la estructura de los *biofilms* las imágenes fueron analizadas con el software COMSTAT2. Cada experimento fue realizado al menos 3 veces.

Las variables analizadas utilizando COMSTAT2 fueron: el espesor medio (μm), que proporciona una medida del tamaño espacial, y espesor máximo (μm): esta variable es definida como el máximo grosor en una ubicación determinada -ignorando los poros y vacíos dentro del biofilm-, la proporción Superficie/Biovolumen ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$): definida como el área de superficie dividida por el biovolumen y que refleja la fracción del biofilm expuesta al flujo de nutrientes, y el coeficiente de rugosidad (Ra). Este último parámetro a diferencia del analizado en los estudios de propiedades nanomecánicas, se calcula a partir de la distribución del espesor del biofilm y se define como:

$$Ra = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|L_{fi} - L_f|}{L_f} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde, donde L_{fi} es la i -ésima medida de espesor individual, L_f es el espesor medio y N es el número de medidas de espesor. La rugosidad del biofilm proporciona una medida de cuánto varía el grosor del mismo y es un indicador de la heterogeneidad (Heydorn *et al.*, 2000).

V.3.3.b Análisis del efecto del *shear stress* en la adhesión de *B. pertussis*

Para llevar a cabo un estudio de la capacidad de adhesión de *B. pertussis* bajo la presencia de *shear* hidrodinámico, con valores similares a los fisiológicos, se utilizaron celdas de flujo continuo de nutrientes. El inóculo bacteriano fue preparado a partir de cultivos líquidos en el medio SS que fueron incubados toda la noche a 160 rpm. La suspensión resultante fue concentrada mediante una centrifugación de 5 minutos a 6500 rpm seguida de una dilución del pellet en medio líquido SS, a fin de disponer de una DO_{650} inicial de: 0,2. Una vez inoculadas las celdas de cultivo, se dio lugar a la circulación del medio de cultivo fresco a distintas velocidades de flujo mediante la acción de una bomba peristáltica conectada a las mangueras del sistema. Los ensayos se realizaron a 37°C bajo flujo continuo de nutrientes durante 4 h, correspondiente al tiempo de adhesión definido previamente para *B. pertussis*.

Para calcular la velocidad de flujo requerida por el sistema y así lograr los valores de *shear stress* deseados teniendo en cuenta las dimensiones de la cámara, fue empleada la siguiente ecuación específica para cámaras rectangulares (Lecuyer *et al.*, 2011):

$$Shear\ stress = \frac{6Q\mu}{wh^2} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde Q : velocidad de flujo, μ : viscosidad del medio, w : ancho de la cámara y h : altura de la cámara. Su utilizó el índice de viscosidad del agua a 37 ° C (0,0068 dyn s/cm²), viscosidad similar a la del medio de cultivo.

Las velocidades de flujo fueron determinadas en base al rango de valores de *shear stress* fisiológico reportadas para el tracto respiratorio y que se encuentra detallado en la Figura 5 (Tarran *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2020). Se utilizaron distintas velocidades de flujo de nutrientes para completar el rango de valores de estudio. En la Tabla 1 se especifican las velocidades utilizadas y el correspondiente *shear stress* generado en cada caso, en la cámara de cultivo utilizada, la cual tiene las medidas específicas que se indicaron previamente.

Finalmente, se llevó a cabo un lavado con PBS estéril y la tinción de las bacterias adheridas con Cristal Violeta (CV) 0,1% durante 20 minutos y un último enjuague con PBS.

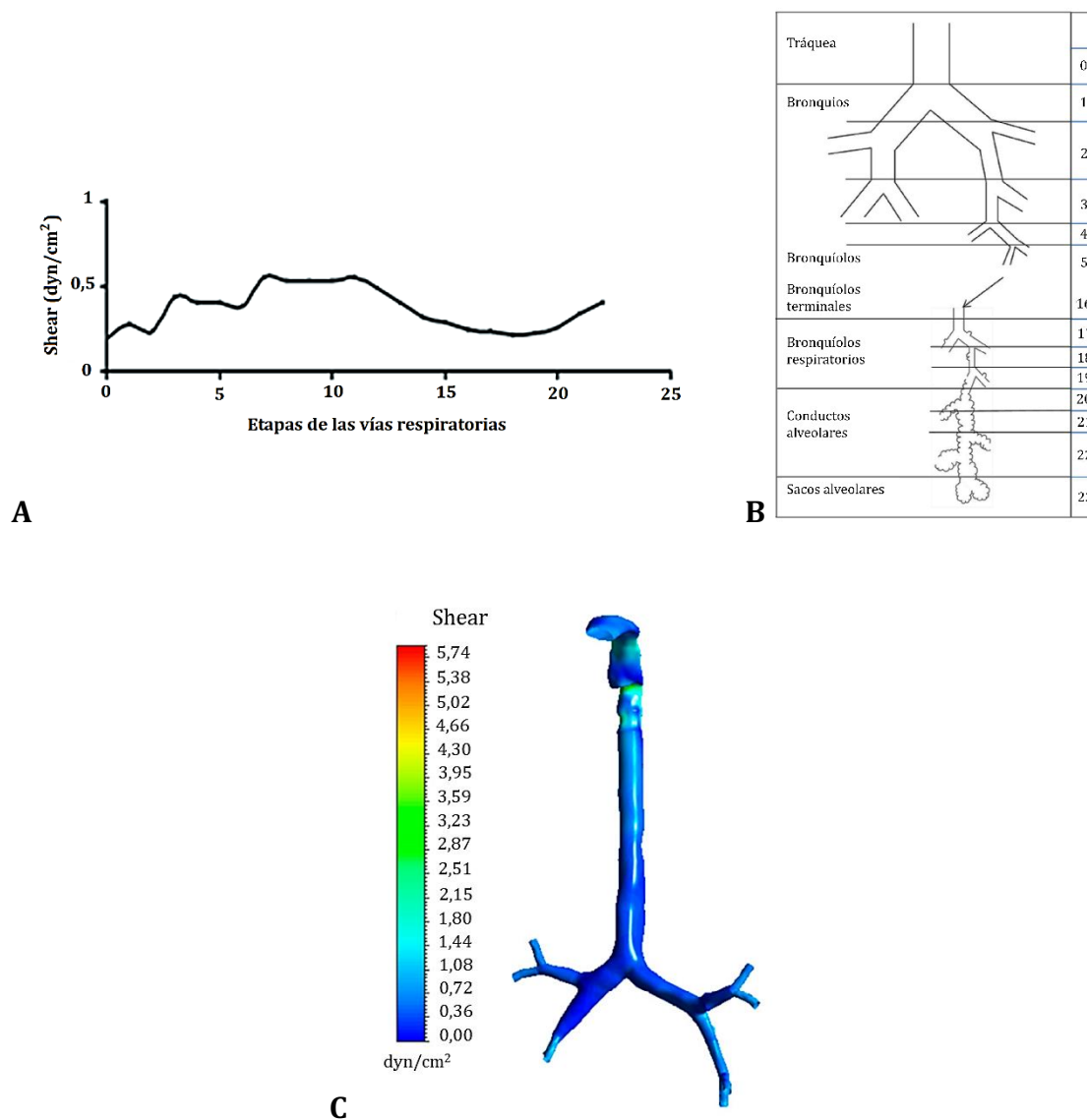


Figura 5. *Shear stress* fisiológico. (A) En este gráfico el eje abscisas está definido mediante la consideración del sistema como un árbol de ramificación asimétrica, donde la tráquea es considerada la etapa 0 de las vías respiratorias y el número incrementa a través del tracto respiratorio (tomado de Tarran *et al.*, 2005). (B) Etapas de las vías respiratorias – generaciones de las vías respiratorias – (Adaptada de Weibel, 1963) (C) *Shear* calculado en boca-garganta y vía aérea traqueo-bronquial para un modelo saludable (sin enfermedades) (Singh *et al.*, 2020).

Tabla1: *Shear stress* generado por cada velocidad de flujo de líquido con el sistema utilizado.

Velocidad de flujo (mL/min)	<i>Shear stress</i> (dyn/cm ²)
0	0
0,84	0,45
1,69	0,90
2,11	1,2

A través de la cámara adaptada al Microscopio de Fluorescencia disponible en el CINDEFI, fueron adquiridas al menos 25 imágenes correspondientes a distintos campos de cada celda analizada, siempre ubicados en la zona central de la cámara, donde se ha especificado en la bibliografía que es la zona en la cual el *shear stress* adquiere el valor calculado por la ecuación 2. De cada imagen, se analizó el porcentaje de superficie cubierta mediante el software IMAGE J y la herramienta: *Analyze particles*. Cada ensayo fue repetido al menos tres veces y se realizó el análisis estadístico de todas las imágenes registradas en cada ensayo.

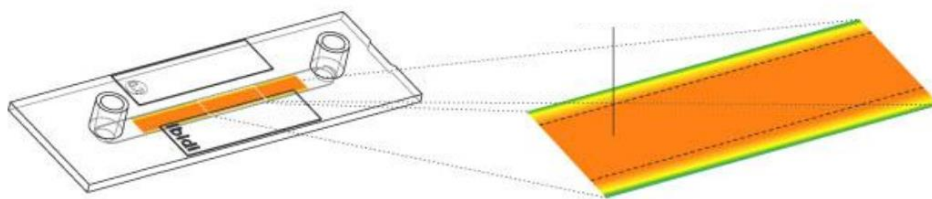
La tinción de bacterias adheridas fue realizada utilizando una solución acuosa de CV 0,1% p/v. Inicialmente se realizó un lavado suave por inmersión utilizando PBS estéril. Luego de ese tiempo se cubrió cada portaobjetos con 200 μ L de la solución de CV, durante 15 minutos. Nuevamente se realizó un lavado por inmersión en PBS y luego el portaobjetos con el biofilms adherido se ubicó sobre un soporte similar al de la Figura 4 para llevar a cabo el registro de imágenes con el microscopio electrónico.

V.3.3.c Análisis del efecto del *shear stress* en el desarrollo y estructura de biofilms de *B. pertussis*

Para llevar a cabo los experimentos sobre los efectos del *shear*, los biofilms fueron crecidos en celdas comerciales marca μ -Slide I Luer IBIDI. En esta segunda etapa de ensayos de *shear stress* con valores similares a los fisiológicos, se llevó a cabo un estudio sobre la formación y arquitectura de biofilms resultantes de la presencia de estrés hidromecánico. Se inocularon las celdas de análisis con una suspensión bacteriana de DO₆₅₀ inicial: 1, proveniente de un cultivo líquido de 24 h. Luego se incubó de manera estática durante 4 h y se dio lugar a la circulación del medio de cultivo mediante la acción de una bomba peristáltica. La velocidad de flujo fue determinada según lo especificado por los fabricantes de la celda para lograr el valor de *shear stress* deseado (www.ibidi.com). En este caso, se utilizó una velocidad de flujo de 0,5 mL/min lo que genera un *shear stress*

de $0,45 \text{ dyn/cm}^2$. Luego de 48 h, se detuvo el flujo de nutrientes y se llevó a cabo un lavado de los *biofilms* formados con PBS estéril con el objetivo de eliminar las bacterias libres circundantes.

Finalmente se registraron las imágenes mediante CLSM. Para esto se llevó a cabo una tinción con naranja de acridina o SYTO9, según el caso. Al menos 3 stacks correspondientes a distintos campos fueron adquiridos de cada celda de cultivo. Las imágenes fueron adquiridas en las zonas centrales de la cámara de análisis donde el *shear stress* es homogéneo, específicamente en áreas alejadas de las paredes y próximas a la parte central, tal como se demuestra en la Figura 6. El correspondiente análisis se llevó a cabo utilizando el software Leica, IMAGE J y el *plug-in* mencionado previamente COMSTAT2. Las variables analizadas fueron la biomasa del biofilm, el espesor promedio, el coeficiente de rugosidad y la proporción superficie volumen, definidos previamente.



Sector de *shear stress* homogéneo

Figura 6. Zona de análisis donde los valores de *shear stress* se mantienen homogéneos (Imagen adquirida de: Application Notes AN 11: Shear stress and Shear rate, -www.ibidi.com).

V.4 RESULTADOS

V.4.1 Análisis estructural de biofilms maduros formados en sistemas de cultivo semi-batch por la cepa de referencia Bp Tohama I y el aislado clínico Bp 2723

Se analizó la formación de biofilm de *B. pertussis* utilizando microscopía CLSM, llevando a cabo un análisis comparativo de la estructura de biofilms formados por la cepa de referencia y el aislado clínico Bp 2723 en sistemas de cultivo semi-batch. De esta manera se cuantificaron variables tridimensionales describiendo características estructurales de biofilms maduros de 72 h formados por la cepa de referencia Bp Tohama I y el aislado clínico Bp 2723 bajo condiciones de recambio de nutrientes semicontinuo (semi-batch sin flujo de nutrientes).

En la Figura 7 se muestran las imágenes CLSM obtenidas de los biofilms formados por la cepa de referencia y el aislado clínico, donde se puede observar que Bp 2723 forma un biofilm de mayor extensión que el correspondiente a la cepa de referencia vacunal Bp Tohama I.

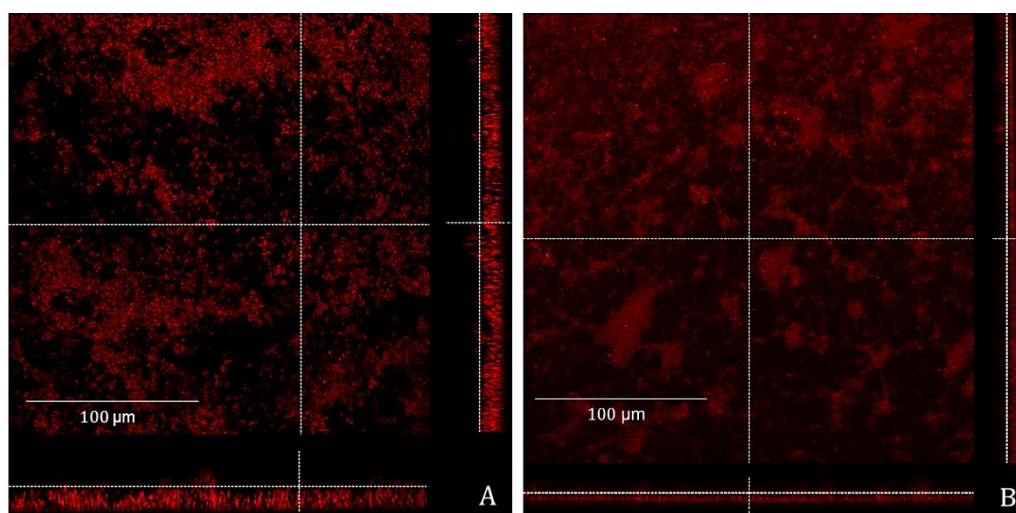


Figura 7. Imágenes de microscopía CLSM de biofilms maduros (72 h) de Bp 2723 (A) y Bp Tohama I (B), crecidos en sistema semicontinuo con recambio de nutrientes (semi-batch). Tinción: naranja de acridina.

Entre las características estructurales registradas correspondientes a cada cepa el espesor del biofilm es una de las principales características en este tipo de análisis por su fácil interpretación. El aislado clínico desarrolla biofilms de mayor espesor medio, incluso alcanza valores de espesor máximo que resultaron ser del orden del doble del que alcanzó en similares condiciones de crecimiento la cepa de referencia (Tabla 2). El coeficiente de rugosidad refleja cuánto varía la rugosidad superficial de las biopelículas siendo un indicador de la heterogeneidad de la comunidad bacteriana, analizando esta variable el

biofilm de la cepa de referencia crecido en un sistema semi-continuo de flujo de nutrientes se presenta más homogéneo que el aislado clínico. La fracción del biofilm expuesto al flujo de nutrientes está reflejada en la proporción superficie-volumen, definida como el área de la superficie dividida el bio-volumen, y nos indica cómo se adapta el biofilm al ambiente. No se presentan diferencias significativas en esta última característica entre los biofilms de ambas cepas.

Tabla 2: Características estructurales de Biofilms de *Bp* Tohama I y *Bp* 2723 crecidos en sistemas semicontinuo con recambio de nutrientes (semi-batch). Análisis estadístico test Student, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, $n:3$.

Parámetros cuantitativos	Bp Tohama I		Bp 2723
Espesor (μm)	10,33 ($\pm 0,11$)	**	14,55 ($\pm 0,27$)
Espesor máximo (μm)	17,78 ($\pm 0,81$)	***	36,56 ($\pm 0,47$)
Coefficiente de Rugosidad (Ra)	0,18 ($\pm 0,01$)	*	0,36 ($\pm 0,07$)
Superficie cubierta	0,78 ($\pm 0,03$)	*	0,94 ($\pm 0,04$)
Proporción Superficie/Biovolumen ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$)	1,729 ($\pm 0,008$)		1,93 ($\pm 0,85$)

De manera global podemos afirmar que en sistemas semi-bacth, el aislado clínico Bp 2723 colonizó el sustrato de un modo más eficiente que la cepa de referencia Bp Tohama I, la cual desarrolla biofilms más uniformes y delgados comparados con el aislado clínico según el porcentaje de superficie cubierta, la rugosidad y relación superficie/volumen.

V.4.2 Análisis de la adhesión a superficies de *B. pertussis* bajo los efectos del *shear stress*

Para lograr la formación de biofilms y una colonización óptima, una vez que un organismo patógeno se pone en contacto con el hospedador, se requiere que se cumplan todas las etapas descritas en la evolución de este tipo de crecimiento. En condiciones fisiológicas la primera etapa de adhesión de este proceso se lleva a cabo en un entorno donde las células están expuestas a los efectos del *shear stress* generado por el flujo de aire o mucosidad característicos del sistema respiratorio. Estas fuerzas hidrodinámicas dificultan la adhesión de la bacteria pero a su vez colaboran con su dispersión. Las

bacterias desarrollan mecanismos capaces de enfrentar estas acciones de barrido, por ejemplo expresando ciertas adhesinas posicionadas de acuerdo a la dirección del flujo al cual están sometidas. Dado los pocos conocimientos respecto de la respuesta de *B. pertussis* frente a las condiciones de *shear* presentes en tracto respiratorio, decidimos en este trabajo comprender como las fuerzas mecánicas afectan la adhesión y el proceso de formación de biofilm de *B. pertussis* teniendo en cuenta a su vez las diversas fases de virulencia, las cuales se caracterizan por la expresión diferencial de las distintas proteínas de cubierta celular.

El estudio de adhesión bajo los efectos de varios valores de fuerza de corte fisiológicos fue analizado luego de un periodo de 4 h establecido para permitir la adhesión de *B. pertussis*. Esto se realizó mediante la determinación del porcentaje de superficie cubierta (directamente asociada con la adhesión bacteriana) (Figura 8).

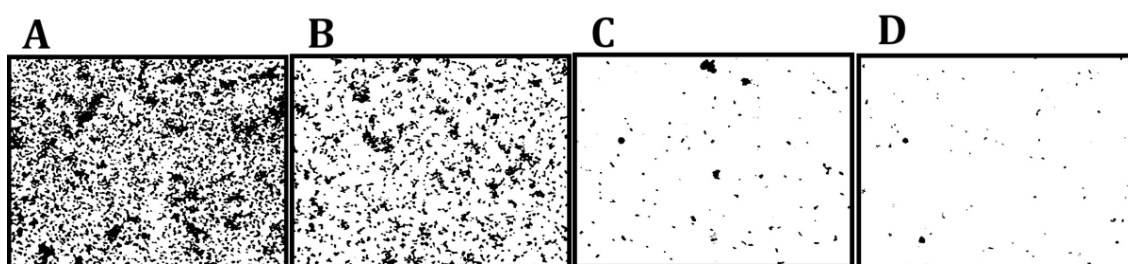


Figura 8. Imágenes ópticas de la adhesión de *B. pertussis* expuesta a un rango de valores de *shear stress* –(A)= 0 dyn/cm²; (B)=0,45 dyn/cm²; (C)= 1,2 dyn/cm²; (D)=1,8 dyn/cm²

Se determinó en primer lugar la capacidad de adhesión frente a los efectos del flujo hidrodinámico, de las distintas cepas estudiadas e indicadas en Materiales y Métodos. Observamos que las bacterias en fase avirulenta son las que presentan los más bajos porcentajes de superficie cubierta. Estos resultados eran esperables debido a que en esta fase Bvg-, la expresión de genes *vags*, como adhesina, no se halla regulada positivamente en *B. pertussis* (Boucher *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2001; Coutte *et al.*, 2016; Moon *et al.*, 2017).

Si observamos la Figura 9 donde se expone la relación: porcentaje de superficie cubierta *vs shear stress*, destacamos que cuando las condiciones ambientales están dadas por la presencia de *shear stress*, el porcentaje de adhesión del aislado clínico Bp 2723 inicialmente en fase avirulenta (Bvg-) fue significativamente mayor que el de la cepa Bp Tohama I. Esto nos permite afirmar que Bp 2723 avirulenta (sin la expresión inicial de

adhesinas) presenta una mayor capacidad de adhesión luego de 4 horas expuesta a condiciones de *shear stress* similares al valor medio reportado para las vías respiratorias.

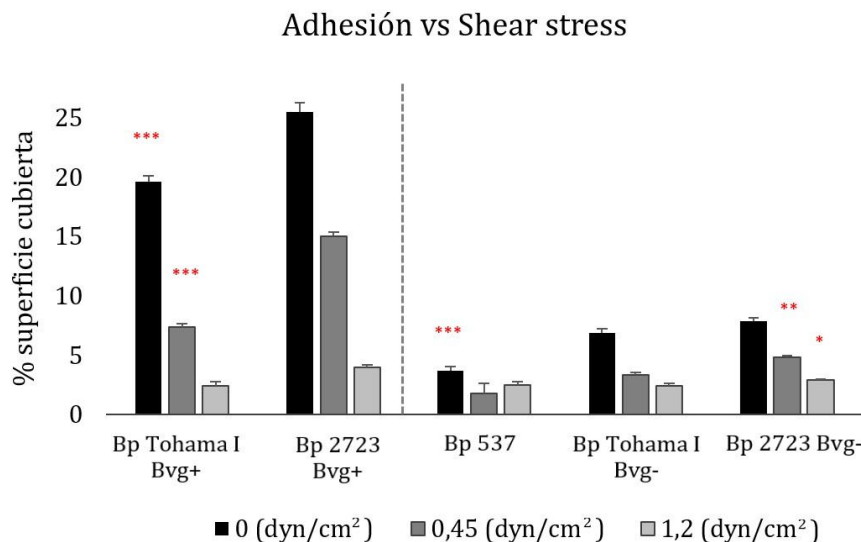


Figura 9. Relación porcentaje de superficie cubierta vs *shear stress* para cada cepa estudiada luego de 4 h de incubación a 37° C. El análisis estadístico compara las cepas en condición virulenta entre sí, (Bp Tohama I Bvg+, Bp 2723 Bvg+), y las cepas en condición avirulenta (Bp 537, Bp Tohama I Bvg- y Bp 2723 Bvg-) entre sí, realizado mediante el test de Student donde *p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001, n:5.

V.4.3 Análisis de la formación de biofilms bajo los efectos de *shear stress* fisiológico de la cepa de referencia Bp Tohama I vs el aislado clínico Bp 2723

Hasta el momento se han publicado trabajos sobre la arquitectura de comunidades bacterianas de *B. pertussis* pero creciendo en la mayoría de los casos en cultivos estáticos, semi-batch o a muy bajas velocidades de flujo de sustancias comparados con el valor de *shear* fisiológico promedio de las vías respiratorias humanas. En este trabajo de tesis se continuó con el análisis de la formación de biofilms de la cepa de referencia y el aislado clínico cuando son expuestos a un flujo continuo de medio de cultivo.

En la Figura 10 se muestran las imágenes adquiridas con el CLSM de los biofilms desarrollados bajo las condiciones de operación que definen un *shear* de 0,45 dyn/cm². A simple vista podemos observar las superficies más heterogéneas y rugosas en los biofilms expuestos a *shear stress* y la presencia de canales, así como el mayor espesor de los biofilms de Bp 2723.

El biofilm desarrollado luego de 48 h de crecimiento por la cepa de referencia expuesta a una fuerza de corte similar a la que se encuentra en el hospedador, tiene una biomasa significativamente menor que cuando se desarrolla en ausencia de flujo. No sucede lo mismo con el aislado clínico Bp 2723 ya que en este caso el valor de biomasa de biofilms expuestos y no expuestos a flujo de nutrientes es similar. El espesor del biofilm de Bp Tohama I es significativamente menor al desarrollado en las mismas condiciones por Bp 2723. Los coeficientes de rugosidad aumentan significativamente en la cepa de referencia cuando el biofilm se cultiva bajo la acción de la fuerza de corte, este incremento podría estar generado por la posible erosión ocasionada por el flujo de medio líquido. No se registra un efecto significativo del *shear stress* sobre biofilms en la relación superficie/biovolumen para ninguna cepa y condición (Figura 11).

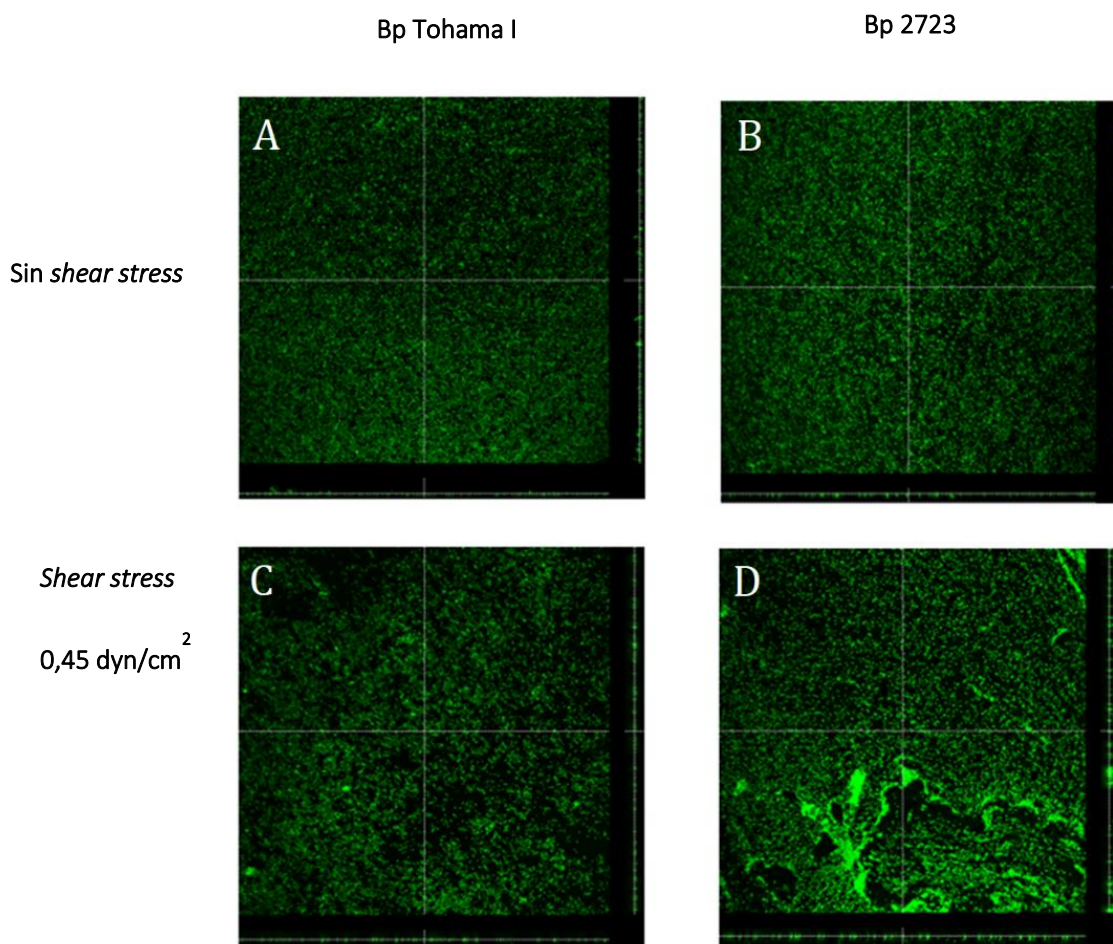


Figura 10. Imágenes de microscopía CLSM de biofilms de *B. pertussis* crecidos durante 48 h sin la presencia de flujo hidrodinámico -(A): Bp Tohama I y (B): Bp 2723- y expuestos a valores de *shear stress* fisiológicos -(C): Bp Tohama I y (D): Bp 2723-

En conclusión, el biofilm del aislado clínico expuesto a tensión de corte desarrolla significativamente mayor biomasa y espesor en comparación a la cepa de referencia en esa condición. Esto indica una mayor capacidad de crecimiento de las comunidades bacterianas del aislado clínico y mayor posibilidad de alcanzar el centro del lumen interno de las vías respiratorias, lo que facilitaría a su vez la separación y dispersión de pequeños agregados bacterianos o células individuales de la comunidad.

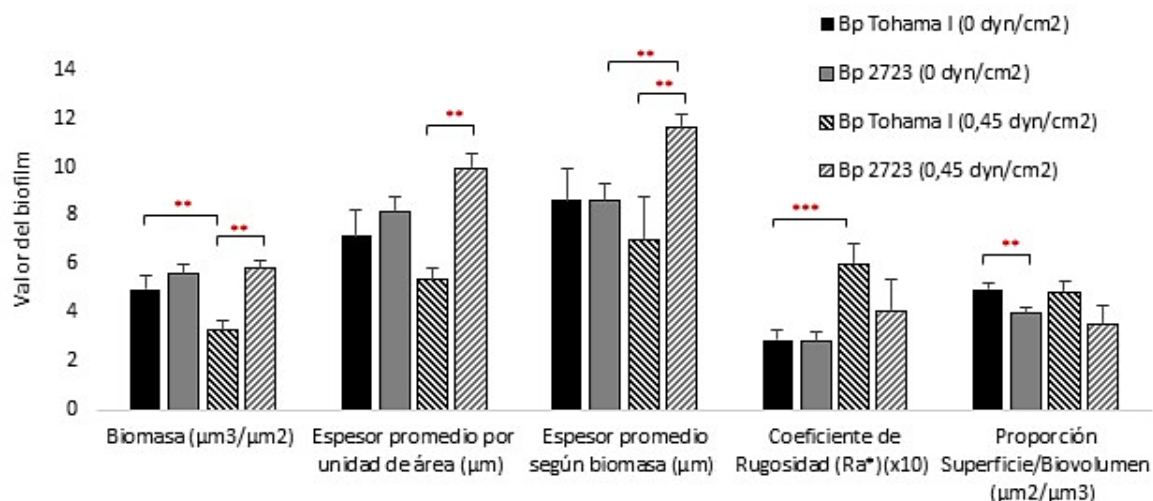


Figura 11. Propiedades de los *biofilms* de 48 h de crecimiento de Bp Tohama I y Bp 2723 crecidos con y sin la presencia de *shear stress* fisiológico. Análisis estadístico mediante el test de Student, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, n:5.

V.5 DISCUSIÓN

La influencia del *shear stress* y, en general, de los aspectos mecánicos en el campo de la biología han adquirido una creciente importancia en los últimos años. La adhesión a una superficie es el primer paso de un proceso de formación de biofilm y es fundamental en la infección y colonización por parte de los microorganismos. Durante el proceso que tiene lugar en tracto respiratorio las bacterias se adhieren a las células del hospedador y dicha fuerza de interacción debe resistir a los efectos del *shear stress* impuesto por el flujo de aire o mucus paralelo a la superficie del tejido. Cuando las fuerzas de corte superan las fuerzas adhesivas que anclan las células a una superficie ya sea biótica o abiótica, el movimiento del fluido puede hacer que las bacterias se separen de la superficie del sustrato (Wang *et al.*, 2018). Los mecanismos que influyen sobre las adhesiones con la superficie en el ambiente natural abarcan una amplia gama de fenómenos: uniones

específicas, procesos de selectividad y respuestas físicas, químicas o biológicas (deformación, modificación de superficies, poblaciones heterogéneas con células más adherentes que otras, etc.).

Si bien se ha encontrado bibliografía respecto a la adhesión de *B. pertussis*, no es de nuestro conocimiento el reporte de trabajos donde tengan en cuenta el efecto del esfuerzo cortante de las condiciones fisiológicas en la formación de biofilm. Durante el desarrollo de este capítulo hicimos hincapié en el estudio comparativo de la capacidad de adhesión y formación de biofilm de la cepa de referencia Bp Tohama I y el aislado clínico Bp 2723 expuestos a tal condición estresante. Los aislados clínicos circulantes de *B. pertussis* difieren mucho de la cepa de referencia de laboratorio que se utiliza en general en los estudios de evasión de la inmunidad, colonización del huésped, desarrollo de vacunas y tratamientos clínicos (Mäkinen *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2005; Arnal *et al.*, 2015; Bowden *et al.*, 2016). En la presente tesis registramos que el aislado clínico empleado conserva una mayor capacidad de adhesión incluso expuesto a flujo hidrodinámico que la cepa de laboratorio, lo que podría ser una característica evolutiva adoptada por estos linajes para poder llevar a cabo una colonización más efectiva. Además, considerando el grado de virulencia bacteriana, se registró la capacidad aumentada de adhesión del aislado clínico procedente de cultivos en fase avirulenta bajo los efectos del *shear stress* fisiológico, simulando el proceso de infección donde en teoría la bacteria llega al hospedador en estado avirulento o de virulencia intermedia y comienzan a darse las condiciones de temperatura ideales para adquirir la fase virulenta (Warfel *et al.*, 2012).

Se ha demostrado en otras especies bacterianas los efectos de la presencia de esfuerzos de corte sobre los biofilms (Kim *et al.*, 2016; Thomen *et al.*, 2017; Otto, 2014). El efecto del *shear stress* fisiológico sobre la siguiente etapa en el proceso de colonización e infección que es el desarrollo de biofilms, fue analizado mediante el desarrollo de biofilm bacteriano bajo un valor de *shear* fisiológico característico de las vías respiratorias y el análisis mediante CLSM. El espesor máximo alcanzado por la cepa clínica estudiada presenta diferencias significativas con la cepa de laboratorio al ser expuestas al mismo *shear stress* (Figura 12). De este modo, el *shear stress* puede aportar un efecto positivo en el transporte de masa aumentando el acceso a sustratos ubicados en otras localizaciones gracias a un transporte masivo más eficiente (Katsikogianni *et al.*, 2010; Lecuyer *et al.*, 2011). Según el balance fuerza de corte vs fuerza adhesiva, esta diferencia en espesor podemos

atribuirla a la fuerza adhesiva entre bacterias, ya que es la variable en esta relación que no podemos regular mientras que la fuerza de corte aplicada es la misma en ambos casos, así como el resto de las condiciones ambientales y la densidad del inóculo. Esta capacidad del aislado clínico podría ser una ventaja selectiva que confiere un cambio en la comunidad bacteriana relacionada con la firmeza necesaria para superar el estrés por cizallamiento, permitiéndole afrontar condiciones de flujo más elevadas y facilitar el acceso al sustrato.

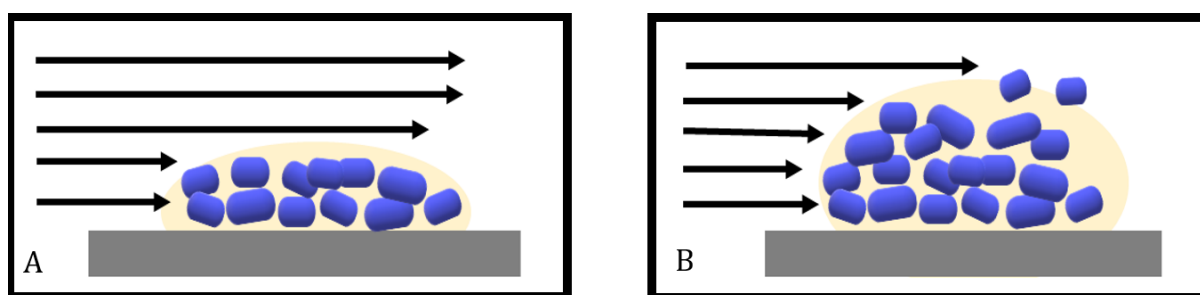


Figura 12. Esquemas representativos del efecto de *shear* hidrodinámico sobre biofilms de Bp Tohama I (izquierda) y Bp 2723 (derecha). Este último se caracteriza por presentar mayor biomasa y espesor promedio.

Muchos cambios causados por el esfuerzo de corte medio se generan en la estructura de las microcolonias, como variaciones en forma del biofilm, acceso de nutrientes, desprendimiento y la migración bacteriana (Figura 13). La arquitectura 3D de las mismas podría afectar la fuerza de unión de las células más que el tamaño de la población en sí. A su vez la estructura de múltiples capas protege a las células internas de los daños causados por el cizallamiento de fluidos (O'Toole *et al.*, 2000; Branda *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2018). El transporte hidrodinámico de moléculas y el control de la distribución de oxígeno, son factores clave en el estilo de vida en comunidad. En este trabajo observamos que el *shear stress* genera biofilms arquitectónicamente más heterogéneos, dando lugar a la presencia de un mayor número de canales de circulación y a un consecuente incremento de la superficie por donde se realiza el intercambio de nutrientes y oxígeno.

Nuestros resultados se suman a la comprensión de la forma en que las bacterias llevan a cabo la adhesión y formación del biofilm, así como la superioridad de los aislados clínicos circulantes para colonizar las superficies incluso bajo los efectos de flujo. Tales resultados son importantes para tener en cuenta en relación a la fortaleza de los aislados

clínicos respecto de la cepa de laboratorio. Además de demostrar el impacto tanto cuantitativo como cualitativo de las fuerzas de cizalla sobre los aspectos morfológicos de la adhesión y biofilm, aquí pretendemos alertar en que una interacción compleja entre el flujo de fluido y las condiciones de adhesividad celular puede ser la base de los patrones emergentes de la estructura de biofilms, y que tiene una influencia importante sobre el funcionamiento y evolución de las poblaciones que viven en dicha comunidad bacteriana, como sugieren Martínez-García y colaboradores, (2018).

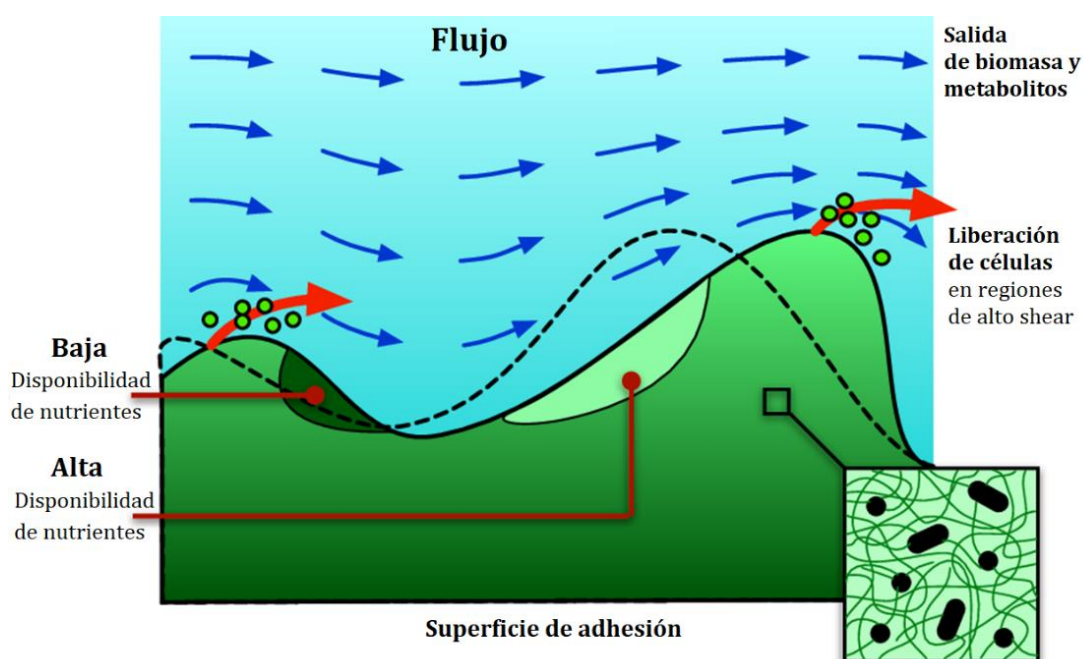


Figura 13. El flujo de fluido genera tensiones de corte que deforman la biopelícula (sólido) a partir de su perfil sin *shear* hidrodinámico (línea discontinua). Un mecanismo de dispersión típico es el desprendimiento celular debido a la alta tensión de corte (flechas grandes). La dirección del flujo, modulada a su vez por la superficie libre, genera cierta variación de la disponibilidad de nutrientes, agentes químicos y productos metabólicos según la forma adquirida por el biofilm. A nivel microscópico, las propiedades mecánicas derivan en última instancia de las células microbianas y la matriz polimérica que producen (recuadro). Imagen tomada de: Head *et al.*, 2016.

Como conclusión general podemos decir que la hidrodinámica tiene una gran influencia en la adhesión y desarrollo de biofilms y que es evidente que los aislados clínicos de *B. pertussis* tienen una mayor capacidad para crecer bajo estas condiciones de estrés que la cepa de referencia, que muestra una interesante capacidad de adaptación ante el esfuerzo de corte impuesto por el movimiento de fluidos. Los resultados discutidos anteriormente abren nuevas líneas de investigación referentes al efecto del

flujo sobre las expresión y distribución de proteínas adhesivas mediante AFM y análisis moleculares de bacterias expuestas a *shear stress*.

II.6 BIBLIOGRAFÍA

- Alav I, Sutton JM, Rahman KM. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J Antimicrob Chemother.* 2018, 73(8):2003-2020. doi: 10.1093/jac/dky042.
- Arnal L, Longo G, Stupar P, Castez MF, Cattelan N, Salvarezza RC, Yantorno OM, Kasas S, Vela ME. Localization of adhesins on the surface of a pathogenic bacterial envelope through atomic force microscopy. *Nanoscale.* 2015, 7(41):17563-72. doi: 10.1039/c5nr04644k.
- Balcázar JL, Subirats J, Borrego CM. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Front Microbiol.* 2015, 6:1216. doi: 10.3389/fmicb.2015.01216.
- Bjarnsholt T, Alhede M, Alhede M, Eickhardt-Sørensen SR, Moser C, Kühl M, Jensen PØ, Høiby N. The in vivo biofilm. *Trends Microbiol.* 2013, 21(9):466-74. doi: 10.1016/j.tim.2013.06.002.
- Branda SS, Vik Å, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 2005, 13:20-26. doi:10.1016/j.tim.2004.11.006.
- Boles BR, Thoendel M, Singh PK. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol Microbiol.* 2005, 57(5):1210-23.
- Boucher PE, Murakami K, Ishihama A, Stibitz S. Nature of DNA binding and RNA polymerase interaction of the *Bordetella pertussis* BvgA transcriptional activator at the *fha* promoter. *J Bacteriol.* 1997, 179: 1755-1763.
- Bowden KE, Weigand MR, Peng Y, Cassidy PK, Sammons S, Knipe K, Rowe LA, Loparev V, Sheth M, Weening K, Tondella ML, Williams MM. Genome Structural Diversity among 31 *Bordetella pertussis* Isolates from two recent U.S. whooping cough statewide epidemics. *mSphere.* 2016, 1(3) e00036-16; doi: 10.1128/mSphere.00036-16.
- Cattelan N, Dubey P, Arnal L, Yantorno OM, Deora R. Bordetella biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog Dis.* 2016, 74(1):ftv108. doi: 10.1093/femspd/ftv108.
- Cattelan N, Jennings-Gee J, Dubey P, Yantorno OM, Deora R. Hyperbiofilm formation by *Bordetella pertussis* strains correlates with enhanced virulence traits. *Infect Immun.* 2017, 85(12). pii: e00373-17. doi: 10.1128/IAI.00373-17.
- Conover MS, Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Deora R. The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Mol Microbiol.* 2010, 77(6):1439-55. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07297.x.
- Conover MS, Mishra M, Deora R. Extracellular DNA is essential for maintaining Bordetella biofilm integrity on abiotic surfaces and in the upper respiratory tract of mice. *PLoS One.* 2011, 6(2):e16861. doi: 10.1371/journal.pone.0016861.
- Costerton, JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995, 49:711-745.
- Coutte L, Huot L, Antoine R, Slupek S, Merkel TJ, Chen Q, Stibitz S, Hot D, Loch C. The multifaceted *RisA* regulon of *Bordetella pertussis*. *Sci Rep.* 2016, 6:32774. doi:10.1038/srep32774
- Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilm: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000, 64:847-867.
- Dickinson RB, Nagel JA, Proctor RA, Cooper SL. Quantitative comparison of shear-dependent *Staphylococcus aureus* adhesion to three polyurethane ionomer analogs with distinct surface properties. *J Biomed Mater Res.* 1997, 36:152-162.
- Donlan RM. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J.* 2000, 46(6):S47-52. Review. Erratum in: *ASAIO J.* 2001, 47(1):99.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002, 15(2):167-93.

- Dorji D, Mooi F, Yantorno O, Deora R, Graham RM, Mukkur TK. *Bordetella pertussis* virulence factors in the continuing evolution of whooping cough vaccines for improved performance. *Med Microbiol Immunol.* 2018, 207(1):3-26. doi: 10.1007/s00430-017-0524-z.
- Dufrêne YF, Persat A. Mechanomicrobiology: how bacteria sense and respond to forces. *Nat Rev Microbiol.* 2020, 18(4):227-240. doi:10.1038/s41579-019-0314-2
- Ganguly T, Johnson JB, Kock ND, Parks GD, Deora R. The *Bordetella pertussis* Bps polysaccharide enhances lung colonization by conferring protection from complement-mediated killing. *Cell Microbiol.* 2014, 16(7):1105-18. doi: 10.1111/cmi.12264.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004, 2:95–108.
- Head D. Biomechanical analysis of infectious biofilms. *Adv Exp Med Biol.* 2016, 915:99-114. doi: 10.1007/978-3-319-32189-9_8.
- Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, Molin S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology.* 2000, 146 (Pt 10):2395-2407. doi: 10.1099/00221287-146-10-2395.
- Hoyle BD, Costerton JW. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog Drug Res.* 1991, 37:91–105.
- Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, Hussain T, Ali M, Rafiq M, Kamil MA. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc.* 2018, 81(1):7-11. doi: 10.1016/j.jcma.2017.07.012.
- Katsikogianni M.G., Missirlis Y.F. Bacterial adhesion onto materials with specific surface chemistries under flow conditions. *J Mater Sci Mater Med.* 2010, 21:963–968.
- Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009, 73:310–347.
- Kim MK, Ingremeau FB, Zhao A, Bassler BL, Stone HA. Local and global consequences of flow on bacterial quorum sensing. *Nature Microbiology.* 2016, 1:15005.
- Kim SK, Lee JH. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol.* 2016, 54(2):71-85. doi: 10.1007/s12275-016-5528-7.
- Kokare CR, Chakraborty S, Khopade AN, Mahadik KR. Biofilm: importance and applications. *Ind J Biotech.* 2009, 8:159–168.
- Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013, 3:a010306.
- Lecuyer S, Rusconi R, Shen Y, Forsyth A, Vlamakis H, Kolter R, Stone HA. Shear stress increases the residence time of adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophys J.* 2011, 100(2):341-50. doi: 10.1016/j.bpj.2010.11.078. Erratum in: *Biophys J.* 2011, 100(5):1381.
- Leid JG, Willson CJ, Shirliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J Immunol.* 2005, 175(11):7512-8.
- Li ZJ, Mohamed N, Ross JM. Shear stress affects the kinetics of *Staphylococcus aureus* adhesion to collagen. *Biotechnol Prog.* 2000, 16(6):1086-90.
- Lu TK, Collins JJ. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007, 104(27):11197-202.
- Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog.* 2009, 5(3):e1000354. doi: 10.1371/journal.ppat.1000354.
- Mah T, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001, 9:34–39.
- Mäkinen J, Mertsola J, Mooi FR, Van Amersfoort S, Arvilommi H, Viljanen MK, He Q. *Bordetella pertussis* isolates, Finland. *Emerg Infect Dis.* 2005, 11(1):183-4. doi: 10.3201/eid1101.040632.
- Martínez-García R, Nadell CD, Hartmann R, Drescher K, Bonachela JA. Cell adhesion and fluid flow jointly initiate genotype spatial distribution in biofilms. *PLoS Comput Biol.* 2018, 14(4):e1006094. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006094.
- Menzio FD, Mutombo R, Renauld G, Gantiez C, Hannah JH, Leininger E, Brennan MJ, Loch C. Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1994, 62:769-778.

- Mishra M, Parise G, Jackson KD, Wozniak DJ, Deora R. The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*. *J Bacteriol*. 2005, 187(4):1474-84. doi: 10.1128/JB.187.4.1474-1484.2005.
- Mohamed N, Rainier TR Jr, Ross JM. Novel experimental study of receptor-mediated bacterial adhesion under the influence of fluid shear. *Biotechnol Bioeng*. 2000, 68(6):628-36.
- Moon K, Bonocora RP, Kim DD, Chen Q, Wade JT, Stibitz S, Hinton DM. The BvgAS Regulon of *Bordetella pertussis*. *mBio*. 2017, 8(5):e01526-17. doi: 10.1128/mBio.01526-17.
- Nicholson TL, Conover MS, Deora R. Transcriptome profiling reveals stage-specific production and requirement of flagella during biofilm development in *Bordetella bronchiseptica*. *PLoS One*. 2012, 7(11):e49166. doi: 10.1371/journal.pone.0049166.
- Nilsson LM, Thomas WE, Sokurenko EV, Vogel V. Elevated shear stress protects *Escherichia coli* cells adhering to surfaces via catch bonds from detachment by soluble inhibitors. *Appl Environ Microbiol*. 2006, 72(4):3005-3010. doi:10.1128/AEM.72.4.3005-3010.2006.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000, 54:49-79. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.49.
- Otto M. Physical stress and bacterial colonization. *FEMS Microbiol Rev*. 2014, 38(6):1250-70.
- Parise G, Mishra M, Itoh Y, Romeo T, Deora R. Role of a putative polysaccharide locus in *Bordetella* biofilm development. *J Bacteriol*. 2007, 189(3):750-60.
- Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Res*. 2005, (437):41-7.
- Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol*. 1998, 30(2):285-93.
- Percival SL, Malic S, Cruz H, Williams DW. Introduction to biofilms. In: Biofilms and veterinary medicine, Springer Series on Biofilms 6. Springer-Verlag, 2011. Berlin, Heidelberg.
- Persat A, Nadell CD, Kim MK, Ingremeau F, Siryaporn A, Drescher K, Wingreen NS, Bassler BL, Gitai Z, Stone HA. The mechanical world of bacteria. *Cell*. 2015, 161(5):988-997. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.005.
- Relman D, Tuomanen E, Falkow S, Golenbock DT, Saukkonen K, Wright SD. Recognition of a bacterial adhesin by an integrin: mac-rophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell*. 1990, 61:1375-1382.
- Rendueles O, Ghigo JM. Mechanisms of competition in biofilm communities. *Microbiol Spectr*. 2015, 3(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0009-2014.
- Sauer K, Cullen MC, Rickard AH, Zeef LA, Davies DG, Gilbert P. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol*. 2004, 186(21):7312-26.
- Saur T, Morin E, Habouzit F, Bernet N, Escudié R. Impact of wall shear stress on initial bacterial adhesion in rotating annular reactor. *PLoS One*. 2017, 12(2):e0172113. doi:10.1371/journal.pone.0172113.
- Schleheck D, Barraud N, Klebensberger J, Webb JS, McDougald D, Rice SA, Kjelleberg S. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 preferentially grows as aggregates in liquid batch cultures and disperses upon starvation. *PLoS One*. 2009, 4(5): e5513. doi: 10.1371/journal.pone.0005513.
- Serra DO, Lücking G, Weiland F, Schulz S, Görg A, Yantorno OM, Ehling-Schulz M. Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. *Proteomics*. 2008, 8(23-24):4995-5010. doi: 10.1002/pmic.200800218.
- Serra DO, Conover MS, Arnal L, Sloan GP, Rodriguez ME, Yantorno OM, Deora R. FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One*. 2011, 6(12):e28811. doi: 10.1371/journal.pone.0028811.
- Shive MS, Hasan SM, Anderson JM. Shear stress effects on bacterial adhesion, leukocyte adhesion, and leukocyte oxidative capacity on a polyetherurethane. *J Biomed Mater Res*. 1999, 46: 511-519.
- Singh S, Singh SK, Chowdhury I, Singh R. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *Open Microbiol J*. 2017, 11:53-62. doi: 10.2174/1874285801711010053.
- Singh P, Raghav V, Padhmashali V, Paul G, Islam MS, Saha SC. Airflow and particle transport prediction through stenosis airways. *Int J Environ Res Public Health*. 2020, 17(3):1119. doi:10.3390/ijerph17031119.
- Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Mishra M, Deora R. The *Bordetella* Bps polysaccharide is critical for biofilm development in the mouse respiratory tract. *J Bacteriol*. 2007, 189(22):8270-6.
- Smith AM, Guzmán CA, Walker MJ. The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS Microbiology Reviews*. 2001, 25(3):309-333.

- Srivastava S, Bhargava A. Biofilms and human health. *Biotechnol Lett.* 2016, 38(1):1-22. doi: 10.1007/s10529-015-1960-8.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002, 56:187-209.
- Sun D, Accavitti MA, Bryers JD. Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005, 12(1):93-100.
- Sugisaki K, Hanawa T, Yonezawa H, Osaki T, Fukutomi T, Kawakami H, Yamamoto T, Kamiya S. Role of (p)ppGpp in biofilm formation and expression of filamentous structures in *Bordetella pertussis*. *Microbiology.* 2013, 159(Pt 7):1379-1389. doi: 10.1099/mic.0.066597-0.
- Sutherland IW. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 2001, 9(5):222-7.
- Tarran R, Button B, Picher M, Paradiso AM, Ribeiro CM, Lazarowski ER, Zhang L, Collins PL, Pickles RJ, Fredberg JJ, Boucher RC. Normal and cystic fibrosis airway surface liquid homeostasis. The effects of phasic shear stress and viral infections. *J Biol Chem.* 2005, 280(42):35751-9.
- Thomas WE, Trintchina E, Forero M, Vogel V, Sokurenko EV. Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force. *Cell.* 2002, 109(7):913-23.
- Thomen P, Robert J, Monmeyran A, Bitbol AF, Douarche C, Henry N. Bacterial biofilm under flow: First a physical struggle to stay, then a matter of breathing. *PLoS One.* 2017, 12(4):e0175197. doi: 10.1371/journal.pone.0175197.
- Vorregaard M. Comstat2 - a modern 3D image analysis environment for biofilms, in informatics and mathematical modelling. Technical University of Denmark: Kongens Lyngby, Denmark. 2008.
- Wang IW, Anderson JM, Jacobs MR, Marchant RE. Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to biomedical polymers: contributions of surface thermodynamics and hemodynamic shear conditions. *J Biomed Mater Res.* 1995, 29(4):485-93.
- Wang L, Keatch R, Zhao Q, Wright JA, Bryant CE, Redmann AL, Terentjev EM. Influence of type I fimbriae and fluid shear stress on bacterial behavior and multicellular architecture of early *Escherichia coli* biofilms at single-cell resolution. *Appl Environ Microbiol.* 2018, 84(6). pii: e02343-17. doi: 10.1128/AEM.02343-17.
- Warfel JM, Beren J, Merkel TJ. Airborne transmission of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis.* 2012, 206(6):902-6. doi: 10.1093/infdis/jis443.
- Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest.* 1963, 12:131-55.
- Yao SM, Lin YC, Chou CY, Chen YY, Hsiao MJ, Chen HY, Yan JJ, Su HP, Li SY. Antigenic Divergence of *Bordetella pertussis* Isolates in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology.* 2005, 43 (11) 5457-5461; doi: 10.1128/JCM.43.11.5457-5461.2005.

CAPÍTULO VI

Conclusiones generales y perspectivas

Si bien ha habido grandes avances en el conocimiento de las estrategias desplegadas por *B. pertussis* para colonizar el tracto respiratorio, todavía existen muchos interrogantes a descifrar respecto a eventos importantes como el rol de la modulación de fases de virulencia, la forma de transmisión de estos microorganismos, la evasión de los mecanismos de defensa desplegados por el hospedador y mecanismos de persistencia. En este trabajo de tesis se pretendió avanzar en el conocimiento de la capacidad de *B. pertussis* para responder a diversas condiciones de estrés ambiental a las que estas poblaciones están normalmente expuestas durante su estadía en el hospedador. El trabajo se centró sobre el efecto de agentes antimicrobianos, la modulación de la virulencia bacteriana y las fuerzas de shear hidromecánico. Estos trabajos son de gran importancia clínica ya que a nivel mundial pertussis es una enfermedad que ha resurgido a pesar del uso masivo de la vacunación, lo cual es una indicación clara de que los sistemas de protección contra la enfermedad no resultan ser lo suficientemente efectivos y que requieren por lo tanto una constante revisión.

En este trabajo se ha empleado la microscopía AFM y un sensor de nanomovimientos derivado de esa tecnología. Se han tenido en cuenta las ventajas que proporcionan estas

herramientas experimentales en el análisis a nanoescala de células individuales en condiciones fisiológicas y en tiempo real, y la respuesta microbiana frente a agentes del entorno. Los trabajos se iniciaron analizando diferencias entre las dos fases de virulencia y el efecto de antibióticos sobre las propiedades nanomecánicas de la superficie celular para cada una de ellas. Si bien existen antecedentes previos de estudios en otras especies microbianas, hasta el presente no se habían realizado este tipo de estudios en el caso de *B. pertussis*. A partir de este análisis observamos el efecto de antibióticos en tiempo real que nos permitió concluir que los mismos comienzan a actuar en un tiempo muy breve a partir del contacto entre el agente antimicrobiano con la bacteria, sin importar el mecanismo de acción, ya sea sobre membrana externa o a nivel ribosomal. Este análisis se desarrolló sobre bacterias individuales y en división celular. También vimos interesantes diferencias en la respuesta de las propiedades nanomecánicas al mismo antibiótico por parte de células de fase virulenta y avirulenta, importante de destacar considerando que la fase avirulenta ha sido relacionada con la persistencia y transmisión bacteriana. Asimismo, hemos podido constatar diferencias importantes en las respuestas de células aisladas y agrupadas, donde estas últimas se muestran más “adaptadas” para superar los efectos de los antimicrobianos, sosteniendo la idea del beneficio de la vida en comunidad y el resguardo al efecto de antimicrobianos en este estilo de vida.

Se analizó seguidamente la actividad metabólica de poblaciones celulares adheridas a superficies de cantilevers, evaluando las deflexiones nanométricas del mismo. Se evaluó por un lado los valores de CIM y CBM frente a eritromicina y claritromicina de poblaciones de *B. pertussis* Tohama I, empleando los métodos convencionales usados en hospitales de acuerdo al procedimiento del *CDC*. Estos datos tomados como referencia fueron cotejados con la respuesta a distintas concentraciones de los antibióticos

registradas por el nanosensor. Los métodos convencionales de estudios sobre sensibilidad a antibióticos de *B. pertussis* requieren mucho tiempo y son costosos, mientras que el uso del biosensor nanomecánico mostró resultados en tiempo real con alta sensibilidad. En este caso logramos determinar los efectos de los antibióticos ensayados en un tiempo de respuesta menor a 40 minutos por la presencia de un pico de actividad de las bacterias al ser expuestas a concentraciones de antimicrobianos pertenecientes al rango de valores de CIM. Además, este novedoso test puede reducir dramáticamente el tiempo previo de administración del tratamiento apropiado ante casos de pertussis. La misma herramienta dió lugar al desarrollo de un innovador método de análisis, al que nombramos **espectroscopía de nanomovimiento**, mediante el cual logramos cuantificar diferencias metabólicas y disipación de energía en tiempo real de *B. pertussis* en diversos estados de virulencia así como durante el transcurso del proceso de transición. Se logró registrar, en tiempo real, diferencias significativas en un período de 30 minutos y 2 horas de incubación en ambientes que estimulan la transición del estado de virulencia a avirulencia (bacterias procedentes de cultivos en condiciones virulentas, analizadas en tiempo real durante la incubación en medio con MgSO₄ en concentración final: 50mM) y viceversa (bacterias procedentes de cultivo crecido en medio con MgSO₄ en concentración final: 50mM y analizadas en tiempo real en medio sin la presencia del agente modulante).

En la naturaleza, las bacterias se encuentran mayoritariamente asociadas con superficies. Es claro que la adhesión bacteriana es un proceso que depende de muchos factores incluyendo tanto a las células como a características de la superficie y de las condiciones del medio ambiente circundante. Durante este proceso, la mayoría de las bacterias están sometidas a fenómenos mecánicos, incluidos las fuerzas hidrodinámicas,

fuerzas adhesivas, la reología de su entorno y reglas de transporte que definen sus encuentros con nutrientes y moléculas de señalización. Estas características ambientales muy pocas veces son tenidas en cuenta en el desarrollo de vacunas, donde en general las células son crecidas en reactores agitados mecánicamente o en el caso de definir terapias antimicrobianas. A pesar de que la colonización del tracto respiratorio transcurre mediada por la adhesión de las bacterias a superficies y su crecimiento en un entorno expuesto a esfuerzos de corte o fuerzas de cizallamiento, en el caso particular de esta especie bacteriana el comportamiento de los organismos bajo condiciones hidrodinámicas definidas, no había sido reportado hasta el momento. El presente trabajo de tesis doctoral presentó un estudio comparativo del efecto del shear hidromecánico sobre la cepa de referencia de *B. pertussis* y un aislado clínico durante la etapa de adhesión a una superficie abiótica. Nuestros estudios nos permiten concluir que incluso bajo condiciones hidrodinámicas, el aislado clínico conserva la mayor capacidad de adhesión que la cepa de referencia otorgada por la expresión de FHA.

Actualmente en biomedicina, las enfermedades mediadas por biofilms continúan siendo un problema muy importante para los sistemas de salud alrededor del mundo, y considerando el desafío que presentan este tipo de infecciones es importante entender los eventos biofísicos que permiten la colonización en sustratos biológicos y no biológicos. Es sabido que el flujo o fuerza de cizallamiento también genera cambios en la arquitectura de las microcolonias. Aquí hemos registrado este efecto especialmente sobre un aislado clínico. El biofilm desarrollado por un aislado clínico logra adquirir características que favorecen una mejor adaptación al estrés generado y la dispersión celular, alcanzando mayor espesor, generando más canales de circulación e incrementando la superficie expuesta para intercambio de nutrientes con el medio.

En conjunto, nuestros resultados apoyarían la hipótesis de que la bacteria podría utilizar la fase avirulenta para las etapas de transmisión. La diferencia entre las dos fases de virulencia podría constituir un mecanismo de adaptación y supervivencia de estas bacterias en su interacción con su hospedador y el ambiente.

Para el futuro se plantea la necesidad de continuar el análisis de factores que podrían intervenir en la transmisión de estos organismos, continuando con el estudio de la fase BvgI de *B. pertussis*, donde se expresa una combinación de factores de virulencia y proteínas específicas. Los objetivos de largo plazo también incluyen estudios del efecto del shear sobre la expresión de proteínas de cubierta y propiedades nanomecánicas, así como la utilización del nanosensor y espectroscopía de nanomovimiento en procesos más específicos.

Anexo

Capítulo II

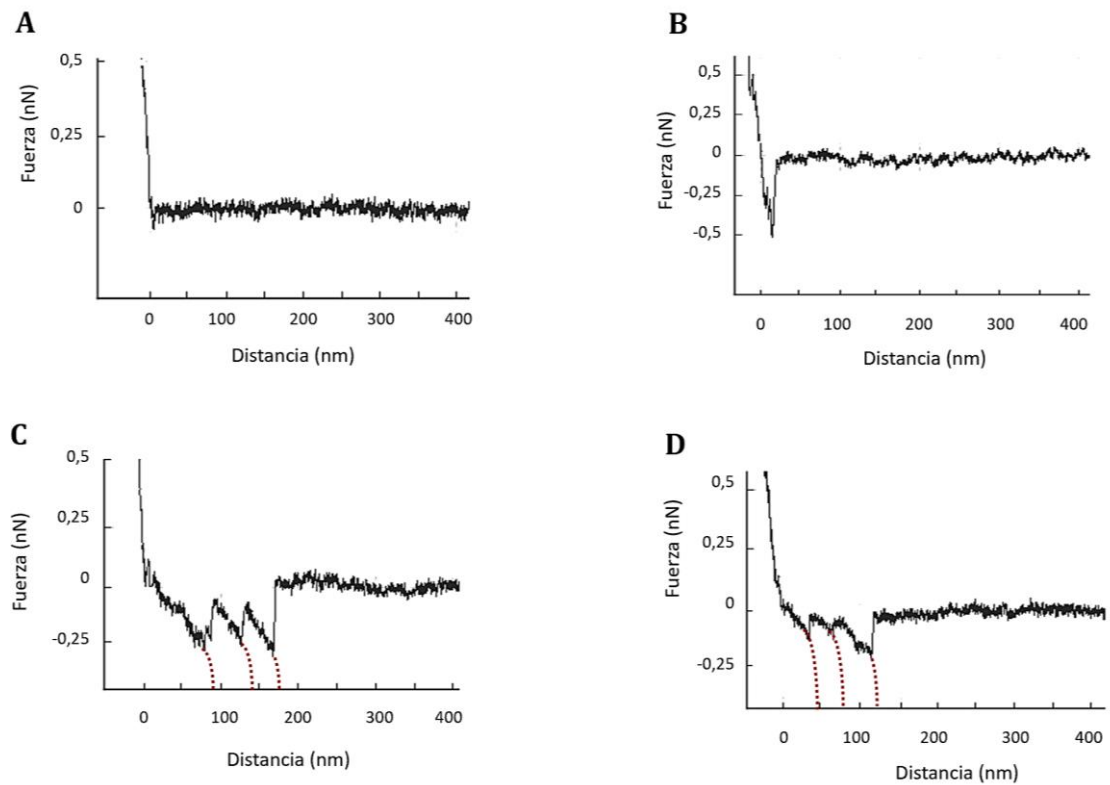


Figura 1. Ejemplo de curvas fuerza-distancia representativas obtenidas mediante Espectroscopia de fuerza con la punta funcionalizada durante este trabajo de tesis. (A) Curva donde no se registra evento de interacción, es decir no se registra interacción alguna entre la punta y la muestra; (B) ejemplo de curva no considerada en el análisis, se registra un evento (pico) pero se asocia a una interacción inespecífica. (C) (D) Ejemplos de curvas de fuerza con 3 picos de interacción específicas para el par FHA-anti-FHA en cada una, es decir tres eventos específicos asociados a la ruptura de la unión antígeno-anticuerpo.

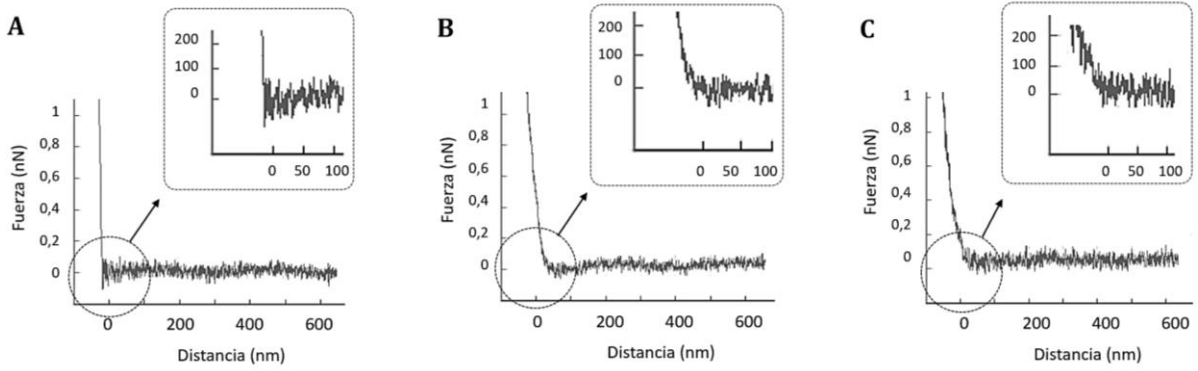


Figura 2. Ejemplos de curvas de fuerzas-distancia adquiridas en este trabajo de tesis durante el estudio de propiedades nanomecánicas. Muestras analizadas: (A) superficie rígida -vidrio-, bacteria *B. pertussis* (B) virulenta y (C) avirulenta.

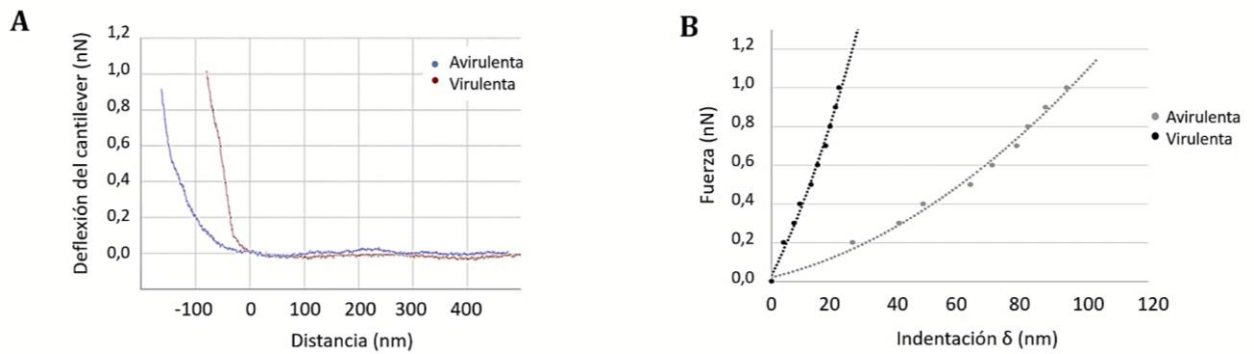


Figura 3. A) Curvas de deflexión de cantilever vs distancia entre la punta y la muestra, realizadas sobre una célula de *B. pertussis* Tohama I virulenta (rojo) y sobre una célula *B. pertussis* 537, mutante avirulenta (azul). B) Curvas de fuerza vs indentación obtenidas para la cepa *B. pertussis* Tohama I (negro) y la cepa mutante avirulenta *B. pertussis* 537 (gris).

Capítulo III

Tablas

*Tabla A1: Valores medios de rugosidad RMS para bacterias virulentas y avirulentas adheridas a una placa de Petri mediante una solución de polilisina 0,01%, antes y después de 5 horas de exposición a antibióticos en concentraciones bactericidas. No se encuentran diferencias significativas entre los valores RMS (al menos 3 replicados).

Tiempo de exposición	Virulenta		Avirulenta	
	Ampicilina (100 µg/mL)	Eritromicina (5 µg/mL)	Ampicilina (100 µg/mL)	Eritromicina (5 µg/mL)
0 h	9,6 (±0,8)	10,5 (±0,8)	10,3 (±0,5)	11,2 (±1,2)
5 h	9,7 (±0,9)	9,4 (±0,5)	10,8 (±1,2)	10,5 (±1,6)

*Tabla A2: Parámetros analizados mediante AFM de bacterias virulentas procedentes de un mismo campo de estudio clasificadas en condición individual o agrupadas. n: 8 o más bacterias.

Parámetro	Bacteria individual	Bacteria en grupo de 2 a 4 células	Bacteria en grupo de 5 o más células
Altura (nm)	565,55 ($\pm 21,19$)	566,40 ($\pm 23,91$)	553,75 ($\pm 28,00$)
Rigidez (kPa)	381,78 ($\pm 43,05$)	398,89 ($\pm 28,89$)	358,29 ($\pm 31,00$)
RMS (nm ²)	10,7 ($\pm 0,5$)	10,3 ($\pm 0,5$)	11,0 ($\pm 0,3$)

Figuras:

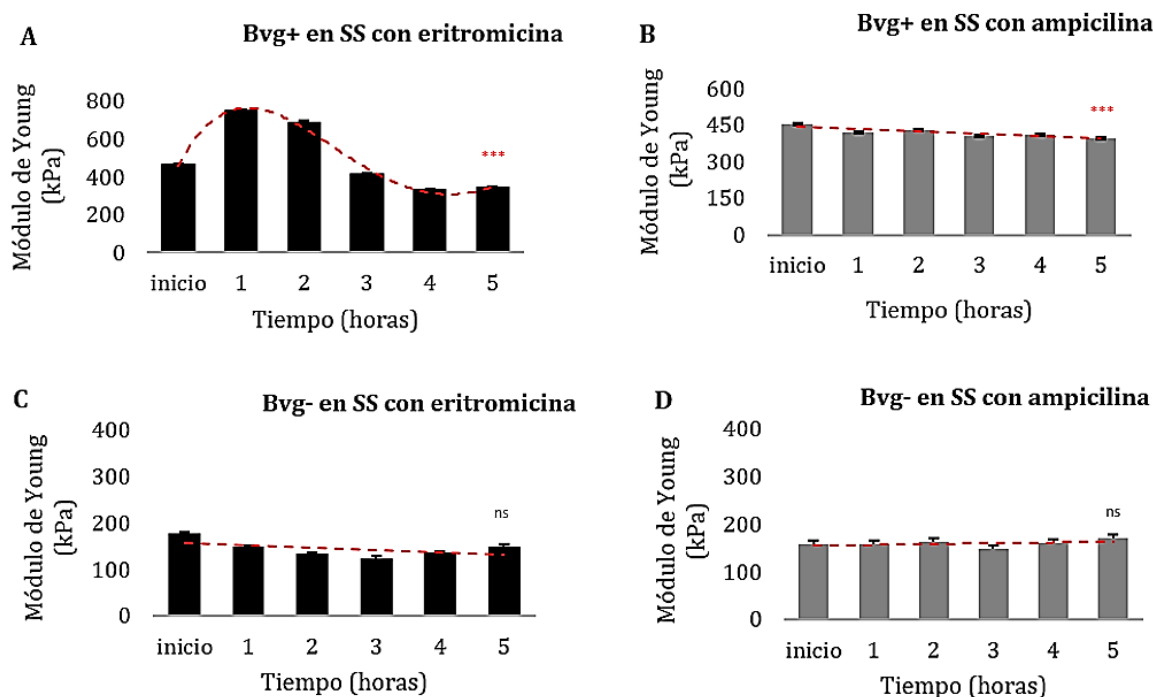


Figura 4. Evolución de los valores medios de rigidez de **bacterias individuales** de *B. pertussis* en ambas fases de virulencia expuesta a antibióticos en concentraciones bactericidas (eritromicina: 5 µg/mL y ampicilina 100 µg/mL). Barra de error representa el error estándar. Se presentan diferencias significativas entre las 0 h y 5 h en bacterias Bvg+ expuesta a antibióticos, pero no en bacterias Bvg- (test *t* Student= ns: diferencias no significativas, *** $p < 0,001$).

Capítulo IV

Gráficos violines: representación de grandes cantidades de datos de forma simple y atractiva

A medida que aumenta la tecnología, la potencia computacional y los límites de memoria, también lo hace el tamaño y complejidad de los conjuntos de datos generados

por la actividad científica, así como la velocidad de acceso a los mismos. Consecuentemente, la elección apropiada del modo de representación de datos se vuelve cada vez más importante; una forma inadecuada de representación podría implicar una falta de información o sesgo de las percepciones de quienes interpreten o sean receptores de esta información una vez procesada y conducir a conclusiones inexactas. Por otro lado, debe tenerse en cuenta la presentación de los datos y lograr una representación de la información accesible y motivadora. En los últimos años los gráficos violines están convirtiéndose en una herramienta que compensa muchas de estas necesidades. Este tipo de gráfico es una combinación entre un diagrama de caja (boxplots) con curvas de densidad o histogramas y adquiere el nombre debido a la forma que generalmente adoptan (Hintze & Nelson, 1998). Un gráfico violín puede construirse a partir de las curvas de densidad o histogramas mediante el posicionamiento de los mismos en forma especular hacia ambos lados de un eje central y, a su vez, combinarse con un gráfico de cajas superpuesto que indique las medidas estadísticas.

En un histograma los conjuntos de datos son reflejados en barras donde el valor de ordenadas es proporcional a la frecuencia de los datos representados (Figura 5 A y B). De este modo, a primera vista pueden detectarse distintos comportamientos de la población que integra la muestra, grado de variabilidad y/o dispersión de distintos parámetros. Si embargo, en las curvas de densidad como en los histogramas se pueden extraer conclusiones erróneas cuando se trabaja con un número de datos pequeños.

Los diagramas de caja (boxplots) permiten comparar rápidamente varios conjuntos de datos de grandes dimensiones, donde cada set de datos se grafica mediante una caja central definida por el rango intercuartílico (IQR) (es decir, todos los valores entre el primer y tercer cuartil o el percentil 25 y 75 de la muestra), una línea interna en la caja que representa la mediana y líneas que sobresalen de la caja y corresponden a los valores de datos más extremos dentro del conjunto de datos de valores típicos. Los valores atípicos se muestran como puntos individuales fuera de los “bigotes” (Figura 5 D). Sin embargo, los diagramas de caja pueden ser engañosos debido a que no se ven afectados por la distribución de datos. Cuando los conjuntos de datos mantienen similares sus medidas estadísticas como medias, medianas y rangos intercuartílicos, sus diagramas son iguales. Si bien el boxplot muestra un resumen estadístico, el gráfico violín logra mostrar además la distribución completa de la información. Esto es particularmente útil cuando

la distribución es multimodal, donde un gráfico violín es capaz de reflejar la presencia de picos diferentes, su posición y la amplitud relativa (Figura 5 E). Las diferencias de distribución también sugieren que los supuestos del ANOVA (u otros modelos paramétricos) pueden no cumplirse, y que la media puede no ser la cantidad más interesante para investigar, siendo ventajoso el uso de los gráficos violines (Allen *et al.*, 2012).

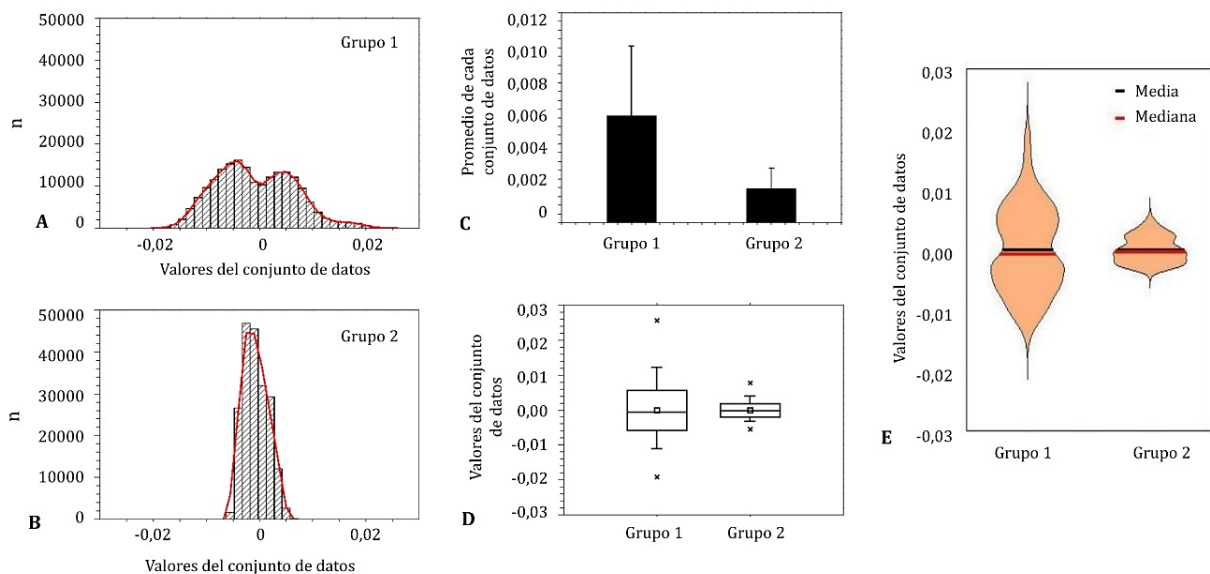


Figura 5. Comparación entre la representación gráfica de dos conjuntos de datos mediante (A) y (B) histogramas, (C) gráficos de barras, (D) boxplot, y (E) gráfico violín. Mediante gráficos violines se puede observar sencillamente la distribución y los parámetros estadísticos medios.

Además, uno de los gráficos más comunes utilizados en la ciencia y presentación de datos son los típicos gráficos de barra, los cuales consisten en asignar importancia arbitrariamente a la altura de las barras, en vez de centrar la atención en el rango de valores observado en la muestra. Se construyen básicamente utilizando las medias estadísticas y barras de error. Generalmente el **eje y** termina justo después de la barra de error mas alta, lo que además abarca una zona de irrelevancia definida por los valores bajos que no pertenecen a la población (ya que el **eje y** suele comenzar desde 0) y excluye valores por encima de la barra de error más alta los cuales pueden ser comunes a la población (zona de invisibilidad) (Figura 5 C). A diferencia de estos gráficos, los violines contienen todos los puntos de datos, lo que los convierte en una excelente herramienta

para visualizar no sólo grandes conjuntos de datos sino también muestras de tamaños pequeños.

Los gráficos violín son especialmente ventajosos cuando se desea hacer una comparación de distribuciones entre varios grupos, ya sea para visualizar datos cuantitativos como cualitativos. La forma de cada violín se puede comparar fácilmente para detectar similitudes o diferencias entre los grupos de datos. La parte más gruesa significa que los valores en esa parte del gráfico tienen mayor frecuencia y la parte más delgada implica una frecuencia menor (Figura 5 E). Además, son perfectamente apropiados si los datos no se ajustan a la distribución normal. Los elementos adicionales, como los cuartiles del diagrama de caja pueden agregarse sin problemas y de este modo proporcionar medidas adicionales. Asimismo, se pueden orientar vertical u horizontalmente, la primera opción es útil cuando se necesita comparar muchos grupos debido a que en general es más fácil expandir el eje en sentido vertical que horizontal; esto es importante cuando necesitamos suficiente espacio para observar claramente la forma de una curva de densidad.

Gracias a la simplicidad en la forma de reflejar datos, estos tipos de representaciones actualmente están tomando popularidad y son usados en todos los ámbitos científicos. Por ejemplo, en un trabajo reciente se caracterizó el patrón de nanomovimiento celular de levaduras individuales mediante microscopía óptica clásica (Willaert *et al.*, 2020) y los resultados fueron reflejados utilizando gráficos violines que permitieron comparar hasta 20 células en un solo gráfico y demostrar que la distribución de los desplazamientos celulares durante un breve período de tiempo es distinta del movimiento aleatorio (Figura 6).

Estos gráficos también son muy utilizados para reflejar resultados de gran cantidad de datos obtenidos en el análisis de expresión de genes asociados con enfermedades. Por ejemplo, Zuo *et al.*, (2019), analizaron la expresión de 6 genes como un posible pronóstico predictor de glioblastoma y presentan los resultados utilizando esta herramienta (Figura 7 A). En otro trabajo reciente basado en el estudio sobre la edad en distintas etapas en pacientes con demencia frontotemporal, donde alrededor de un tercio de los casos se explica por mutaciones en los genes *grn*, *mapt* y *c9orf72*, se emplearon los gráficos violines para representar la información asociada a estas características, donde se pudo

reflejar 6 grupos de datos extensos de manera comparativa en una sola figura (Moore *et al.*, 2019) (Figura 7 B). Yang y colaboradores, (2019), usaron tecnología de secuenciación de ARN para identificar distintas poblaciones de células *Natural Killer (NK)* en la médula ósea y sangre humana, y mediante gráficos violines demostraron la expresión de seis marcadores que definen el linaje NK de cada grupo; permitiendo la comprensión de la heterogeneidad y el desarrollo de este tipo de células (Figura 7 C). Otro estudio (Jiao *et al.*, 2019) utilizó esta herramienta para reflejar de manera simple el índice de masa corporal (IMC) en una cohorte de mujeres adultas europeas-americana (Figura 7 D).

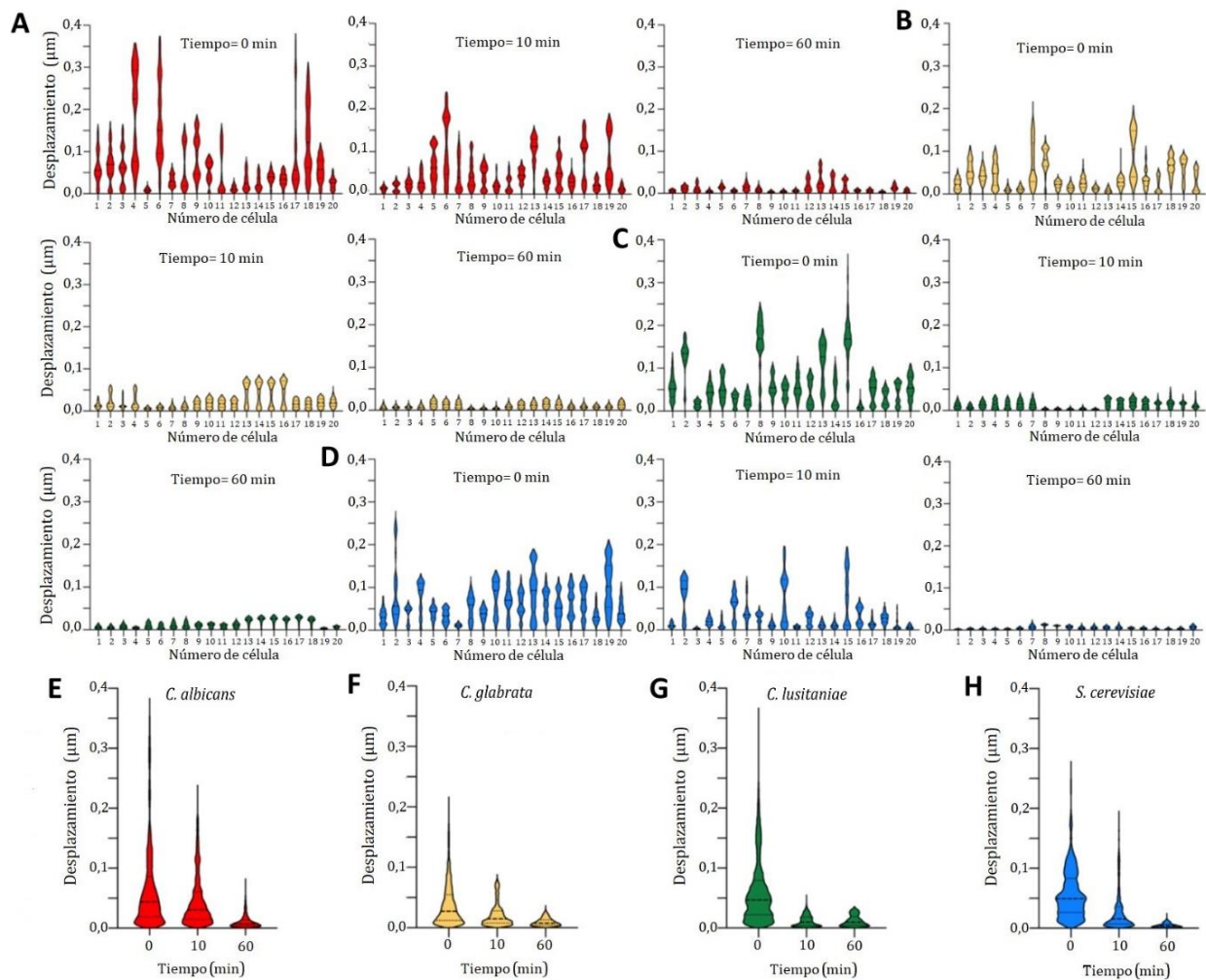


Figura 6. Transición vida-muerte mediante la observación de nanomovimientos de levadura en presencia de etanol (70%). Desplazamientos de 20 células individuales a tiempo: 0 (izquierda), 10 (centro) y 60 minutos (derecha) para (A) *Candida albicans* DSY294, (B) *Candida glabrata* DSY562, (C) *Candida lusitanae* DSY4606 y (D) *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. Evolución temporal de los desplazamientos promedios de las 20 células para (E) *C. albicans* DSY294, (F) *C. glabrata* DSY562, (G) *C. lusitanae* DSY4606 y (H) *S. cerevisiae* BY4742. (Extraído de Willaert *et al.*, 2020).

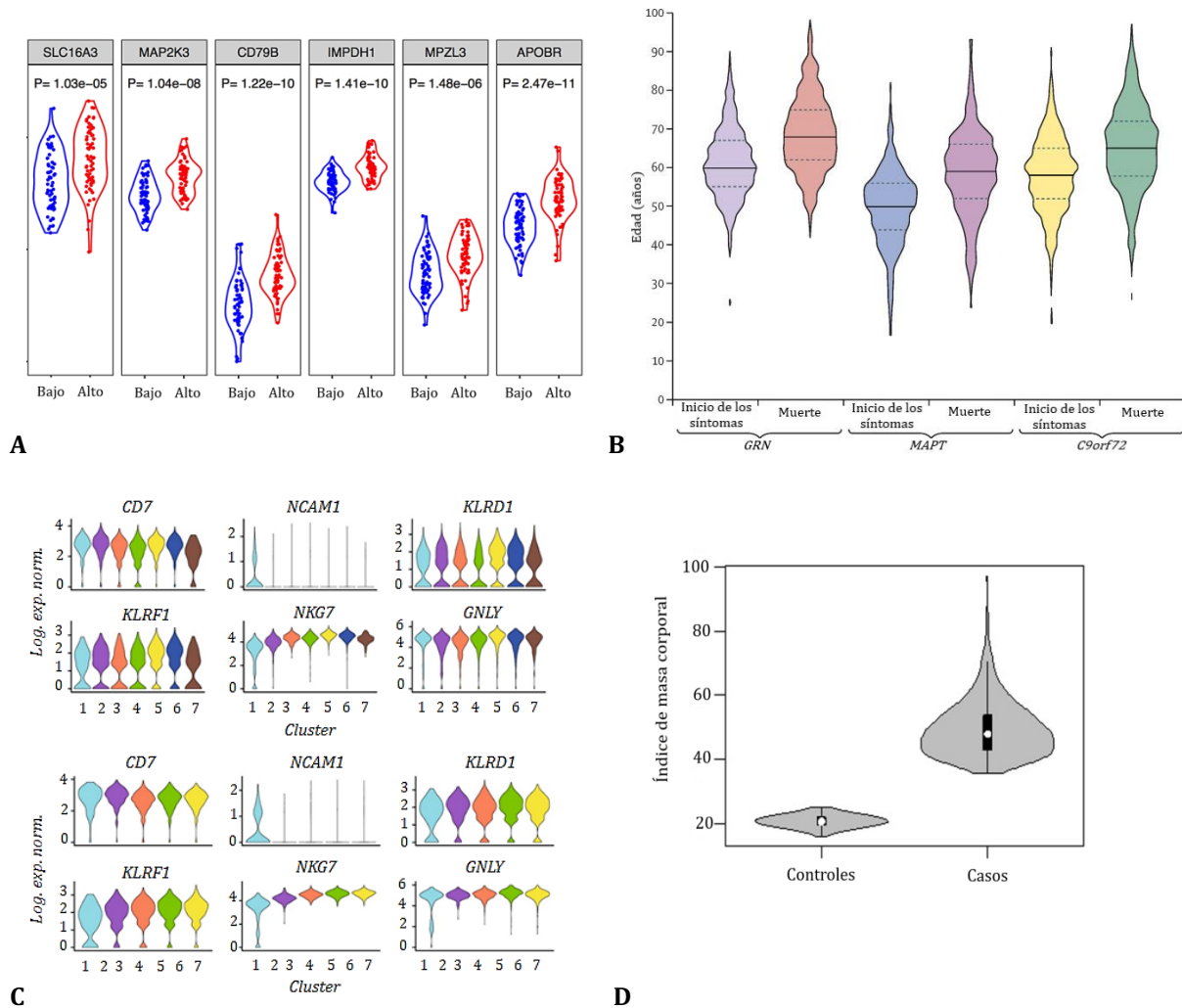


Figura 7. (A) Gráficos de violín que muestra los niveles de expresión de 6 genes individuales entre los grupos de bajo y alto riesgo a tener glioblastoma (extraído de Zuo *et al.*, 2019). (B) Gráficos de violín que reflejan la edad al inicio de los síntomas y al fallecimiento para los tres grupos genéticos, se marcan la media (líneas en negrita) y los IQR (líneas discontinuas). Mediante este gráfico puede observarse fácilmente que la edad media al inicio de los síntomas fue más baja para el grupo MAPT, que la de los grupos GRN y C9orf72 ($p < 0,0001$ para cada comparación) y que el grupo C9orf72 tuvo la segunda edad más baja, que fue significativamente menor que la del grupo GRN ($p < 0,0001$). Sin embargo, observamos un amplio rango de edad al inicio de los síntomas dentro de cada uno de los grupos genéticos, desde los 20 a los 90 en los grupos GRN y C9orf72 y desde los 17 a los 80 años en el grupo MAPTE (Imagen adaptada de Moore *et al.*, 2019). (C) Los gráficos de violín demuestran la expresión de seis marcadores que definen el linaje NK de cada grupo. En la parte superior se representa la agrupación imparcial de células NK humanas de médula ósea y en la parte inferior de células NK de la sangre. El eje y representa el valor de expresión normalizado logarítmicamente (extraído de Yang *et al.*, 2019). (D) Gráficos violines del IMC para 1030 muestras, que abarcan casos (IMC $> 35 \text{ kg/m}^2$, $N = 493$), y controles (IMC $< 25 \text{ kg/m}^2$, $N = 537$), (gráfico tomado de Jiao *et al.*, 2019).

No solo en biología molecular o ciencias de la salud se emplea este tipo de visualizaciones, sino que se aplica ampliamente en todo el ámbito científico. Por ejemplo, en un estudio de análisis de la humedad del suelo mediante diversas variables y métodos de predicción (Pan *et al.*, 2019), utilizando gráficos violines reflejaron el desempeño de los modelos de regresión utilizados en el análisis y el mejoramiento aportado al agregar

variables explicativas (las variables se agregaron secuencialmente a los modelos) (Figura 8 A). Finalmente, tomamos un ejemplo actual del uso de este tipo de representación de datos en ciencias química, donde Kowiel *et al.*, (2020), realizaron una revisión de las restricciones estándar estereoquímicas para azúcares de ácidos nucleicos. En este trabajo analizaron la geometría de la unión glicosídica de los ángulos de enlace de ribosa endocíclica y la dependencia de la conformación del anillo y los rotámero χ y rotámero γ (Figura 8 B).

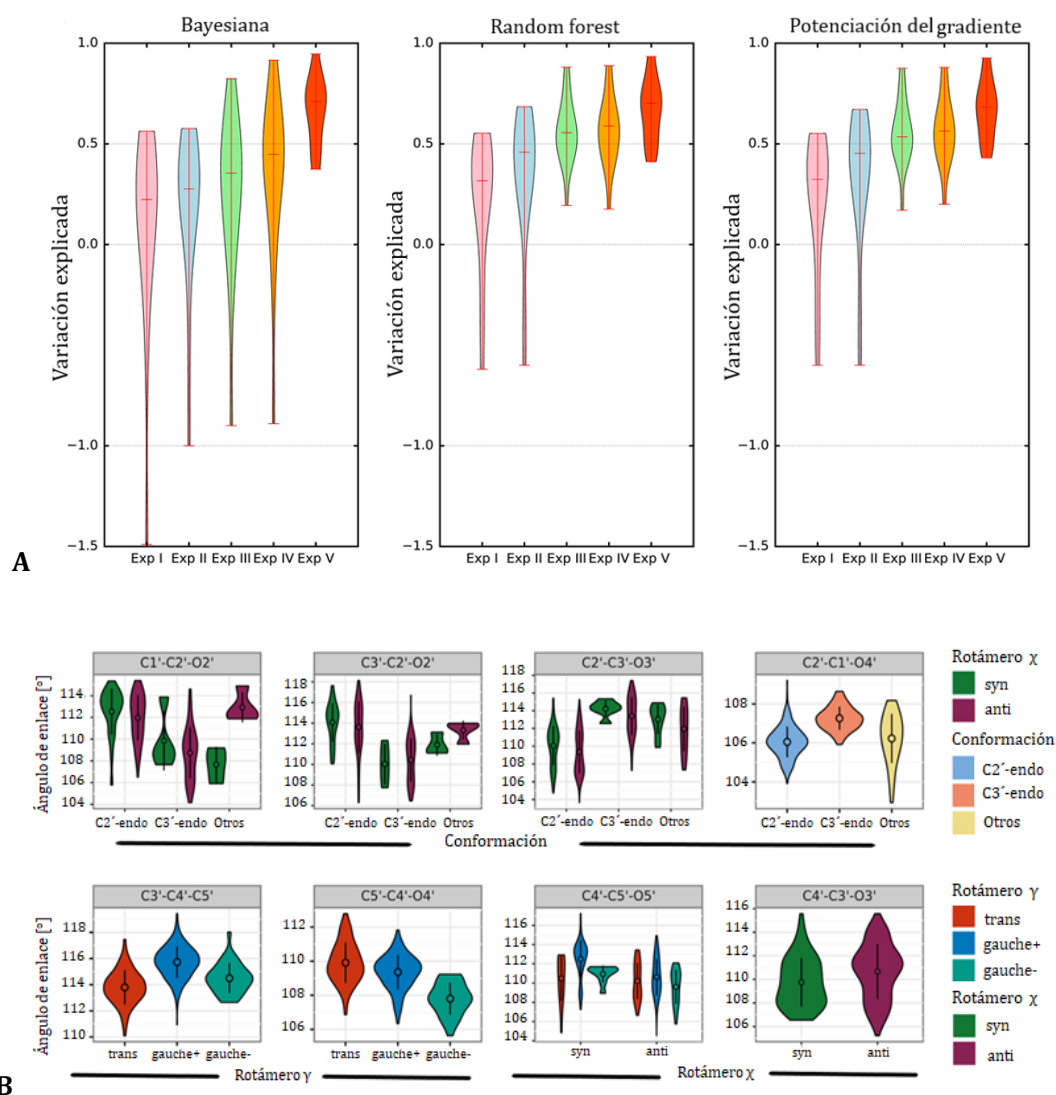


Figura 8. (A) Representación gráfica mediante violines de la variación explicada (valores R²) de regresión lineal bayesiana, "random forest" y árbol de regresión de aumento de gradiente (potenciación en gradiente) en 16 sitios diferentes y cinco experimentos. Los gráficos de violín muestran el rango completo y la distribución de los datos de la muestra. La línea horizontal central representa la mediana, (extraído de Pan *et al.*, 2019). (B) Sección superior: gráficos violines que representan los ángulos de unión dependiendo de la conformación del anillo (eje x) y el ángulo de torsión glicosídico (color). Sección inferior: gráficos violines que representan los ángulos dependiendo del rotámero del ángulo de torsión glicosídico (color). Imagen adaptada de: Kowiel *et al.*, 2020.

Este tipo de gráfico si bien hace años que se ha comenzado a utilizar, recientemente se ha convertido en una herramienta de representación de datos ampliamente utilizada en la ciencia en general. En conclusión, los violines son específicamente recomendables para reflejar de un modo adecuado y atractivo los resultados de trabajos científicos que abarcan una gran cantidad de información difícil de representar mediante los gráficos usados convencionalmente.

Bibliografía

- Allen EA, Erhardt EB, Calhoun VD. Data visualization in the neurosciences: overcoming the curse of dimensionality. *Neuron*. 2012, 74(4):603-608.
- Hintze JL, Nelson RD. Violin plots: a box plot-density trace synergism. *American Statistician*. 1998, 52:181-184.
- Jiao H, Zang Y, Zhang M, Zhang Y, Wang Y, Wang K, Price RA, Li WD. Genome-Wide Interaction and Pathway Association Studies for Body Mass Index. *Front Genet*. 2019, 10:404. doi: 10.3389/fgene.2019.00404.
- Kowiel M, Brzezinski D, Gilski M, Jaskolski M. Conformation-dependent restraints for polynucleotides: the sugar moiety. *Nucleic Acids Res*. 2020, 48(2):962-973. doi: 10.1093/nar/gkz1122.
- Moore KM, Nicholas J, Grossman M, McMillan CT, Irwin DJ, Massimo L, Van Deerlin VM, Warren JD, Fox NC, Rossor MN, Mead S, Bocchetta M, Boeve BF, Knopman DS, Graff-Radford NR, Forsberg LK, Rademakers R, Wszolek ZK, van Swieten JC, Jiskoot LC, Meeter LH, Doppler EG, Papma JM, Snowden JS, Saxon J, Jones M, Pickering-Brown S, Le Ber I, Camuzat A, Brice A, Caroppo P, Ghidoni R, Pievani M, Benussi L, Binetti G, Dickerson BC, Lucente D, Krivensky S, Graff C, Öijerstedt L, Fallström M, Thonberg H, Ghoshal N, Morris JC, Borroni B, Benussi A, Padovani A, Galimberti D, Scarpini E, Fumagalli GG, Mackenzie IR, Hsiung GR, Sengdy P, Boxer AL, Rosen H, Taylor JB, Synofzik M, Wilke C, Sulzer P, Hodges JR, Halliday G, Kwok J, Sanchez-Valle R, Lladó A, Borrego-Ecija S, Santana I, Almeida MR, Tábuas-Pereira M, Moreno F, Barandiaran M, Indakoetxea B, Levin J, Danek A, Rowe JB, Cope TE, Otto M, Anderl-Straub S, de Mendonça A, Maruta C, Masellis M, Black SE, Couratier P, Lautrette G, Huey ED, Sorbi S, Nacmias B, Laforce R Jr, Tremblay ML, Vandenberghe R, Damme PV, Rogalski EJ, Weintraub S, Gerhard A, Onyike CU, Ducharme S, Papageorgiou SG, Ng ASL, Brodtmann A, Finger E, Guerreiro R, Bras J, Rohrer JD; FTD Prevention Initiative. Age at symptom onset and death and disease duration in genetic frontotemporal dementia: an international retrospective cohort study. *Lancet Neurol*. 2020, 19(2):145-156. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30394-1. Erratum in: *Lancet Neurol*. 2020, 19(2):e2.
- Pan J, Shangguan W, Li L, Yuan H, Zhang S, Lu X, Wei N, Dai Y. Using data-driven methods to explore the predictability of surface soil moisture with FLUXNET site data. *Hydrological Processes*. 2019, 33: 2978- 2996. doi:10.1002/hyp.13540.
- Willaert RG, Vanden Boer P, Malovichko A, Alioscha-Perez M, Radotić K, Bartolić D, Kalauzi A, Villalba MI, Sanglard D, Dietler G, Sahli H, Kasas S. Single yeast cell nanomotions correlate with cellular activity. *Sci Adv*. 2020, 6(26):eaba3139. doi:10.1126/sciadv.aba3139.
- Yang C, Siebert JR, Burns R, Gerbec ZJ, Bonacci B, Rymaszewski A, Rau M, Riese MJ, Rao S, Carlson KS, Routes JM, Verbsky JW, Thakar MS, Malarkannan S. Heterogeneity of human bone marrow and blood natural killer cells defined by single-cell transcriptome. *Nat Commun*. 2019, 10:3931. doi: 10.1038/s41467-019-11947-7.
- Zuo S, Zhang X, Wang LA. RNA sequencing-based six-gene signature for survival prediction in patients with glioblastoma. *Sci Rep*. 2019, 9: 2615. doi: 10.1038/s41598-019-39273-4.