



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Dinámica de la interacción de Bordetella pertussis con
células de la barrera epitelial respiratoria***

Tesista: Lic. Carlos Manuel Baroli

Director/a: Dra. María Eugenia Rodríguez

Codirector/a: Juan Pablo Gorgojo

Año: 2024

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS SE REALIZÓ EN EL CENTRO DE INVESTIGACIONES Y DESARROLLO EN FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CINDEFI-CONICET-CCT LA PLATA), FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARÍA EUGENIA RODRÍGUEZ Y LA CO-DIRECCIÓN DEL DR. JUAN PABLO GORGOJO.

MI RECONOCIMIENTO AL CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET), A LA AGENCIA NACIONAL DE PROMOCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLOGÍA (ANPCYT), A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA (UNLP) Y, EN PARTICULAR, A LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y AL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN FERMETACIONES INDUSTRIALES (CINDEFI) POR HABER HECHO POSIBLE LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.

Agradecimientos

La escritura de esta sección particular de este manuscrito es la culminación de una etapa difícil de abarcar. Si algo nos enseña esta época es que en pocos años pueden pasar muchas cosas con la sensación de que nada cambia. Lo que no ha cambiado para mí a lo largo de esta etapa y de las previas es haber tenido alrededor muchos guías y acompañantes. A estas personas quiero agradecerles en este momento.

Siendo esta una etapa académica corresponde comenzar con la principal guía que tuve en este aspecto, la Dra. María Eugenia Rodríguez, que dirigió la realización de este trabajo de Tesis y que me enseñó a lo largo de todos estos años acerca del pensar y del quehacer científico y de la vida académica en nuestra querida Facultad.

A mi codirector, el Dr. Juan Pablo Gorgojo, que me enseñó desde la Tesina de Grado acerca de cómo trabajar en el laboratorio, cómo mover el cuerpo y las manos, cómo ordenar la mesada y el banco de flujo. Porque más de una vez apareció con una óptica distinta acerca de algún tema en el que estuviéramos trabados con Euge.

A los compañeros del “grupo MER” por pensar en conjunto en los seminarios, por diseñar y ejecutar algunos ensayos. A los compañeros del “grupo Bosch-Yantorno” por compartir el espacio del L2 y hacerlo más entretenido, por haber tenido disponible algún material que hubiera olvidado preparar. Al imprescindible Julito, que siempre sabía prácticamente todo del laboratorio y del instituto y es, en buena medida, responsable de que logremos hacer las Tesis más o menos en tiempo.

También creo merecedores de una mención especial a Marti y a Bruno, por tantos motivos que ya no sabría decir bien cuáles son.

Como todo desarrollo académico, el mío también ocurre en un entorno más amplio, por lo que me parece justo y necesario agradecer a las familias de distintos tipos y formas que me han acompañado con mayor o menor intensidad durante distintos momentos de esta etapa, e incluso desde antes algunas: la familia de las brigadas, la familia de los tambores, las familias de los fulbitos, la familia becaria, la familia de la plaza, la familia de la Facultad, la familia de los muchachos de Esquel, la familia de los genes y del amor.

Índice

1. Introducción general	5
1.1. <i>Bordetella</i>	5
1.2. Tos convulsa	6
1.3. Factores de virulencia de <i>B. pertussis</i>	8
1.3.1. Factores de virulencia regulados por BvgAS.....	8
1.3.1.1. Toxina pertussis	10
1.3.1.2. Adenilato ciclasa	11
1.3.1.3. Hemaglutinina filamentosa	12
1.3.1.4. Fimbrias	14
1.3.1.5. Sistema de secreción de tipo III	14
1.3.1.6. Pertactina y otros autotransportadores	16
1.3.1.7. Toxina dermonecrótica	17
1.3.1.8. Cápsula.....	17
1.3.2 Regulación por el sistema RisA/RisK.....	17
1.3.3. Regulación por sistema PlrSR	18
1.3.4. Regulación mediada por la chaperona Hfq.....	19
1.3.5. Citotoxina traqueal.....	19
1.3.6. Lipooligasacárido.....	20
1.4. Vacunación	20
1.5. Epidemiología	25
1.6. Patogénesis.....	27
1.7. Inmunidad	30
1.8. Epitelio respiratorio	33
1.9. Antecedentes y objetivos de este trabajo	38
2. Materiales y métodos	42
2.1. Cepas y condiciones de cultivo.....	42
2.2. Anticuerpos y sueros.....	42
2.3. Cultivo celular y polarización.....	43
2.4. Ensayos de adhesión e internalización.....	44
2.5. Cultivo e infección en membranas semipermeables.....	46
2.6. Tráfico intracelular y colocalización	46
2.7. Determinación de las bacterias viables por hibridación fluorescente <i>in situ</i>	49

2.8. Determinación de la sobrevida intracelular	50
2.9. Análisis proteómico de bacterias aisladas de células epiteliales	51
2.10. Adquisición y análisis de datos de proteómica global por MS	53
2.11. Análisis estadístico.....	54
3. Adhesión, internalización y sobrevida de <i>Bordetella pertussis</i> en células bronquiales humanas polarizadas	56
3.1. Introducción	56
3.2. Resultados	60
3.2.1. Optimización del modelo epitelial polarizado	60
3.2.2. Adhesión de <i>B. pertussis</i> a monocapas de células epiteliales polarizadas.....	63
3.2.3. Adhesinas bacterianas involucradas en el tropismo de <i>B. pertussis</i> hacia las uniones estrechas	64
3.2.4. Efecto de <i>B. pertussis</i> sobre las uniones estrechas	68
3.2.5. Interacción de <i>B. pertussis</i> con la membrana basolateral	72
3.2.6. FHA es responsable de la mayor afinidad de <i>B. pertussis</i> por la membrana basolateral	74
3.2.7. Tráfico intracelular de <i>B. pertussis</i>	78
3.2.8. Sobrevida intracelular de <i>B. pertussis</i>	81
3.3. Discusión.....	84
4. Evolución del proteoma de <i>Bordetella pertussis</i> en localización intracelular en células epiteliales	95
4.1. Introducción	95
4.2. Resultados	99
4.2.1. Puesta a punto de la infección y el aislamiento de bacterias intracelulares.....	99
4.2.2. Análisis del proteoma de <i>B. pertussis</i> en localización intracelular.....	104
4.2.2.1. Análisis global	104
4.2.2.2. Análisis de proteínas con abundancia modificada en localización intracelular	108
4.2.2.3. Análisis de proteínas relacionadas con el metabolismo.....	117
4.2.2.4. Análisis de proteínas relacionadas con la respuesta a estrés.....	120
4.2.2.5. Análisis de proteínas reguladoras de respuesta.....	123
4.2.2.6. Análisis de factores de virulencia en la adaptación al entorno intracelular epitelial.....	124
4.2.2.7. Análisis de transportadores de hierro en la adaptación al entorno intracelular epitelial.....	130
4.2.2.8. Análisis del factor MgtC en la adaptación al entorno intracelular epitelial..	135
4.3. Discusión.....	140

4.4. Tabla Anexa	150
5. Discusión general.....	184
Bibliografía	193

Capítulo 1

Introducción general

1. Introducción general

1.1. Bordetella

Bordetella pertussis es un cocobacilo gram negativo pequeño, de entre 0,5 y 1 μm de largo, perteneciente al género *Bordetella*, parte de la familia *Alcaligenaceae* de las β -proteobacterias [1]. Junto con *Bordetella parapertussis*, también perteneciente al mismo género, es el agente causal de la tos convulsa en humanos, siendo ambos patógenos estrictamente humanos [2]. Estas dos especies junto a *Bordetella bronchiseptica* constituyen las primeras especies descritas del género y son conocidas como las especies “clásicas” de *Bordetella*. Existe una subespecie de *B. parapertussis* que infecta ovinos además de la ya mencionada que infecta humanos [1]. Por su parte, *B. bronchiseptica* produce infecciones en varios mamíferos y ocasionalmente infecta a humanos que se encuentren inmunodeprimidos [3]. Actualmente el género comprende otras trece especies que se han ido aislando en los últimos años a partir de muestras de humanos infectados, así como también especies aisladas de ratones y de muestras ambientales. A partir de muestras humanas se han aislado *B. holmesii* [4], *B. trematum* [5], *B. ansorpii* [6], *B. petrii* [7], *B. bronchialis* [8], *B. flabilis* [8] y *B. sputigena* [8]. De estas, la única que presenta una sintomatología similar a la tos convulsa es *B. holmesii* [4]. El resto han sido aisladas únicamente en infecciones oportunistas. También se han aislado especies del género *Bordetella* a partir de otras especies. *B. hinzii* se ha aislado de aves de corral [9]. *B. avium* infecta aves generando una enfermedad respiratoria en las mismas [10]. *B. pseudihinzii* infecta roedores [11], y se han aislado tres especies de entornos ambientales: *B. muralis*, *B. tumulicola* y *B. tumbae* [12]. El análisis filogenético del género sugiere que las especies asociadas a animales evolucionaron a partir de ancestros presentes en suelo y/o agua en un proceso de diversificación y especiación con pérdida y ganancia de varios genes, entre ellos toxinas, sistemas de secreción y otros factores de virulencia [13], [14], [15]. Las tres especies clásicas están estrechamente relacionadas filogenéticamente entre sí. Se cree que *B. pertussis* y *B. parapertussis* evolucionaron recientemente a partir de un ancestro similar a *B. bronchiseptica* [16].

1.2. Tos convulsa

La tos convulsa es una enfermedad contagiosa causada principalmente por la infección del tracto respiratorio por *B. pertussis* [1] o *B. paraptussis*. La tos convulsa causada por la infección con *B. paraptussis* suele presentar un cuadro más leve de la misma, probablemente a debido a que esta especie no expresa la toxina pertussis [2]. La primera descripción de una enfermedad con sintomatología compatible con la tos convulsa data de mediados del siglo XV [13]. Es hacia finales de ese mismo siglo que se describieron epidemias de tos convulsa en el territorio que actualmente ocupa la república de Irán [17]. Hacia finales del siglo XVI se registra la primera epidemia de tos convulsa en Europa, originada en París [18]. Hacia finales del siglo XVII Thomas Sydenham y Thomas Willis introducen el nombre de pertussis para referirse a esta enfermedad que afectaba principalmente a niños y lactantes con una importante tasa de mortalidad. En el año 1906 Jules Bordet y Octave Gengou lograron desarrollar un medio de cultivo que permitió aislar el agente causal de la tos convulsa y luego lograron relacionar la presencia de *B. pertussis* con el desarrollo de la enfermedad [19].

La manifestación clínica de la enfermedad suele variar dependiendo de la edad y estado de inmunización del paciente, así como también de la existencia de una infección previa del patógeno y del tratamiento con antibióticos [1]. Generalmente, la fase sintomática de la enfermedad comienza tras un período de incubación de entre siete y diez días desde que la bacteria ingresa al hospedador y suele durar entre seis y doce semanas, aunque puede prolongarse. Asimismo, esta fase se divide en tres etapas: la catarral, la paroxística y la convaleciente. Durante el estadio catarral suele aparecer una tos leve acompañada de rinorrea y lagrimeo. Es durante esta etapa y en las dos semanas posteriores a la aparición de la tos la tasa de contagio es más elevada. La tos empeora progresivamente tanto en frecuencia como en intensidad durante un período que comprende entre una y dos semanas para dar paso a la etapa paroxística. Esta etapa se caracteriza por la aparición de los eventos paroxísticos que consisten en accesos violentos de tos repetidos con cinco o más expektoraciones violentas durante una exhalación simple. Al final del evento sucede la inspiración intensa durante la cual ocurre el clásico sonido similar a un graznido y que da el nombre inglés de la enfermedad (*whooping cough*). Estos episodios pueden ocurrir más de una vez por hora durante el día y la noche y, entre los mismos, el infante puede parecer normal y sin complicaciones respiratorias. Junto a estos paroxismos puede producirse cianosis (coloración azulada debida a la falta de aire), salivación, lagrimeo e incluso vómitos. Existen varias

complicaciones comunes de la enfermedad. Una de ellas es la neumonía, que puede resultar no sólo de la propia infección con *B. pertussis*, sino también de alguna infección secundaria con otro patógeno. La hipoxia cerebral asociada con los paroxismos severos probablemente sea el desencadenante de convulsiones y encefalopatías. La etapa paroxística suele durar entre dos y ocho semanas y finaliza con una transición gradual hacia la etapa convaleciente asociada con una disminución tanto en la frecuencia como en la gravedad de los eventos paroxísticos. Esta última etapa convaleciente suele durar entre una y dos semanas [1].

La mayoría de las muertes por infección con *B. pertussis* ocurren en infantes, especialmente durante el primer año de vida. Los contagios a estos individuos susceptibles suelen tener como fuente algún miembro adolescente o adulto del propio grupo familiar. En neonatos, el síntoma inicial frecuentemente es la apnea y las infecciones son particularmente graves, con hasta un 3% de riesgo de muerte [1]. En infantes la gravedad de la enfermedad y el riesgo de muerte correlacionan con el grado de leucocitosis [20]. En los infantes gravemente enfermos se observa una hipertensión pulmonar, a la cual contribuiría la leucocitosis al bloquear los capilares pulmonares y restringir el flujo de sangre [21].

El tratamiento de las infecciones de niños menores de seis meses suele requerir hospitalización debido a las complicaciones que pueden acaecer, entre ellas las mencionadas dificultades para respirar, apneas e hipoxia. También se recomienda, generalmente, un tratamiento con antimicrobianos que tiene su máxima efectividad en el período de incubación, reduciendo la misma durante la fase catarral. Una vez desencadenados los eventos paroxísticos el tratamiento con antimicrobianos no modifica notablemente el curso de la enfermedad, pero reduce las posibilidades de transmisión del patógeno a otros hospedadores. Actualmente se recomienda el uso de azitromicina y claritromicina y una combinación de trimetoprima con sulfametoxazol en casos de infantes mayores de dos meses de edad con alergia o intolerancia a macrólidos [22].

Los individuos inmunizados, especialmente adolescentes y adultos, suelen cursar infecciones asintomáticas [23], [24], [25] o con enfermedad respiratoria leve (catarro, lagrimeo, estornudos irritación en la garganta o tos durante más de 21 días) [26], [27] aunque también pueden cursarla como una infección con la sintomatología clásica descrita. Esto ocurre ya que la mayoría de estos adolescentes y adultos que se contagian se encuentra inmunizados por vacunación o ya han cursado una infección previa por *B. pertussis* [28], [29] pero presentan bajo nivel de anticuerpos circulantes.

B. parapertussis, por su parte, puede causar en humanos infecciones asintomáticas, cuadros de tos convulsa leves o infecciones clásicas como la descrita más arriba.

1.3. Factores de virulencia de *B. pertussis*

1.3.1. Factores de virulencia regulados por *BvgAS*

Entre los varios factores de virulencia que posee *Bordetella pertussis*, la mayoría están regulados por el sistema de dos componentes BvgA y BvgS (del inglés *Bordetella virulence genes Activator* y *Sensor* respectivamente) codificadas por el locus *bvgAS* [30]. Este sistema controla la expresión de determinados genes en respuesta a cambios en las condiciones ambientales y bajo su regulación se incluyen genes que codifican estructuras presentes en la superficie externa de la bacteria y factores secretados al medio de cultivo. Entre ellas, proteínas relacionadas con la patogénesis, enzimas metabólicas e incluso otros sistemas regulatorios [31]. BvgA es un regulador de respuesta proteico con un dominio receptor en su extremo N-terminal y un dominio de unión a ADN del tipo hélice-giro-hélice hacia el extremo C-terminal [32]. Por su parte, BvgS es una proteína sensor quinasa que posee dos dominios del tipo venus atrapamoscas (VFT del inglés *venus flytrap*) en su extremo N-terminal y con localización en el periplasma que están implicados en la detección de las moléculas señal que regulan su actividad [33]. A continuación de estos dominios VFT, BvgS posee una región que atraviesa la membrana interna, un dominio Per-Arnt-Sim (PAS) ubicado en el citoplasma, un dominio histidina quinasa (HK), un dominio receptor (Rec) y un dominio histidina fosfotransferasa (Hpt). Cuando *B. pertussis* crece cultivada *in vitro* a 37°C, BvgS se encuentra activo y utiliza ATP en la fosforilación de un residuo histidina conservado en su dominio HK [34]. Este grupo fosforilo se transmite luego a un aspartato presente en el dominio Rec, posteriormente a una histidina del dominio Hpt y finalmente a un aspartato del dominio Rec del regulador de respuesta BvgA [34]. BvgA fosforilado se dimeriza y se une a la secuencia consenso heptamérica TTC(C/C)NTA en el ADN [35] para ejercer su función activadora o represora de la transcripción [36], [37]. Si bien la señal o señales que regulan la actividad de BvgS en la naturaleza se desconocen, el crecimiento *in vitro* a baja temperatura o en presencia de sulfato ($MgSO_4$ es el ejemplo más utilizado) o de ácido nicotínico, inactivan a BvgS lo cual determina que BvgA permanezca sin fosforilación e incapaz de iniciar la transcripción de sus genes blanco [30]. La regulación a través de este sistema no es del tipo encendido-apagado, sino que responde a modo de reóstato modificando la expresión de los genes blanco en respuesta a variaciones sutiles de las condiciones del entorno [35], [38], [39], [40], [41]. Este comportamiento de tipo reóstato podría explicarse por un efecto del dominio

PAS que detecta cambios en la abundancia de determinadas moléculas intracelulares afectando la señalización por BvgS [42]. Se especula que esta regulación diferencial de los factores de virulencia, dependiente de BvgAS, en respuesta a las distintas condiciones ambientales encontradas tanto en el interior del hospedador como durante la transmisión entre individuos podría tener un rol importante en la patogénesis de *B. pertussis*.

Se han identificado *in vitro* tres fases fenotípicas en respuestas a cambios graduales de agentes moduladores (sulfato y/o ácido nicotínico) o de la temperatura, la virulenta (Bvg⁺), intermedia (Bvgⁱ) y avirulenta (Bvg⁻) [35]. Las transiciones entre estas fases son reversibles y se denominan en conjunto modulación fenotípica [43]. Cuando *B. pertussis* crece a 37°C en ausencia de ácido nicotínico y MgSO₄, BvgS activa a BvgA por fosforilación y este induce la expresión de los genes denominados *vags* (del inglés *virulence activated genes*, genes activos en virulencia) y a la proteína BvgR cuya función es reprimir la transcripción de los genes *vrg* (del inglés *virulence repressed genes*, genes reprimidos en virulencia) [44], [45]. Los genes regulados por este sistema han sido clasificados en cuatro clases en base a diferencias temporales de su expresión *in vitro* [31], [46], [47]. Los genes de clase I, denominados *vags* tardíos, presentan una cinética de expresión relativamente lenta y que requiere mayores niveles de BvgA fosforilado. Entre estos genes se encuentran el operón *ptx-ptl* que codifica para la toxina pertussis y su sistema de transporte, el operón *cyaA-E* que codifica para la toxina adenilato ciclasa y el operón *bsc* que codifica la expresión del sistema de secreción de tipo 3. Los genes de clase II, por su parte, responden con mayor velocidad a la activación y requieren concentraciones bajas de BvgA fosforilado [47]. Entre estos genes se encuentran *fhaB* que codifica para la adhesina hemaglutinina filamentosa, los genes *fim* que codifican para las fimbrias y también el propio *bvgAS*. El hecho que BvgAS esté autorregulado positivamente confiere un nivel adicional de control del sistema [48]. Para la transcripción de los distintos *vags* se requieren de distintos niveles de BvgA fosforilado, esto se explica por la localización y la afinidad de los sitios de unión de este factor a sus respectivos promotores [49]. Los genes de clase IV son los considerados *vrgs* y se expresan debido a la ausencia de BvgR. Esto ocurre cuando *B. pertussis* se cultiva a 25°C o bien a 37°C en presencia de MgSO₄ o ácido nicotínico. En estas condiciones se inactiva la fosforilación de BvgAS, no se expresa BvgR, dando lugar a la fase Bvg⁻ o avirulenta. Entre los genes de esta clase se encuentran genes relacionados con la síntesis de lipooligosacáridos (LOS) y de polisacáridos de la cápsula [50]. Los genes de clase III se expresan únicamente durante la denominada fase intermedia Bvgⁱ [31] caracterizada también por la ausencia de expresión de los genes de clase I (*vags* tardíos) y de clase IV (*vrgs*) y la expresión de los genes de clase II (*vags* tempranos)

[35]. Esta fase ocurre cuando las bacterias crecen en presencia de bajas concentraciones de los moduladores o en las primeras horas luego del cambio de condiciones de Bvg^- a Bvg^+ . El único gen perteneciente a la clase III caracterizado es *bipA* [31], [51] que codifica para una proteína que se desconoce su función pero se describió que promueve la formación de biopelículas (*biofilms* de aquí en adelante) [52] y podría tener un rol durante las primeras etapas de la colonización de las vías respiratorias [51], [53].

Se especula que la baja temperatura durante la transmisión de hospedador a hospedador, sumado a la baja temperatura en la zona nasofaríngea podría determinar la modulación de la virulencia de tal forma que durante los primeros estadios de colonización *B. pertussis* tendría un fenotipo de fase intermedia o avirulento [54], [55]. Si este fuera el caso, durante los estadios iniciales *B. pertussis* no expresaría los genes *vags*. Ya en el interior del hospedador, el aumento de temperatura induciría la expresión de los *vags* tempranos entre los cuales se encuentran las adhesinas (hemaglutinina filamentosa y fimbrias) que favorecerían la interacción con las células epiteliales respiratorias. Luego de esto, si las condiciones se mantienen, comenzaría la expresión de los factores propios de la fase virulenta. Entre estos factores se encuentran las toxinas, responsables en general de alterar los mecanismos defensivos del hospedador y relacionadas con la fase aguda de la enfermedad y la sintomatología típica. En las secciones siguientes se profundizará particularmente sobre los factores de virulencia más relevantes.

1.3.1.1. Toxina pertussis

La toxina pertussis (PT) es uno de los factores de virulencia más estudiados de este patógeno y uno de los primeros en identificados [56]. Esta proteína es un hexámero tipo AB_5 formado por una subunidad A catalítica y cinco subunidades B involucradas en la unión de la toxina a los receptores de sus células blanco [57]. La subunidad A está codificada por la secuencia S1 y el pentámero B está formado por cuatro subunidades distintas codificadas por las secuencias S2 a S5 y dispuestas con una estequiometría 1S2:1S2:2S4:1S5 [58]. El operón que codifica para la toxina también contiene las proteínas accesorias necesarias para la secreción de la misma [58] *B. pertussis* es la única especie del género que sintetiza y secreta esta toxina cuya actividad principal es la catálisis de la ribosilación de ADP de la subunidad alfa de proteínas G triméricas en las células del hospedador [57]. Las subunidades se ensamblan en el periplasma y se exportan mediante un sistema de secreción de tipo IV [59]. Esta toxina es capaz de unirse a glicoproteínas que posean ácido siálico [57] y, debido a esto,

existe una gran cantidad de receptores en distintos tipos celulares que han sido identificados y caracterizados *in vitro* [58] aunque se desconocen los blancos específicos de la misma *in vivo* [30]. Luego de la unión a estos receptores, PT ingresa a la célula por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor y es transportada al aparato de Golgi y luego al retículo endoplásmico [60]. La subunidad A escapa del retículo endoplásmico y se activa en el citoplasma, donde cataliza la transferencia de ADP-ribosa desde una molécula de NAD⁺ a un aminoácido cisteína de la subunidad alfa de proteínas G heterotriméricas. Entre otros efectos, esta modificación interfiere con la capacidad de estas proteínas G inhibitorias de inhibir la adenilato ciclasa del hospedador, por lo que la intoxicación aumenta los niveles de AMP cíclico (cAMP). Además de esto, bloquea otras enzimas y vías cuya regulación depende de las proteínas G [58], [61], lo que conduce a una desregulación de la respuesta inmune. Los neutrófilos, monocitos y linfocitos expresan receptores de quimioquinas acoplados a proteínas G, por lo que el efecto de PT inhibe su migración [62]. Modelos murinos de infección mostraron que la presencia de PT está asociada con una menor producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, una mayor colonización bacteriana en los momentos tempranos de la infección [63], [64] e incluso con una mayor letalidad de la infección [65]. También está involucrada en el mecanismo que induce la tos [66], [67]. Ya que inhibe el reclutamiento de neutrófilos, interfiere con la capacidad de anticuerpos opsonizantes de mediar la eliminación de la bacteria [64]. Se ha descrito también que PT disminuye la expresión de moléculas presentadoras de antígenos [68] y aumenta la expresión de CR3 en macrófagos [69]. El aumento de CR3 promueve la unión de *B. pertussis* a los neutrófilos en un tipo de interacción no bactericida [70] y también de la toxina adenilato ciclasa [71] que intoxica al neutrófilo [72]. La toxina pertussis también se une a células dendríticas e interfiere con la actividad de las mismas reduciendo la respuesta adaptativa y facilitando la reinfección [73].

1.3.1.2. Adenilato ciclasa

La toxina adenilato ciclasa (CyaA) pertenece al grupo de toxinas RTX (del inglés *repeats in toxin*) [74]. Una vez sintetizada, CyaA es modificada mediante palmitoilación y secretada por un sistema de secreción de tipo I [75], [76]. La toxina madura de 1706 residuos aminoacídicos (177 kDa) contiene dos módulos funcionales. Uno es el dominio C-terminal que contiene las repeticiones RTX. Este dominio tiene actividad hemolítica, se une a las células blanco y forma poros selectivos de cationes en la membrana plasmática eucariota, lo

que resulta en la hemólisis de las mismas [77], [78]. Este dominio también media la secreción de la toxina a través de un sistema de tipo I [79]. El otro es el dominio catalítico N-terminal con actividad adenilato ciclasa, cataliza la conversión de ATP citosólico en el segundo mensajero AMP cíclico (cAMP) y se activa por calmodulina [80], [81]. Si bien se observó que esta toxina es capaz de unirse e interactuar con varios tipos celulares, el blanco mejor caracterizado son las células que expresan CR3 en superficie, como los fagocitos profesionales. CyaA se une con gran afinidad al receptor de complemento 3 (también conocido como CR3, CD11b/CD18, integrina $\alpha_M\beta_2$ o Mac-1) expresado por macrófagos, neutrófilos y células dendríticas [71]. La unión de la toxina comienza con una interacción débil con los glicanos asociados a CD11b y sigue con un reconocimiento específico de segmentos particulares de CD11b por el dominio RTX de la toxina [82]. La producción de cAMP inducida por CyaA en neutrófilos humanos inhibe la fagocitosis y el estallido respiratorio favoreciendo la supervivencia bacteriana [72], [83]. En cuanto a la interacción con macrófagos, CyaA induce la desdiferenciación de los mismos a monocitos, bloquea la fagocitosis dependiente del complemento e interfiere con los mecanismos bactericidas dependientes de especies reactivas de nitrógeno en estas células [84], [85], [86]. Estudios recientes llevados a cabo por nuestro grupo demostraron que esta toxina tanto expresada por la bacteria como vehiculizada por las vesículas de membrana externa favorece la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en macrófagos [87], [88]. También se demostró que esta toxina es capaz de suprimir la activación y la quimiotaxis de las células T [89]. En modelos de infección murinos las bacterias deficientes para la expresión de esta toxina se eliminan en menos tiempo que las de la cepa salvaje [90] y utilizando ratones inmunodeficientes y neutropénicos se observó que CyaA tendría un rol relevante en la evasión de la degradación mediada por neutrófilos [91]. Además de la interacción a través de CR3, se observó que CyaA es capaz de unirse con menor afinidad a glicoproteínas y gangliósidos presentes en la superficie de células que no expresan este receptor [92], [93], ingresar a las mismas e intoxicarlas elevando la concentración de cAMP [93], [94].

1.3.1.3. Hemaglutinina filamentosa

La hemaglutinina filamentosa (FHA) es la principal adhesina de *B. pertussis*. Se sintetiza como un precursor de 376 kDa que sufre varias modificaciones hasta generar una proteína madura de 220 kDa de forma fibrilar con 2-4 nm de diámetro y unos 100 nm de longitud altamente inmunogénica [95], [96], [97]. Esta forma madura puede permanecer

asociada a la superficie bacteriana o ser liberada al medio extracelular. El transporte a través de la membrana citoplasmática ocurre mediante un sistema dependiente de péptido señal y de la maquinaria de exporte Sec [95], [97]. Luego, FHA conforma, junto a la proteína accesoria FhaC, un sistema secreción de dos componentes (TPS del inglés *two-partner secretion*) que la transloca a través de la membrana externa [98]. Una vez ubicada en la superficie bacteriana externa, la adhesina permanece allí o puede ser liberada al medio extracelular tras ser escindida por la proteasa SphB1 [99], siendo este proceso bastante importante durante la colonización del hospedador ya que resultados sugieren que *B. pertussis* depende de este factor para diseminar la infección hacia el pulmón [100]. FHA posee al menos cuatro dominios de unión. Uno de estos dominios contiene el triplete Arg-Gly-Asp (RGD, residuos 1097-1099) y promueve la adhesión a células inmunes como macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (PMNs) a través de la interacción con distintas integrinas, entre ellas el receptor de complemento 3 (también conocido como CR3, CD11b/CD18, $\alpha_M\beta_2$, Mac-1) [101], [102], [103]. Este dominio también está involucrado en la invasión de células epiteliales a través de la interacción con la integrina $\alpha_5\beta_1$ (también conocida como VLA-5) [104]. Otro dominio presente en esta adhesina es el dominio de interacción con carbohidratos (CRD del inglés *carbohydrate recognition domain*, residuos 1141 y 1279) que media la adhesión a glicolípidos ricos en lactosa, presentes en células epiteliales ciliadas, y a glicoconjugados ricos en galactosa, presentes en macrófagos [103], [105]. También posee un dominio C-terminal maduro, MCD (del inglés *mature C-terminal domain*, aproximadamente los últimos 500 residuos de este extremo) que mediaría la unión a macrófagos y células epiteliales. Se ha demostrado, en *B. bronchiseptica*, que este dominio está involucrado en la colonización de las vías respiratorias y la modulación de la respuesta inflamatoria en modelos murinos de infección [106]. Por último, también posee un dominio de unión del tipo lectina inhibible por heparina (residuos 442 a 863) que une FHA a proteoglicanos sulfatados y glicolípidos como condroitin sulfato y heparina. Este dominio es responsable de la actividad hemaglutinante de esta adhesina [107], [108], [109]. Resultados obtenidos por nuestro grupo indican que la actividad adhesina de FHA se ve influenciada por la presencia de CyaA en la membrana bacteriana. Cuando CyaA no se encuentra expresada, la interacción de FHA con células epiteliales es menos eficiente pero no se inhibe por la presencia de heparina, sugiriendo que CyaA afecta la actividad del dominio de unión tipo lectina [110]. Estudios posteriores confirmaron la interacción física entre estos dos factores en la membrana bacteriana [111]. Estudios de nuestro grupo demostraron que FHA dirige a *B. pertussis* hacia las balsas lipídicas presentes en las membranas de las células del hospedador [83], [112].

FHA no solo tiene afinidad por el colesterol presente en estas balsas sino también por otros receptores que se concentran en estas balsas [113], [114]. Esta interacción favorece la adhesión, la internalización y la sobrevivencia intracelular de este patógeno [83], [112].

1.3.1.4. Fimbrias

Las fimbrias (Fim), también conocidas como pili de tipo I, son estructuras proteicas de tipo filamentoso conformadas por una subunidad mayor y una menor que se localizan en la superficie bacteriana. *B. pertussis* produce dos serotipos principales de la subunidad mayor (Fim2 y Fim3) que comparten una subunidad menor (FimD) [115]. El gen que codifica para FimD se expresa en el mismo operón que la chaperona FimB y el acomodador FimC necesarios para la biosíntesis de fimbria [116]. Los genes que codifican para Fim2 y Fim3 se ubican en otro sector del cromosoma y son susceptibles de experimentar variación de fase [117]. También se ha descrito otra subunidad mayor alternativa codificada por el gen *fimX* [118] que se expresa en muy bajos niveles *in vitro* [119], pero tiene altos niveles de expresión *in vivo* [120]. Las fimbrias intervienen en la adhesión de *B. pertussis* al epitelio respiratorio mediante Fim2 y Fim3 y a monocitos mediante FimD [121], [122], [123]. También se ha demostrado que interactúan con azúcares sulfatados como heparina, condroitín y dextrano [122] y que FimD interviene en la adhesión de *B. pertussis* no opsonizada a la integrina VLA-5 expresada en la superficie de monocitos provocando la inducción de la expresión de CR3 e incrementando los sitios de unión de CyaA y FHA [121], [124]. Resultados de nuestro grupo demostraron que los anticuerpos anti-Fim no inhiben la adhesión de la bacteria pero poseen una gran actividad aglutinante que interfiere significativamente en la capacidad de *B. pertussis* de adherir a células epiteliales, promoviendo la eliminación de la misma del tracto respiratorio [125]. Esto explicaría la contribución de los anticuerpos contribuyan a la protección contra el patógeno y que la inclusión de Fim en las formulaciones vacunales acelulares determine un aumento en la eficacia de las mismas [126], [127].

1.3.1.5. Sistema de secreción de tipo III

B. pertussis posee un sistema de secreción de tipo III (SST3) denominado Bsc regulado positivamente por el sistema BvgAS [128] y por la disponibilidad de hierro [129]. El SST3 es un aparato secretor especializado que permite a las bacterias Gram-negativas inyectar proteínas efectoras desde el propio citoplasma directamente en el citoplasma de

células eucariotas atravesando las dos membranas bacterianas y la membrana eucariota [130]. Estos efectores suelen ser semejantes a factores eucarióticos involucrados en la transducción de señales e interfieren con las vías de señalización de la célula hospedadora. Ya que *B. bronchiseptica* expresa constitutivamente este sistema, la caracterización del SST3 de *Bordetella* se realizó utilizando este patógeno como modelo. Se encontró que el SST3 de este género inyecta las proteínas efectoras BteA (también conocida como BopC) y BopN a través de un proceso que requiere la formación de un poro en la membrana del hospedador, mediante la actividad de dos proteínas translocadoras denominadas BopB y BopD [131], [132], [133], [134]. Bsp22 actúa de punta del inyectosoma conectando la “aguja” del SST3 con este poro [135]. Luego de la inyección en la célula hospedadora, BteA permanece en balsas lipídicas en la superficie citoplasmática de la membrana celular y desencadena una muerte celular rápida y mediada por mecanismos aún no caracterizados [131], [136], [137], [138], [139]. La proteína BteA de *B. pertussis* exhibe una citotoxicidad bastante menor que la de su homólogo en *B. bronchiseptica* debido a una mutación puntual que probablemente represente una adaptación de *B. pertussis* a hospedadores humanos [140]. Se ha reportado que el otro efector del sistema, BopN, interfiere con la señalización a través del factor NF- κ B y promueve la inducción de la citoquina antiinflamatoria IL-10, perjudicando la respuesta inmune del hospedador [133], [141]. Si bien hasta el momento sólo hay indicios de la que podría ser la actividad del SST3, las cepas con el SST3 inactivo poseen una menor persistencia en las vías respiratorias inferiores de ratas y ratones [142], [143].

El rol de este sistema en la infección de *B. pertussis* continúa siendo una incógnita. En este patógeno tanto los genes que codifican para el sistema como los que codifican factores para su regulación se han conservado a lo largo de la evolución, e incluso los alelos del gen *bteA* son funcionalmente intercambiables entre las especies de *Bordetella* [128], [138]. Sin embargo, no se han esclarecido completamente aún las condiciones en las que este sistema se expresa ni la función que cumple el mismo en la patogénesis de *B. pertussis*, aunque se han publicado resultados que sugieren la expresión del mismo *in vivo* [144]. En este sentido, si bien no se observa actividad relacionada con este sistema en cepas adaptadas al laboratorio, sí se observó la expresión y secreción de la proteína Bsp22 *in vitro* en aislados clínicos [144]. También se ha observado que la mutación del gen *bscN* codificante para una ATPasa, que otorga energía al SST3, determina una eliminación temprana de la bacteria de los pulmones de ratones infectados [144]. Se ha descrito que BtrA regula de forma diferente la expresión de genes del sistema en *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*, lo que podría explicar las diferencias entre la activación del mismo en las dos cepas [145]. La eliminación de *btrA* en *B. pertussis*

activa la secreción del SST3 e induce la expresión de los genes *bopB*, *bopD*, *bopN*, *bsp22*, *bscN* y *bteA* sugiriendo que en este patógeno el sistema sería funcional pero que su expresión estaría bloqueada por el efecto de BtrA[145].

1.3.1.6. Pertactina y otros autotransportadores

La familia de los autotransportadores comprende distintas proteínas funcionalmente diferentes como proteasas, adhesinas, lipasas e invasinas que comparten la característica de dirigir su propia exportación a través de la membrana [146]. *B. pertussis* expresa varias proteínas que pertenecen a esta familia siendo pertactina (Prn) la primera descrita en esta especie [146], [147]. Pertactina es una proteína de membrana externa, de 69kDa, muy inmunogénica y de probada actividad protectora en formulaciones vacunales [148]. Posee un motivo RGD y regiones ricas en prolina y en repeticiones de leucina, dos dominios que podrían estar involucrados en la adhesión a células del hospedador [147], sin embargo, no se podido demostrar que Prn es una adhesina. Estudios de nuestro grupo sugirieron que los anticuerpos generados contra Prn poseen un rol crucial en la protección contra *B. pertussis* debido a que promueven la inmunoeliminación mediada por células a través de su capacidad opsonizante [149], [150]. Estos estudios indicaron, además, que Prn es el único antígeno de las formulaciones vacunales acelulares que induce anticuerpos opsonofagocíticos, resaltando la importancia de la presencia del antígeno en esas vacunas[148], [149]. Pertactina no es una proteína vital, ni está involucrada en la patogénesis. Debido a esto, su presencia en las formulaciones vacunales usadas masivamente llevó, con el paso de los años, a la aparición de cepas con variantes polimórficas de Prn en regiones inmunodominantes primero [151] y a la aparición de cepas defectivas en Prn después [152], [153], [154], [155], [156], [157].

Otros autotransportadores identificados como factores de virulencia en *B. pertussis* son el factor de colonización traqueal TcfA [158], BrkA [159], BapC [160], SphB1 [99]y Vag8 [161]. BrkA y BapC le otorgan a la bacteria cierta resistencia a péptidos antimicrobianos [159], [160] y a la activación de la vía clásica del complemento [159], [160], [162]. Vag8 también ha sido asociado a la evasión de la actividad bactericida del sistema de complemento interviniendo principalmente en la vía clásica y en la vía de las lectinas [163], [164]. Según ya se indicó, SphB1 está implicada en la liberación de FHA al medio extracelular [99].

1.3.1.7. Toxina dermonecrótica

La toxina dermonecrótica (DNT) es una toxina de tipo A-B con un dominio N-terminal de unión a su receptor y un dominio C-terminal enzimático [165], [166]. Posee actividad transglutaminasa y causa la activación constitutiva de GTPasas Rho intracelulares [167], [168]. Estas GTPasas regulan distintos procesos celulares entre los que se pueden nombrar la reorganización del esqueleto y la diferenciación celular, entre otros [169]. La activación de estas GTPasas por DNT provoca la intoxicación celular y la reorganización de los filamentos de actina [170]. Aunque el receptor de DNT no ha sido identificado aún, se sabe que esta toxina es internalizada y activada mediante su escisión por proteasas de la célula eucariota [171]. Si bien DNT no es secretada por bacterias en cultivo y no posee señal típica de exportación [165], no se descarta la posibilidad de que se secrete durante la colonización del hospedador mediante un mecanismo de secreción aún no caracterizado [172], por ejemplo, por vesículas de membrana externa, según resultados recientes de nuestro grupo (Alvarez Hayes, manuscrito en preparación)

1.3.1.8. Cápsula

La cápsula está constituida por una matriz compleja de polisacáridos que rodea a las bacterias y las protege contra eventuales condiciones ambientales desfavorables [173]. Debido a que dota a los patógenos de resistencia contra diversos mecanismos bactericidas del hospedador es considerada un factor de virulencia relevante. Si bien existen reportes que describen a *B. pertussis* como un microorganismo encapsulado [174] y otros que muestran la presencia de una microcápsula intacta en la superficie bacteriana y cuya síntesis se encuentra regulada por el sistema BvgAS [173], continúan hasta hoy las dudas sobre la existencia de la misma y se desconoce el rol que podría cumplir en la patogénesis de *B. pertussis*.

1.3.2 Regulación por el sistema *RisA/RisK*

El sistema Ris (del inglés *regulator of intracellular stress response*) es otro sistema de dos componentes expresado por *Bordetella* y que se encuentra interconectado con el sistema BvgAS. Fue identificado en un estudio de mutagénesis al azar cuyo objetivo era la identificación de genes involucrados en la supervivencia intracelular de *B. bronchiseptica* dentro de células eucariotas [175]. Este sistema está codificado en el locus *risAS* que contiene el

regulador de respuesta RisA y el sensor con actividad quinasa RisS [175]. Este sistema presenta alto grado de identidad de secuencia con el sistema codificado por los genes *ompR-envZ* involucrado en procesos de osmorregulación en *Escherichia coli* [176] y con los genes *phoPQ* involucrados en la activación intrafagosomal de genes de virulencia de *Salmonella* [177], [178]. Se reportó que la expresión del sistema RisAS de *B. bronchiseptica* se induce en localización intracelular y favorece su sobrevivencia [175]. Si bien el gen *risS* de *B. pertussis* posee un corrimiento en el marco de lectura y da lugar a una proteína RisS truncada no funcional, este patógeno expresa una proteína RisA funcionalmente activa [179]. En estudios recientes se identificó al factor RisK como la proteína sensor histidina quinasa encargada de fosforilar a RisA, aunque esta codificada en un gen ubicado en otro operón [180]. La eliminación del gen *risA* en *B. pertussis* induce un defecto en la invasión de células epiteliales [179] y una disminución en la transcripción de los genes *vrg* sugiriendo un rol de RisA en ambos procesos [179], [181]. Se ha propuesto que BvgR podría inhibir la transcripción de los *vrgs* previniendo la unión de RisA a los promotores de los mismos de forma directa compitiendo por la secuencia del promotor, o de forma indirecta uniéndose a RisA. Otro posible mecanismo, por el cual BvgR podría interferir en la actividad de RisA, es a través de la degradación del segundo mensajero diguanilato cíclico (c-di-GMP) necesario para que RisA ejerza su acción sobre los promotores de los *vrgs* [181]. BvgR no se produce en fase avirulenta, permitiendo a RisA la inducción de los genes *vrg*.

1.3.3. Regulación por sistema PlrSR

El sistema de dos componentes PlrSR (del inglés *persistence in the lower respiratory tract*) es otro sistema recientemente caracterizado en *Bordetella* y que también se encuentra relacionado con BvgAS [182]. Este sistema fue caracterizado en *B. bronchiseptica* y sería necesario para mantener la persistencia de esta bacteria en el tracto respiratorio inferior [182]. También se demostró que cepas de *B. pertussis* mutantes defectivas en este sistema tienen una menor persistencia en el tracto respiratorio inferior murino, sugiriendo que en este patógeno el sistema posee un funcionamiento y relevancia similar que en *B. bronchiseptica* [182].

1.3.4. Regulación mediada por la chaperona Hfq

La chaperona Hfq es una proteína de unión a ARN que interviene en la interacción entre ARN pequeños reguladores (*small RNA*) y los ARN mensajeros blanco, afectando la traducción y estabilidad de estos últimos, participando así en la regulación post transcripcional de la expresión de varias proteínas con distintas funciones [183]. Se ha demostrado que Hfq interviene en la regulación de la expresión de factores de virulencia de *B. pertussis* como CyaA, PT, FHA, Vag8, Tcf y de algunos genes del sistema de secreción de tipo III [184], [185], además de estar involucrada en la adaptación a ambientes con baja disponibilidad de hierro [184], [185], [186]. Cepas deficientes en Hfq muestran niveles menores de supervivencia intracelular en macrófagos y menor capacidad de colonización del tracto respiratorio murino, indicando que la regulación ejercida por esta chaperona es relevante para la patogénesis de la bacteria [184], [185], [186].

1.3.5. Citotoxina traqueal

La citotoxina traqueal (TCT) es un factor de virulencia que no se encuentra bajo la regulación del sistema BvgAS. Es un producto resultante de la degradación del peptidoglicano presente en las bacterias Gram-negativas. *Bordetella* libera este producto al medio externo ya que carece de la proteína integral de membrana AmpG, que está presente en otras bacterias Gram-negativas, y recicla el peptidoglicano por transporte al citoplasma [187], [188]. Esta toxina causa disfunción y muerte de células epiteliales ciliadas resultando en la destrucción y extrusión de las mismas de la superficie epitelial [189]. También se postuló que TCT estimula la producción de IL-1 α en células secretoras de mucus *in vivo* y que esto a su vez estimula la expresión de la enzima óxido nítrico (NO) sintetasa. Esto conduciría a una producción elevada de NO que difunde a células ciliadas cercanas intoxicándolas [189], [190]. El NO provoca el agotamiento del hierro intracelular y esto conlleva a la inactivación de enzimas que contienen este metal involucradas en la respiración mitocondrial y en la síntesis de ADN. Como resultado de esta intoxicación celular la unión entre células epiteliales se ve afectada y ocurre la extrusión de las células ciliadas.

1.3.6. Lipooligasacárido

Al igual que otras bacterias Gram-negativas, *B. pertussis* posee lipopolisacárido (LPS) en su membrana externa. Este compuesto constituye una potente endotoxina bacteriana constituida por un lípido A pentaacilado anclado a la membrana externa y unido a un complejo trisacárido central. *B. pertussis* no expresa el antígeno O característico del LPS presente en la mayoría de las bacterias Gram-negativas, lo que determina que el LPS de *B. pertussis* es llamado lipoolisacárido (LOS). La biosíntesis y el ensamblado de esta molécula está codificada en el locus *wlb* compuesto por doce genes y no se encuentra bajo la regulación del sistema BvgAS [191]. El lípido A es la fracción endotóxica principal de esta molécula que es además pirogénica, mitogénica e histaminosensibilizante [192], [193], [194]. También es responsable de la reactogenicidad y efectos adyuvantes de las vacunas celulares contra *B. pertussis*. Cuando entra en contacto con células epiteliales o células inmune induce la expresión de citoquinas proinflamatorias, como IL-1 β , TNF- α , IL-12 e IL-8, conduciendo a la toxicidad sistémica o al “shock inducido por endotoxina” [193]. Se ha descrito que el LOS de *B. pertussis* es detectado de manera menos eficiente por el receptor TLR-4 de ratones que el LPS de *B. bronchiseptica*. Más aún, su estructura sugiere que su capacidad para estimular el receptor TLR-4 humano es muy baja [195]. En base a estas observaciones se propuso que durante la especiación y la restricción de hospedador *B. pertussis* evolucionó de manera tal de minimizar la respuesta inflamatoria facilitando la infección en humanos [195]. La estructura del LOS de *B. pertussis* protege a la bacteria de la proteína surfactante A presente en el epitelio respiratorio [196]. Presumiblemente debido a su conformación particular, determinada por la ausencia de antígeno O, impide la interacción entre la molécula y la proteína, obstaculizando así la eliminación de la bacteria del tracto respiratorio.

1.4. Vacunación

La primera vacuna contra la tos convulsa se introdujo entre 1940 y 1950, y estaba compuesta células enteras de *B. pertussis* en fase virulenta inactivada por calor o tratamientos químicos. Esta vacuna se formuló en conjunto con el toxoide tetánico y diftérico, y se denominó triple bacteriana (DTP por difteria, tétano y pertussis). Esta vacuna resultó efectiva para bajar la incidencia, pero presentó efectos adversos de distinta magnitud como dolor local, fiebre, encefalopatías e incluso se estima que causó la muerte en 1 de cada 310000 personas vacunadas. El principal factor desencadenante de estos efectos adversos es el LOS

de *B. pertussis* presente en estas formulaciones. Las reacciones adversas motivaron una disminución de la aceptación de la vacuna en varios países y en algunos incluso se detuvo la vacunación contra la tos convulsa [197], [198]. Esto condujo a varias epidemias [197], [198] y finalmente al desarrollo de las vacunas acelulares más seguras y formuladas a partir de factores de virulencia purificados de la bacteria. La primera vacuna acelular se desarrolló en la década de 1970 en Japón y estuvo constituida por proteínas de *B. pertussis* copurificadas, principalmente PT y FHA [199], [200]. Luego de esto se desarrollaron distintas vacunas formuladas a partir de antígenos bacterianos purificados individualmente, todas ellas derivadas de una combinación de PT, FHA, Prn, y Fim. En la actualidad los países industrializados utilizan en su mayoría vacunas acelulares denominadas TDPa ya que combinan el toxoide diftérico y tetánico con antígenos purificados de *B. pertussis*. Las vacunas acelulares existentes difieren básicamente en la cantidad de antígenos distintos que poseen. Existen las monovalentes que sólo tienen PT, las bivalentes que poseen PT y FHA, las trivalentes con PT, FHA y Prn y las pentavalentes con PT, FHA, Prn, Fim2 y Fim3. Los estudios epidemiológicos sugieren que las vacunas con tres o más componentes son, generalmente, más eficaces contra casos típicos o con sintomatología leve de tos convulsa que las formulaciones mono o bivalentes [1].

Luego de la introducción a gran escala de las vacunas acelulares se observó un aumento sostenido en el número de casos de tos convulsa que motivó que la enfermedad haya sido declarada reemergente por la Organización Mundial de la Salud. Se ha propuesto que existen varios factores que han contribuido a generar esta reemergencia y, entre ellos, se destacan algunos relacionados con las vacunas actualmente utilizadas. La inmunización con vacunas celulares induce, al igual que la infección natural, inmunidad celular y humoral con un perfil de citoquinas principalmente Th1/Th17. La inmunización con vacunas acelulares genera fundamentalmente inmunidad humoral y un perfil de tipo Th1/Th2 [201], [202], [203], [204]. Estudios de evaluación de la eficacia de las vacunas en humanos indican que las vacunas celulares inducen una mayor protección que las acelulares. Estos estudios indican una eficacia de la vacuna celular próxima al 95% [205], [206], [207], [208] y valores entre el 59% y el 83% para las vacunas acelulares [206], [209], [210]. Asimismo, se observó que las vacunas acelulares protegen contra la sintomatología de la enfermedad, pero brindan menos protección que las vacunas celulares contra la colonización del tracto respiratorio [211], lo que llevó al aumento de infecciones subclínicas y portadores asintomáticos luego de su introducción en los esquemas de vacunación.

Otro factor asociado a la reemergencia de la enfermedad es que la inmunidad por vacunación confiere una protección que decae en el tiempo y, transcurrido un determinado plazo, desaparece en un fenómeno denominado *waning immunity* [212]. La protección inducida por la infección, en cambio, suele ser más duradera [213], [214], [215]. La inmunidad conferida por la vacuna celular comienza a declinar transcurridos entre 3 y 5 años, con la ausencia de anticuerpos circulantes luego de 10 o 12 años [214]. La inmunidad conferida por la vacuna acelular muestra una duración de la protección incluso menor, con ausencia de anticuerpos circulantes luego de entre 4 y 5 años [213], [214]. Esto implica que, aún con esquema de vacunación completo durante la infancia, ya sea con la vacuna celular o la acelular, la población adolescente y adulta no tiene anticuerpos circulantes y tendrá una protección deficiente o nula contra la infección. Sumado a esto, o como consecuencia de esto, la reemergencia de la tos convulsa tiene también su origen en la aparición de cepas con polimorfismos y/o deleciones en los principales antígenos vacunales antígenos vacunales (Prn y PT) [151], [153], [212], [216], sugiriendo una inmunoselección dirigida por vacunación [151]. Se ha demostrado que estos cambios en las cepas circulantes no aparecieron como consecuencia de la adquisición de nuevos genes ni expansión clonal de una cepa mutante, sino que se trata de pequeños cambios genéticos que se produjeron en forma independiente y progresiva en pasos sucesivos durante un período de 40 años [151] en poblaciones vacunadas, con continua circulación de la bacteria. Relevamientos realizados en Argentina demostraron que las cepas circulantes en la población presentan las mismas variaciones polimórficas que las encontradas en otros en regiones inmunodominantes de PT y Prn, los principales antígenos presentes en las vacunas acelulares [217], apoyando la hipótesis de que estas variantes han aparecido por inmunoselección dirigida por vacunación [217], [218].

Las estrategias de vacunación contra *B. pertussis* tienen como objetivo principal proteger a los infantes y neonatos, en quienes la enfermedad es más severa pudiendo provocar incluso la muerte. Se ha demostrado que una importante fuente de contagio de los mismos son adultos y adolescentes en los que la protección por vacunación ha decaído y cursan infecciones asintomáticas y, según *The Global Pertussis Initiative*, un comité de seguimiento epidemiológico de la enfermedad conformado por expertos de distintos países, la vacunación de adolescentes y adultos reduce el riesgo de contagio a infantes no inmunizados o con esquemas de vacunación incompleto además de reducir la incidencia de la enfermedad [219]. Esto motivó que desde hace algunos años se hayan aprobado e impulsado el uso de formulaciones vacunales acelulares denominadas Tdap para adolescentes y adultos. La principal diferencia entre la vacuna Tdap y la DTPa usada para infantes es que la primera

posee menores cantidades de toxoide diftérico y de antígenos de *B. pertussis*. Además de esto, se impulsó la inmunización con Tdap durante el embarazo a fin de evitar el contagio del recién nacido y con el beneficio de conferir protección contra la tos convulsa en los recién nacidos a mediante anticuerpos maternos transferidos a través de la placenta [220], [221], [222].

La inmunización contra la tos convulsa en Argentina comenzó en la década de 1960 [223] y en la actualidad, al igual que en la mayoría de los países en vías de desarrollo, se utiliza la vacuna celular administrada junto con el toxoide tetánico y diftérico (DTP), el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HB) y el polisacárido de *Haemophilus influenzae* serotipo b (Hib) conformando la vacuna pentavalente. El Calendario Nacional de Vacunación estipula que la misma se aplica en tres dosis administradas a los 2, 4 y 6 meses de edad con un primer refuerzo con la denominada vacuna cuádruple bacteriana conformada con los antígenos de difteria, tétanos, pertussis y *H. influenzae* a los 18 meses. Por último, se administra un segundo refuerzo a la edad de ingreso escolar (entre los 5 y los 6 años) con la vacuna DTP. En el año 2009 se amplió el esquema de vacunación incluyendo una inmunización con Tdap a los 11 años de edad basándose en los fundamentos de reducción de la incidencia y la circulación en adolescentes en los que la protección ya decayó y que pueden contagiar a infantes no inmunizados como se describió. Además de esto, se incorporó la vacunación obligatoria con la vacuna Tdap a embarazadas a partir de la semana 20 de gestación, a personal de salud que está en contacto con menores de 1 año y a familiares de bebés prematuros a fin de reducir el contagio y la morbimortalidad en menores de 6 meses de edad [223]. Estas dosis adicionales también tienen como objetivo fomentar la denominada inmunidad de rebaño (*herd immunity*) que detiene la propagación de una enfermedad contagiosa dentro de una población cuando una proporción suficientemente alta de la misma es inmune a la enfermedad. Los estudios indican que la introducción del refuerzo con la vacuna Tdap durante el embarazo disminuyó la tasa de mortalidad por tos convulsa en Argentina [223].

Según se mencionó previamente en esta sección, las vacunas acelulares protegen contra la enfermedad, pero no evitan la colonización del tracto respiratorio por *B. pertussis* ni la transmisión de la enfermedad [211], permitiendo la circulación del patógeno en la población y la existencia de portadores asintomáticos que constituyen fuentes de contagio. Otro de los objetivos de la vacunación regular de adultos y adolescentes es controlar esta transmisión. Si bien esta medida pueda contribuir a disminuir la incidencia de la enfermedad, posiblemente no logre erradicarla de la población ya que persiste el problema de base, es

decir, la falta de protección contra la colonización. Esto determina que la búsqueda de nuevos inmunógenos y/o nuevas formulaciones vacunales que protejan eficientemente contra la infección por *B. pertussis* continúe siendo prioritaria, para lo cual se torna indispensable el ampliar el conocimiento existente acerca de la patogénesis, del fenotipo infectante y del ciclo infeccioso de este patógeno.

Varias estrategias han sido consideradas a lo largo de los últimos años para el desarrollo de una nueva generación de vacunas contra la tos convulsa. Entre ellas, se ha propuesto la adición de nuevos antígenos a las formulaciones acelulares actuales y la repolarización de la respuesta Th1/Th2 del hospedador por una del tipo Th1/Th17 con inducción de inmunidad celular, necesarios para generar una inmunidad protectora [211], [224], [225]. Se ha propuesto inducir esta repolarización mediante el remplazo del adyuvante aluminio (que induce perfil Th2) por otro adyuvante o por nuevos antígenos que induzcan una respuesta Th1/Th17. Incluso se ha planteado la reintroducción de las vacunas celulares ya sea como inmunización primaria o como refuerzo que modifique la polarización de la respuesta inmune del hospedador [226]. Recientemente se ha propuesto una estrategia de vacunación alternativa basada en la inmunización con una cepa viva atenuada de *B. pertussis* denominada BZE1 en la cual las toxinas TCT y DNT están delecionadas y la actividad tóxica de PT eliminada por dos mutaciones que no afectan sus propiedades inmunogénicas [227]. Estudios en modelos murinos y en primates no humanos indicaron que la inmunización en una dosis con BPZE1 induce protección efectiva contra la colonización nasal y contra la enfermedad [228], [229]. Estudios clínicos de fase 1 mostraron que dosis de entre 10^3 y 10^9 UFC de BPZE1 son toleradas e inducen respuesta humoral contra varios antígenos de *B. pertussis* y una respuesta celular de tipo Th1 [230], [231], [232]. Ensayos de fase 2b sugieren que una administración nasal de BPZE1 es segura, induce una respuesta IgA robusta y sostenida contra *B. pertussis*, y protege de la colonización frente a una infección desafío con BPZE1 [233]. Estos resultados deben ser confirmados en ensayos de fase 3 y debe tenerse en cuenta, además, que por tratarse de una bacteria atenuada no está clara la dinámica de propagación que podría generarse ni cómo podría controlarse una eventual reversión a la virulencia. Otra estrategia de vacunación que se ha propuesto es la utilización como candidato vacunal de las vesículas de membrana externa (OMV del inglés *outer membrane vesicles*) derivadas de *B. pertussis* [234]. Estas vesículas serían más seguras que las vacunas celulares actuales debido a su menor contenido de LOS [235].

Siguiendo este objetivo de identificar nuevos inmunógenos protectores, nuestro grupo logró identificar mediante técnicas de proteómica comparativa combinada con

inmunoproteómica dos antígenos expresados en limitación de hierro, un fenotipo similar al fenotipo infectante [236]. Estos antígenos se denominan AfuA e IRP1-3 y los estudios demostraron que ambas proteínas son capaces de inducir anticuerpos opsonizantes, que la inmunización monovalente con los mismos induce protección contra la infección por *B. pertussis* y que, además de esto, el agregado de ambos antígenos a las formulaciones actuales mejora la protección de las mismas [237], [238], [239]. Actualmente ambos antígenos se encuentran en etapas de evaluación preclínica en ensayos con primates no humanos.

1.5. Epidemiología

Se ha observado en países con altas tasas de vacunación un cambio en la epidemiología de la tos convulsa, registrándose un aumento en la incidencia de la enfermedad en adolescentes y adultos que, según se mencionó, han perdido la inmunidad conferida por vacunación [240]. Esto se evidencia por las proporciones de casos en pacientes mayores de diez años de edad relevados por la agencia estadounidense CDC (*Center for Disease Control*) que aumentaron de 15,1% en 1970 a 26,9% en 1990 y 49% en 2000 [241].

Previo al desarrollo de las vacunas las epidemias por tos convulsa ocurrían a nivel mundial presentando patrones cíclicos con picos de incidencia cada 2 a 5 años, afectando principalmente a niños, quienes representaban la mayor fuente de transmisión [242]. Los adultos, por su parte, recibían refuerzos naturales por exposición repetida a la bacteria. Los infantes recién nacidos poseían anticuerpos adquiridos de su madre a través de la placenta y se tornaban vulnerables una vez que los niveles de los mismos descendían. Estos hechos determinaron que la tos convulsa constituya una de las mayores causas de mortalidad infantil en todo el mundo. La introducción de la vacuna celular entre los años 1940 y 1950 implicó una drástica disminución en la incidencia de la enfermedad y, como consecuencia de la vacunación masiva a nivel mundial, la circulación de *B. pertussis* disminuyó considerablemente [243], [244], determinando que los adultos y adolescentes dejen de recibir el refuerzo de la inmunización por exposición al patógeno. Sin embargo, aunque con menor incidencia, continuaron los picos epidémicos cíclicos típicos de acumulación de casos en susceptibles. Esa fue la primera indicación que la vacunación masiva no detenía la circulación. Luego resultó evidente que la vacuna (en ese tiempo la formulación celular) protegía principalmente contra los síntomas de la enfermedad, pero no prevenía la colonización [245], [246], [247]. Con la introducción de la vacuna acelular, con un repertorio antigénico menor e inductora de inmunidad casi exclusivamente humoral, la situación

empeoró. Fue esto lo que condujo a un aumento en el número de casos en adolescentes y adultos casi sin título de anticuerpos circulantes y, consecuentemente, en neonatos en contacto con hermanos mayores y que no reciben adecuada inmunización pasiva por parte de la madre. Desde entonces la población de adolescentes y adultos infectados constituyen un reservorio importante de *B. pertussis* [248], [249] y son la fuente principal de transmisión del patógeno para lactantes e infantes con esquemas de vacunación incompletos [250], [251], [252], [253]. Luego, los resultados del modelo de infección en babuinos demostraron que la inmunización con la vacuna acelular protege contra los síntomas severos de la enfermedad, pero no previene la infección ni la transmisión de *B. pertussis* entre individuos [211] según se mencionó previamente. Mas aún, en este modelo los individuos vacunados con vacuna acelular mantienen un estado de infección asintomática más prolongado que los individuos infectados por primera vez (*naive*) o los vacunados con vacuna celular [211]. Estos resultados muestran claramente que el tipo de inmunidad inducida por las formulaciones vacunales no es adecuada para controlar este patógeno.

La situación epidemiológica Argentina no difiere considerablemente de la del resto del mundo, aunque, debido a la falta de notificación obligatoria, no fue completamente advertida durante años. Nuestro grupo estuvo involucrado en el relevamiento de la tos convulsa en el país desde 2002. En ese momento se organizó el relevamiento epidemiológico de la enfermedad y la búsqueda de casos sospechosos a través del Ministerio de Salud de la Nación. Este relevamiento permitió detectar un incremento sostenido en el número de casos reportados. En 2005 se detectó un importante brote en la provincia de Neuquén [218] cuyos principales afectados fueron niños menores de 6 meses con esquemas incompletos de vacunación, aunque también se observó un incremento en el número de casos en adultos y adolescentes [218]. De acuerdo con el Ministerio de Salud, se produjeron otros brotes en 2011 y 2016. El primero tuvo una incidencia de 6,9 cada 100.000 habitantes y una tasa de letalidad del 2,6% mientras que el segundo tuvo una incidencia del 3,9 cada 100.000 habitantes con una letalidad del 0,6%. Se especula que la disminución de la incidencia máxima y de la tasa de letalidad puede deberse a la implementación de la inmunización maternal obligatoria con Tdap adoptada en 2012 [254]. También se reportaron en el país, al igual que en se describió para otros, cepas circulantes en la población con variaciones polimórficas con respecto a la cepa vacunal en regiones inmunodominantes de los antígenos vacunales [217].

1.6. Patogénesis

Durante la colonización del epitelio respiratorio ocurre una compleja serie de eventos entre los que se incluyen la adhesión del patógeno, la evasión de las defensas del hospedador, la proliferación bacteriana que suele conducir al daño tisular e incluso a una eventual invasión de las células del hospedador y la persistencia del patógeno en su interior. El desarrollo de estos eventos surge como resultado de la interacción de los factores de virulencia del patógeno con las células del hospedador. La infección en el caso particular de *B. pertussis* comienza con la adhesión de la bacteria a las células epiteliales ciliadas de tráquea y nasofaringe. Existen varios factores regulados por BvgAS que han sido señalados como potenciales adhesinas (FHA, Fim, PT, TcfA, BrkA, Vag8 y Prn) pero numerosos estudios han reportado que la más relevante en fase virulenta es FHA [101], [102], [103], [105]. En estas etapas tempranas de la colonización ocurre la inducción de pérdida de movimiento de las cilias de las células denominado ciliastosis. Este fenómeno junto a la acumulación de mucus y el daño al epitelio dificulta la eliminación del patógeno. El daño experimentado por las células epiteliales locales se debe a las toxinas TCT, DNT, CyaA y al LOS [169], [255], [256], [257]. Se ha propuesto que la expresión de la proteasa SphB1 promovería la escisión de FHA anclada a la membrana bacteriana facilitando la dispersión de *B. pertussis* desde las microcolonias iniciales hacia nuevos sitios de infección en el tracto respiratorio inferior [100]. La tos paroxística, síntoma característico de la enfermedad, es consecuencia del daño tisular local, aunque el período de duración de la misma suele ser mayor que el del daño tisular, sugiriendo que existen otros factores aún no identificados que contribuyen a la persistencia de la misma. Modelos de infección murinos sugieren que la misma es originada por los efectos de PT, LOS, y Vag8 [66], [67].

Se ha propuesto, asimismo, que *B. pertussis* es capaz de formar *biofilms* como un mecanismo de patogénesis que favorece la persistencia en el hospedador [258], [259]. El *biofilm* consiste en una comunidad de células de un microorganismo inmovilizadas adheridas a una superficie y/o unas a otras embebidas en una matriz polimérica extracelular (denominada EPS del inglés *exopolysaccharides*) que les confiere resistencia [260]. La capacidad de formar *biofilms* suele contribuir a la patogénesis, desempeñar un rol relevante en la evasión de los mecanismos inmunes, y podría participar en la persistencia a largo plazo en el interior del hospedador. Los aislados clínicos de *B. pertussis* poseen una capacidad incrementada de formar *biofilms* comparadas con las cepas de referencia [261], [262]. Estudios recientes han mostrado evidencia de la formación de *biofilms* en modelos epiteliales

ex vivo [263] y en la cavidad nasofaríngea de modelos murinos [264], [265]. Según los resultados obtenidos *in vitro* el desarrollo de *biofilm* de *B. pertussis* está regulado por el sistema BvgAS [266].

El éxito de este patógeno de difícil erradicación se debe en buena medida a los múltiples mecanismos de inmunoevasión que posee, muchos de ellos mediados fundamentalmente por CyaA y PT. Por ejemplo, CyaA provoca la intoxicación de neutrófilos, las principales células de defensa contra patógenos invasores, induciendo la producción supra fisiológica de cAMP en los mismos e interfiriendo con su capacidad fagocítica, su activación y su actividad bactericida intra y extracelular [72], [83], [267], [268]. PT por su parte, retarda la migración de los neutrófilos al sitio de infección mediante la disminución en la producción de citoquinas y quimioquinas en células epiteliales y macrófagos, además de inhibir la activación de células inmunes [64]. Estas toxinas son capaces de intoxicar macrófagos e interferir con sus funciones inmunes [84], [85], [86], [269], [270]. También se demostró que TCT es capaz de inhibir la quimiotaxis de neutrófilos *in vitro* [255]. Los efectos combinados de estas toxinas posibilitan que *B. pertussis* evada la inmunidad innata durante etapas tempranas de la colonización.

Bordetella pertussis es un patógeno estrictamente humano sin reservorio ni vector por fuera del hombre [16], [271], por lo que la epidemiología de la tos convulsa evidencia una circulación permanente del patógeno en poblaciones vacunadas. Históricamente se ha considerado un patógeno extracelular que supuestamente es eliminado del hospedador siete días después de comenzada la infección ya que no hay cultivos positivos después de este tiempo. Sin embargo, *B. pertussis* ha sido encontrada en macrófagos alveolares aislados de niños coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [272] y en infantes con neumonía provocada por *B. pertussis* [21], sugiriendo que este tipo celular podría constituir un reservorio de esta bacteria, y que *B. pertussis* no es un patógeno extracelular estricto. La necesidad de una respuesta tanto humoral como celular para combatir la infección parece apoyar esta hipótesis. La existencia de un reservorio intracelular explicaría la epidemiología de esta enfermedad, y la ineficacia de vacunas diseñadas para patógenos exclusivamente extracelulares. Nuestro grupo de investigación se dedicó a lo largo de los últimos años al estudio de eventuales nichos intracelulares de persistencia de este patógeno, a aspectos referidos a la invasión y a la supervivencia de *B. pertussis* en células del hospedador. Esto permitió demostrar que, en ausencia de anticuerpos opsonizantes, *B. pertussis* es capaz de sobrevivir a la interacción con neutrófilos mediante la inhibición del estallido respiratorio y del tráfico a lisosomas [83]. También se observó que esta inhibición depende de que la

adhesión e internalización ocurra a través de dominios ricos en colesterol denominados balsas lipídicas en la membrana del neutrófilo con los cuales *B. pertussis* interacciona mediante FHA [83]. *B. pertussis* también es capaz de inhibir, a través de CyaA, mecanismos bactericidas extracelulares del neutrófilo como la degranulación [83] y la formación de trampas extracelulares de ADN (NETs del inglés *neutrophil extracellular traps*) [267]. En interacción innata *B. pertussis* también es capaz de evadir la acción bactericida de los macrófagos, otra célula efectora del sistema inmune. Nuestro grupo demostró que este patógeno es capaz de inhibir la fusión fagolisosomal y permanecer viable en compartimientos con características de endosomas tempranos en los que tiene acceso a nutrientes extracelulares [273]. También se avanzó en el estudio de la adaptación de *B. pertussis* al entorno intracelular en estas células mediante un abordaje proteómico [274] y se describieron factores relevantes en este proceso y para la sobrevivencia intracelular [87], [186], [274]. Asimismo, a lo largo de estos años se pudo demostrar que CyaA y PT están involucradas en la inhibición de la fusión fagolisosomal en macrófagos ya que interfieren con la transcripción de genes relacionados con la respuesta inflamatoria y bactericida del macrófago, favoreciendo la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* [87]. Se observó que la modulación de la respuesta bactericida por estas toxinas induce un fenotipo del tipo M2 [87]. Está descrito que la polarización de los macrófagos entre los fenotipos M1 y M2 juega un rol relevante en el desarrollo de las enfermedades infecciosas [275]. Mientras que el fenotipo proinflamatorio M1 desarrolla una actividad bactericida más agresiva, el fenotipo M2 se caracteriza por un rol antiinflamatorio y una mayor permisividad para la sobrevivencia intracelular [275]. En estudios posteriores pudimos corroborar que *B. pertussis* efectivamente tiene una mayor sobrevivencia intracelular en el fenotipo M2 y que además es capaz de sobrevivir también en el interior de macrófagos M1 [276].

La localización intracelular le proporciona a *B. pertussis*, como a cualquier patógeno, protección contra distintos efectores inmunes del hospedador. Durante la respuesta proinflamatoria desencadenada como respuesta a la infección, un nicho intracelular permite a la bacteria permanecer viable hasta que la inflamación sea modulada y emerger en condiciones más permisivas., infectar otros nichos, e incluso alcanzar otros sitios del hospedador que sin ser transportada por macrófagos no podría alcanzar, propagando la infección en un mecanismo del tipo caballo de Troya [277].

1.7. Inmunidad

Para desarrollar inmunidad frente a un patógeno se requiere el reconocimiento de componentes del mismo por células de la inmunidad innata, la producción de mediadores solubles y el reclutamiento y la activación de moléculas y células efectoras. El estudio de la inmunidad contra *B. pertussis* se llevó a cabo utilizando principalmente modelos de infección respiratoria en ratones [278]. Los resultados utilizando estos modelos deben ser analizados cuidadosamente ya que el síntoma de la tos, prototípico de la enfermedad, está ausente en la mayoría de los mismos y algunos hallazgos patológicos pulmonares son diferentes a los observados en humanos [279]. Sin embargo, el curso de la infección y muchos de los efectos sistémicos de la tos convulsa como la leucocitosis y la hipoglucemia son similares a los que se observan en humanos [280]. Además de esto, los mecanismos inmunes que se inducen en ratones infectados coinciden con los que se inducen en humanos infectados [279]. Al ser colonizada la mucosa del tracto respiratorio murino por *B. pertussis* se desencadena una respuesta local de citoquinas proinflamatorias que conduce al reclutamiento de células inmunes al sitio de infección [281], [282]. Los neutrófilos suelen ser las primeras células en llegar, seguidos de una ola compuesta de células *natural killer* (NK), macrófagos, células dendríticas (DCs) y linfocitos [283], [284], [285], [286]. Sin embargo, como se describió previamente, algunos factores de virulencia de *B. pertussis* limitan esta respuesta inflamatoria local. Por ejemplo, se mencionó que las toxinas PT y TCT inhiben el tráfico de células inmunes al tracto respiratorio [64], [287]. Además de esto, CyaA y FHA inducen la secreción de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 que limitan la respuesta local [288], [289], [290]. Eventualmente *B. pertussis* es reconocida en el tracto murino por células presentadoras de antígenos que la capturan y procesan y presentan antígenos de la misma a células T, induciendo de esta forma la generación de una respuesta inmune adaptativa [224].

Se ha descrito que tanto la inmunidad celular como la humoral juegan un rol importante en la eliminación de la bacteria del tracto respiratorio [224]. La inmunidad celular contra la infección por este patógeno está mediada principalmente por linfocitos T CD4⁺ [291], [292]. De acuerdo al perfil de citoquinas que expresan, estas células T se dividen principalmente en células T *helper* tipo 1 (Th1) y células T *helper* tipo 2 (Th2) [293], [294]. Las del perfil Th1 secretan IFN- γ e IL-12 y son esenciales para el desarrollo de la inmunidad mediada por células necesaria para la eliminación de patógenos intracelulares [295]. Las células Th2, por su parte, juegan un papel más importante en el desarrollo de la respuesta humoral mediada por anticuerpos y se caracterizan por la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13

[295]. Otro perfil existente entre las células T *helper* es el denominado Th17 caracterizado por la secreción de las citoquinas IL-17, IL-12 e IL-22 y por estar involucrado en la respuesta inflamatoria del hospedador frente a distintos patógenos extracelulares [296]. Varios estudios han demostrado un rol importante de las células Th1 en la protección contra *B. pertussis* en modelos murinos [297], [298], [299]. También se ha relacionado la protección contra *B. pertussis* con la generación de células Th17 [300], [301]. En estudios posteriores se observó que también son necesarias las denominadas células T CD4 residentes de memoria (TRM del inglés *tissue resident memory T cells*) en nasofaringe y en pulmón [302]. Estudios llevados a cabo en babuinos confirmaron la necesidad de una inmunidad mediada por células T y de un perfil Th1/Th17 en la protección contra la infección [211], [225]. En babuinos *B. pertussis* desarrolla una enfermedad similar a la observada en humanos, con tos persistente por semanas y transmisión entre individuos. La colonización del tracto respiratorio y la leucocitosis que ocurre en humanos también aparece en babuinos [211], [225], por lo que este modelo se está empleando para confirmar los hallazgos más importantes de la fisiopatología de esta bacteria y para realizar pruebas preclínicas de nuevas vacunas. Varios estudios sugieren la inducción de una respuesta tipo Th1 y Th17 también en humanos infectados [279], [303]. La necesidad de un perfil Th1/Th17 para la eliminación de *B. pertussis* del tracto respiratorio parece consistente con una ubicación tanto intracelular como extracelular del patógeno durante el ciclo infeccioso [224].

En lo que refiere a la inmunidad adquirida por vacunación, el tipo de respuesta generada varía con el tipo de vacuna utilizada. Estudios en modelos de inmunización murinos indican que la protección conferida por la vacuna celular involucra la activación del receptor TLR4 y la producción de IL-1, IL-12 e IL-23 por células dendríticas, conduciendo a un perfil tipo Th17 junto con uno Th1. En cambio, la inmunización con vacunas acelulares induce la producción de IL-5 y anticuerpos IgG₁, determinando de esta manera un perfil tipo Th2 [300]. Los estudios de inmunización en el modelo babuino indicaron que los animales infectados o inmunizados con la vacuna celular generan una respuesta robusta de células Th1/Th17 específica contra *B. pertussis*, mientras que los inmunizados con la vacuna acelular presentaron una respuesta de tipo Th1/Th2 [211]. Se observó incluso que los animales no vacunados resuelven la infección más rápido que los animales vacunados con la vacuna acelular, quienes mantienen bacterias en la cavidad nasofaríngea durante mucho tiempo más que los no vacunados [225]. Estos hallazgos confirman que la vacuna acelular protege contra los síntomas de la enfermedad, pero es aún menos efectiva que la vacuna celular en la prevención de la colonización. Mas aún, se ha observado que los individuos inmunizados con

la vacuna acelular tardan más tiempo en resolver una eventual infección, a causa del tipo de respuesta que se induce en el vacunado frente a la infección del patógeno. En humanos, por su parte, el estudio de la respuesta de células T obtenidas de infantes inmunizados con vacunas celulares o acelulares sugiere que estas vacunas inducen diferentes subpoblaciones de células T CD4⁺. Al igual que la infección, las vacunas celulares inducen un perfil de citoquinas predominantemente Th1/Th17, mientras que las vacunas acelulares inducen un perfil de tipo Th1/Th2 [202], [203], [204].

En cuanto a la inmunidad humoral, distintos estudios demuestran que la presencia de anticuerpos contra *B. pertussis* cumple un rol fundamental en la protección contra la infección [126], [127]. Los anticuerpos dirigidos contra determinados antígenos de *B. pertussis* tienen la capacidad de prevenir la adhesión a células epiteliales respiratorias, neutralizar toxinas o promover la opsonofagocitosis. En este sentido, se demostró que los anticuerpos contra PT son críticos para proteger contra la sintomatología de la enfermedad [126]. Estudios de nuestro grupo indican que la opsonización es crucial para inducir la actividad celular bactericida contra el patógeno tanto en neutrófilos como en macrófagos y que, en ausencia de anticuerpos opsonizantes, *B. pertussis* es capaz de sobrevivir dentro de células inmunes del hospedador [83], [273]. Como se mencionó anteriormente, de todos los antígenos incluidos en las vacunas acelulares, Prn es el único que induce anticuerpos con actividad opsonofagocítica [150], lo que ha llevado a la aparición de aislados clínicos defectivos en Prn, con prevalencia creciente alrededor del mundo [153], [154], [156], y a la necesidad de definir nuevos antígenos blancos de opsoninas menos susceptibles a la inmunoselección [236], [239]. En lo referente a la prevención de la adhesión inicial a epitelio, los anticuerpos anti-FHA son los más importantes [304], [305]. Además, nuestro grupo demostró que los anticuerpos dirigidos contra fimbria no bloquean epitopes adhesivos, pero tienen la capacidad de inducir la aglutinación bacteriana entorpeciendo el proceso de adhesión y promoviendo así la expulsión del patógeno [125].

En síntesis, una respuesta protectora contra *B. pertussis* requiere tanto de inmunidad humoral como celular. Los factores de virulencia del patógeno y su capacidad para evadir la respuesta inmune del hospedador explican la necesidad de anticuerpos bloqueantes de la adhesión, neutralizantes de toxinas y opsonizantes. Por otro lado, el hallazgo de que *B. pertussis* es un patógeno intracelular facultativo explica la necesidad de inmunidad celular con perfil Th1/Th17.

1.8. Epitelio respiratorio

El sistema respiratorio humano se divide en el tracto respiratorio superior que comprende la cavidad nasal, la faringe y la laringe; y el tracto respiratorio inferior que comprende la tráquea, bronquios, bronquiolos y alvéolos. La tráquea, bronquios y bronquiolos forman la zona de conducción, también denominada tracto conductivo, donde el aire inhalado es humedecido, calentado y limpiado antes que alcance la zona de respiración formada por los alvéolos, donde ocurre el intercambio gaseoso y se oxigena la sangre. El tracto respiratorio inferior que comienza en la tráquea sufre una ramificación dicotómica que genera dos bronquios, que se ramifican sucesivamente para dar lugar a series de bronquios y bronquiolos. El diámetro del tracto respiratorio decrece progresivamente desde la tráquea hasta los bronquiolos terminales, que conectan con los alvéolos [306], [307].

La superficie luminal del tracto respiratorio está cubierta por una capa continua de células epiteliales de distintos tipos que varían en abundancia relativa según el sitio. La zona traqueo-bronquial de conducción está delimitada por un epitelio pseudoestratificado compuesto principalmente de tres tipos celulares: células ciliadas, células secretoras no ciliadas y células basales. En la medida en que los bronquiolos se ramifican en la transición hacia los alvéolos el epitelio cambia gradualmente de uno pseudoestratificado a uno simple cuboidal y el número de células ciliadas y basales decrece mientras que se vuelven más abundantes las células de Clara (*club cells*) no ciliadas [308]. Los alvéolos están recubiertos con dos tipos de células denominadas células alveolares de tipo 1 y alveolares de tipo 2 (AT1 y AT2 del inglés *alveolar type 1* y *2* y también conocidas como neumocitos de tipo 1 y 2). Las células AT1 proveen la superficie para el intercambio gaseoso y las células AT2 secretan una sustancia denominada surfactante pulmonar [309]. Otros tipos celulares están presentes en menores cantidades en el tracto respiratorio. Se trata de las células quimiosensoras o cepillo (*brush* en inglés) que contienen manojos de microvellosidades (*microvilli*) y se cree que cumplen un rol en la regulación de la secreción de fluidos además de en la respiración [310], [311] y las células neuroendócrinas pulmonares que poseen una forma piramidal que se extiende desde la base del epitelio hasta el lumen y también poseen microvellosidades [312], [313]. Las células ciliadas constituyen más de la mitad del tracto conductivo [314]. Poseen entre 200 y 300 cilios formados en su superficie luminal [315] y una gran cantidad de mitocondrias justo debajo de esta superficie que proveen energía para el movimiento ciliar coordinado (*ciliary beating*) [316]. Se cree que estas células ciliadas se encuentran terminalmente diferenciadas y que se originan a partir de las células basales o de las

secretorias [317], [318]. Las células caliciformes (*goblet cells*) son células secretorias no ciliadas que se encuentran en una relación de aproximadamente 1 cada 5 células ciliadas. En la región apical de su citoplasma poseen gránulos con glicoproteínas de alto peso molecular que forman la mucina. Estas glicoproteínas son secretadas al lumen respiratorio y captura y remueven partículas foráneas protegiendo la superficie epitelial. La secreción de mucina debe estar precisamente regulada para que el funcionamiento sea normal, ya que la sobreproducción de la misma puede bloquear el conducto e interferir con la limpieza mucociliar (*mucociliary clearance*) [316]. Las células basales están conectadas a la membrana basal a través de hemidesmosomas, proveyendo la base para la unión de las células ciliadas y de las células caliciformes a la lámina basal y también poseen la capacidad de regular la respuesta inflamatoria y el movimiento transepitelial acuoso [319]. La característica más importante de estas células es la capacidad de generar los tipos celulares más abundantes del tracto conductivo, por lo que se especula que sean las células progenitoras del epitelio respiratorio [320], [321], [322], [323]. Las células de Clara poseen gránulos secretorios que secretan proteínas surfactantes y anti-proteinasas que pueden proteger el epitelio bronco-alveolar [324], [325], [326], [327]. Han sido históricamente consideradas células pluripotenciales debido a su habilidad de proliferar y repoblar los bronquiolos terminales [328]. Además, poseen la capacidad de diferenciarse a células ciliadas y caliciformes, aunque sólo se ubican en los bronquiolos terminales y no en las vías aéreas más proximales, sugiriendo que su función podría estar más relacionada con el mantenimiento de los bronquiolos más distales [329].

Además del intercambio gaseoso, otra función primaria del epitelio respiratorio es constituir una barrera física entre el ambiente externo y el interno del humano. La función principal de esta barrera es proteger el ambiente interno del hospedador de patógenos y partículas foráneas dañinas. Existen esencialmente tres componentes de esta barrera que contribuyen a esta función. Ellos son la función de limpieza mucociliar que atrapa partículas y patógenos y los remueve de las vías respiratorias [330], las uniones intercelulares estrechas y adherentes que regulan la permeabilidad paracelular del epitelio [331] y los compuestos antimicrobianos secretados que eliminan patógenos inhalados [332].

Como lo indica su nombre, los principales factores implicados en la función mucociliar son el mucus y los cilios. Mientras el mucus atrapa e inmoviliza patógenos y otras partículas inhaladas, el movimiento coordinado de los cilios los desplaza alejándolos de los pulmones hacia la faringe [333]. La eficiencia de este desplazamiento depende del movimiento ciliar y de la hidratación del mucus, que determina las propiedades viscoelásticas

del mismo [334], [335]. El mucus es secretado por las células caliciformes y contiene más de 200 proteínas, de las cuales las principales son las mucinas, glicoproteínas de alto peso molecular que proporcionan la estructura del mucus mediante uniones de entrecruzamiento (*cross-linking*) entre ellas [336]. Al menos 12 mucinas distintas han sido detectadas en pulmones humanos, siendo MUC5A y MUC5B las predominantes [337]. En individuos sanos la secreción de mucus está regulada por el ritmo circadiano a través del nervio vago y la hipersecreción de mucus está asociada con la obstrucción de las vías respiratorias en pacientes con enfermedades inflamatorias [338]. Esta hipersecreción se induce por varios compuestos inflamatorios como TNF- α , IL-1 β , IL-13, IL-17, la proteína elastasa de los neutrófilos, factores de crecimiento como EGF y TGF, factores ambientales como humo de cigarrillos, alérgenos y patógenos microbianos [339], [340], [341], [342], [343], [344].

Las uniones estrechas y las uniones adherentes se localizan en la zona apicolateral del epitelio respiratorio y cooperan entre sí para mantener, al igual que en otros tejidos epiteliales, la permeabilidad paracelular [331]. Las uniones adherentes median la adhesión entre células y promueven la formación de las uniones estrechas, que regulan el transporte de iones y solutos a través del epitelio y previenen la difusión libre de componentes de la membrana plasmática, delimitando una zona apical y una basolateral con composiciones diferenciales [345], [346], [347]. Por ejemplo, determinados factores como la acuaporina-3 [348], la ATPasa dependiente de sodio y potasio [349] y proteoglicanos derivados de heparán sulfato [350], entre otros, están en mayor concentración en la membrana basolateral, [351]. Por su parte, otros factores como Gp135 [352] están enriquecidos en la membrana apical. También se han identificado algunas señales que direccionan el tráfico intracelular de las proteínas hacia una u otra membrana [351], [353].

En el epitelio respiratorio normal estas uniones intercelulares previenen que patógenos y partículas inhaladas generen daño, y también constituyen plataformas de señalización que regulan expresión génica, proliferación celular y diferenciación [354], [355]. Debido a esto es que las lesiones que afectan estas uniones no sólo comprometen la función de barrera, sino que también interfieren con la reparación y diferenciación del epitelio respiratorio. La formación de estos complejos de uniones está íntimamente relacionada con la polarización celular que posee dos principales reguladores descritos en el epitelio respiratorio. Se trata del complejo Crumbs (CRB) y el complejo de división defectuosa de homólogos PAR (del inglés *partitioning defective*) [356].

Las uniones estrechas están compuestas de varias proteínas transmembrana entre las que se incluyen ocludina, múltiples claudinas, la proteína de unión JAM (del inglés

junctional adhesion molecule) y las proteínas de andamiaje citoplasmático zonula ocludens 1, 2 y 3, cingulina y MUPP1 formando microdominios o balsas lipídicas [357], [358], [359]. Las proteínas transmembrana conectan las membranas de células adyacentes para formar un cierre compacto y las proteínas de andamiaje anclan estas proteínas transmembranas al citoplasma. Las uniones adherentes se localizan debajo de las uniones estrechas y conectan mecánicamente las células adyacentes. Las principales proteínas en estas uniones son las glicoproteínas transmembrana de tipo I, la cadherina epitelial (E-cadherina), β -catenina y α -catenina [360], [361].

Las células epiteliales también secretan una amplia gama de compuestos antimicrobianos como enzimas, inhibidores de proteasas, oxidantes, y péptidos antimicrobianos que constituyen una barrea bioquímica contra patógenos invasores. Entre ellos, la enzima lisozima ejerce su efecto antimicrobiano degradando el peptidoglicano de la pared bacteriana [362]. Las β defensinas humanas (hBD) son los péptidos antimicrobianos más abundantes del epitelio respiratorio y son efectivas contra un amplio espectro de patógenos bacterianos y virales [363], [364]. Mientras hBD1 se expresa constitutivamente, hBD2, hBD3 y hBD4 se expresan en respuesta al LPS [365], [366]. Los humanos también expresan LL37, un antimicrobiano perteneciente a la clase de las catelicidinas, que es una al LPS bacteriano e inactivan su función biológica [316]. Otro mecanismo de defensa ejecutado por las células epiteliales es la producción de oxidantes como óxido nítrico (NO) y peróxido de hidrógeno a través de las NO sintasas NOS1, NOS2 y NOS3 y la oxidasa dual respectivamente [316].

Además de la función de barrera, el epitelio es capaz de censar directamente la presencia de patógenos y juega un rol crucial en la promoción y el moldeado de la respuesta inmune frente a los mismos. Como respuesta a la presencia de patógenos, las células epiteliales secretan quimiocinas y citoquinas como IL-6, IL-8, IL-1 β , GM-CSF y G-CSF, que reclutan y activan células fagocíticas del sistema inmune [367]. Existen macrófagos y células T localizadas en el epitelio respiratorio (denominadas residentes) que participan en el montaje de la respuesta a través del intercambio de señalizaciones entre sí y con células epiteliales (*cross-talk*). En esta respuesta inmune también se induce una señalización paracrina que activa células epiteliales cercanas, activándolas y convirtiéndolas también en efectores de la respuesta tendiente a limitar la dispersión de la infección [368].

Parte del conocimiento de la interacción de *B. pertussis* con el epitelio respiratorio proviene de estudios con modelos de infección en animales. Estos modelos permiten evaluar la interacción únicamente de manera general y en el contexto de la infección del organismo.

Es por esto que la interacción de este patógeno con el epitelio respiratorio en particular también ha sido estudiada utilizando modelos de infección *in vitro* con líneas celulares para obtener información más detallada acerca de los mecanismos moleculares que intervienen en la misma. Estos estudios han utilizado líneas celulares inmortalizadas de origen traqueal [369], [370], bronquial [93], [281], alveolar [104], [112], [371] y también modelos de cultivos primarios establecidos a partir de muestras nasales [257], bronquiales [257], [263], [372] y traqueales [257], [372]. Se observó que *B. pertussis* es capaz de adherir y de acceder a localización intracelular en modelos nasales [257], traqueales [369] y bronquiales [257] sugiriendo que este patógeno podría colonizar cualquier zona del tracto conductivo. Estos resultados coinciden con reportes de casos fatales de tos convulsa en humanos y de infecciones en babuinos en los que se observa la presencia de *B. pertussis* en tráquea, bronquios y bronquiolos [21], [373]. A pesar de que también se observó que *B. pertussis* adhiere y es internalizada por células de origen alveolar *in vitro* [104], [371], en los estudios de humanos y babuinos no se detectó la presencia de la bacteria en alvéolos. Además, se detectó que *B. pertussis* es capaz de formar *biofilms* en modelos de cultivos primarios a partir de células bronquiales [263]. Los estudios *in vitro* infectando modelos respiratorios con cepas mutantes han confirmado que FHA es la principal adhesina involucrada tanto en la adhesión como en la invasión en células epiteliales [104], [112], [304], [305].

Los estudios llevados a cabo para caracterizar la respuesta de las células epiteliales a la infección por *B. pertussis* demostraron que se induce una respuesta inflamatoria débil, caracterizada por la secreción de valores bajos de IL-6 e IL-8 [281], [372]. La secreción de otros factores relacionados con el montaje de la respuesta inmune sólo se induce si existe un intercambio de señales (*cross-talk*) con células inmunes presentes en el sitio de infección [372]. Se demostró que CyaA purificada intoxica las células epiteliales aumenta su concentración de cAMP [93], [94], [257], esta intoxicación interfiere con el montaje de la respuesta inflamatoria, y también compromete la integridad de las uniones estrechas [93] y la adhesión entre las células [374].

1.9. Antecedentes y objetivos de este trabajo

A pesar de las altas tasas de vacunación contra la tos convulsa a nivel global, esta enfermedad no ha sido erradicada. Mas aún, su incidencia ha aumentado en los últimos años y ha sido declarada reemergente por la Organización Mundial de la Salud. Teniendo en cuenta que el humano es el único hospedador conocido para *B. pertussis*, la situación epidemiológica indica que la bacteria ha desarrollado mecanismos que le permiten persistir en poblaciones vacunadas. El desarrollo de estrategias más eficaces para la prevención de la enfermedad requiere conocer los mecanismos de persistencia del patógeno y esto ha determinado que en los últimos años los mismos hayan sido objetivo de estudio de varios grupos de investigación, incluido el nuestro.

En los últimos años se ha encontrado evidencia de que patógenos previamente considerados extracelulares son capaces de alternar estadios intracelulares en distintos tipos de células durante sus procesos infecciosos [375], [376], [377]. En el caso particular de *B. pertussis*, nuestro grupo y otros [83], [87], [150], [184], [273], [371], [378], [379], [380] han demostrado durante los últimos años la capacidad de esta bacteria de comportarse como un patógeno intracelular facultativo. Los resultados de nuestro grupo indicaron que *B. pertussis* es capaz de inhibir la fusión fagolisosomal en macrófagos y neutrófilos, permitiéndole sobrevivir en localización intracelular en estas células inmunes [83], [273]. En el caso de los macrófagos, también avanzamos en la caracterización de distintos factores relevantes para el establecimiento del nicho intracelular. Los resultados indican que la actividad inmunomoduladora de las toxinas CyaA y PT sobre la respuesta bactericida de esta célula promueven la sobrevivencia de la bacteria dentro de estas células inmunes [87]. El estudio de la adaptación del proteoma de *B. pertussis* al entorno intracelular en macrófagos permitió identificar, además, otros factores implicados en este proceso como los transportadores BfrD, BfrE, IRP1-3 y MgtC [274], [381]. Si bien son relativamente pocos los estudios abordando particularmente la interacción entre *B. pertussis* y células epiteliales, hay resultados que demuestran la capacidad de este patógeno de sobrevivir en localización intracelular en células del epitelio respiratorio [371]. En estos estudios iniciales se observaron niveles de internalización extremadamente bajos, pero igualmente se recuperaron unidades formadoras de colonias a tiempos largos post infección, indicando que *B. pertussis* también es capaz de sobrevivir en localización intracelular en células epiteliales. Estos estudios se llevaron a cabo en modelos de infección con células de línea cultivadas en subconfluencia, sin polarización ni uniones estrechas formadas, de manera tal que no poseen varias de las características más

relevantes de la barrera epitelial que encuentra *B. pertussis* durante la infección en humanos. Por otro lado, los estudios más recientes realizados con modelos polarizados no abordaron el estudio de la adhesión, ni del eventual establecimiento y desarrollo de infecciones intracelulares [93], [263], [372]. Las células de la barrera epitelial, junto a las del sistema inmune, son los tipos celulares con los que interactúa *B. pertussis* en las etapas iniciales de colonización, y las que determinarán el destino de la infección. Es por esto que este Trabajo de Tesis tuvo como objetivo profundizar el estudio de la interacción inicial de la bacteria y el desarrollo de la infección intracelular con células epiteliales que han retenido características de las células primarias que les dieron origen y utilizando un modelo de cultivo polarizado con uniones estrechas formadas que represente con mayor precisión la barrera epitelial respiratoria con la que interactúa *B. pertussis* durante el proceso infeccioso.

A modo de resumen, en el Capítulo 3 de esta Tesis se describen estudios destinados a la obtención de un modelo epitelial con células polarizadas con uniones estrechas formadas para ser empleado en el estudio de la interacción de *B. pertussis* con el epitelio respiratorio. Los resultados de la infección de este modelo indican que *B. pertussis* es capaz de vulnerar la integridad de las uniones estrechas a través de un mecanismo mediado por CyaA. Se encontró que *B. pertussis* interactúa de manera preferencial con la membrana basolateral a través de FHA, y que es internalizada con mayor eficiencia a través de la misma. Los resultados muestran que una vez internalizadas, una fracción importante de las bacterias evaden el tráfico lisosomal degradativo y permanecen viables en vesículas con características de endosomas tardíos en las que poseen acceso a nutrientes extracelulares. Tomados en conjunto, estos resultados indican que el efecto de CyaA y el acceso a la membrana basolateral promueve la infección intracelular y la persistencia de *B. pertussis* en células epiteliales a tiempos largos, indicando que este tipo celular podría constituir un nicho de persistencia. Teniendo esto en cuenta, se profundizó el estudio de la adaptación de *B. pertussis* al entorno intracelular mediante el análisis de la evolución del proteoma de la bacteria en localización intracelular en este modelo de infección epitelial. El Capítulo 4 describe los resultados obtenidos de este análisis proteómico. Los resultados del mismo muestran que *B. pertussis* modifica la abundancia principalmente de proteínas relacionadas al metabolismo, induciendo una desaceleración general del mismo y sugiriendo que las bacterias en localización intracelular podrían adquirir un fenotipo de tipo persistor que le permite mantenerse viable en localización intracelular. No se observó un aumento en la abundancia de factores previamente descritos como relacionados con la adaptación al entorno intracelular en macrófagos y se verificó, mediante ensayos de tráfico y sobrevida

intracelular, que *B. pertussis* no los necesita para la sobrevivencia intracelular en células epiteliales, evidenciando la existencia de diferencias entre ambos nichos intracelulares. En conjunto, los resultados de este trabajo de Tesis sugieren que las células de la barrera epitelial respiratoria podrían ser un nicho más permisivo y tal vez más relevante para el proceso infeccioso de *B. pertussis* que el previamente descrito en macrófagos. Finalmente, en el Capítulo 5 se presenta la discusión general de este trabajo de Tesis.

Capítulo 2

Materiales y métodos

2. Materiales y métodos

2.1. Cepas y condiciones de cultivo

Para este trabajo de Tesis fueron utilizadas las cepas de *Bordetella pertussis* Tohama I y las cepas isogénicas BpGR4 [382] y Bp Δ CyaA [85] Bp Δ MgtC [381] deficientes en FHA, CyaA y el factor MgtC respectivamente. También se utilizó la cepa Bp Δ BfrDE Δ IRP1-3 generada en nuestro laboratorio y que tiene eliminados los transportadores de hierro BfrD, BdrE e IRP1-3. Las cepas de *B. pertussis* fueron cultivadas en placas de agar Bordet Gengou (ABG) (Difco Laboratories, EE. UU.), suplementada con 15% v/v de sangre desfibrinada de carnero (Laboratorio Argentino, Caseros, Argentina) (ABGs) durante 72 h a 37°C. Al cabo de este tiempo se repicó en una nueva placa ABGs y se cultivó a 37°C durante 24 h. Para los ensayos de infección, se extrajo un inóculo del cultivo en medio sólido ABGs de *B. pertussis* para iniciar cultivos en medio líquido Stainer-Scholte (SS) [383] con una densidad celular inicial equivalente a DO₆₅₀ (densidad óptica a 650 nm) 0,2 y se cultivó a 37 °C y 160 rpm durante 16 h (mitad de fase exponencial). Previo a la infección, las bacterias fueron lavadas y resuspendidas en el medio de cultivo empleado para la infección.

2.2. Anticuerpos y sueros

Los anticuerpos empleados se describen a continuación. Fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con Cy3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE. UU.), fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC (Jackson ImmunoResearch), fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con Alexa-647 (Jackson ImmunoResearch), fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con Cy3 (Jackson ImmunoResearch), suero de conejo anti-*B. pertussis* obtenido según se describe según Hellwig y col. [70], anticuerpos monoclonales IgG1 de ratón anti CD107b (LAMP-2) humano (Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU.), anticuerpos monoclonales IgG1 de ratón anti-catepsina D (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.), anticuerpos monoclonales IgG1 de ratón anti-occludina humana (Invitrogen, Waltham, MA, EE. UU.), anticuerpos monoclonales IgG1 de ratón anti-claudina-1 (Invitrogen) y anticuerpos monoclonales IgG1 de ratón anti caveolina-1 (Pharmingen).

2.3. Cultivo celular y polarización

En el presente estudio se utilizó la línea celular de neumocitos humanos tipo II A549 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EE. UU.) y la línea celular 16HBE14o-derivada de células epiteliales bronquiales normales inmortalizadas por transfección con el genoma del virus SV40 defectivo en el origen de replicación [384] (cedidas gentilmente por el Dr. Dieter Gruenert, Universidad de San Francisco, California).

Las células A549 fueron cultivadas a 37 °C en una atmósfera humidificada de aire con CO₂ al 5% (v/v), en botellas con medio simple modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL, Grand Island, EE. UU.) suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) inactivado. Para la polarización en cultivo sumergido, 5x10⁵ células fueron cultivadas en placas de cultivo de 24 pocillos (*wells*) sobre cubreobjetos en medio DMEM-SFB a 37°C y CO₂ al 5% (v/v), con renovación de medio cada dos días. Este número inicial de células utilizado (5x10⁵) determina que al inicio del cultivo el mismo ya se encuentre en condiciones de confluencia. Transcurridos 5, 7 y 9 días de cultivo se evaluó la formación de uniones estrechas por tinción de ocludina según se describe en [385]. Brevemente, las muestras de células cultivadas sobre en cubreobjetos fueron lavadas, fijadas con paraformaldehído (PFA) (Sigma, Saint Louis, MO, EE. UU.) 4% (p/v), lavadas con PBS e incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente con PBS conteniendo 50 mM de NH₄Cl (Sigma). Luego de esto se permeabilizaron por incubación con PBS conteniendo Triton X-100 (Sigma) al 0,1% (v/v) y seroalbúmina bovina (BSA) al 0,2% (p/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente e incubados durante la noche con anticuerpos de ratón anti-occludina humana en presencia de Triton X-100 y BSA. Luego de lavarlas con PBS conteniendo Triton X-100 y BSA, las células fueron incubadas con fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-ratón conjugados a Cy3. Luego, las células fueron lavadas y los cubreobjetos fueron montados con líquido de montaje *antifading* y analizados mediante microscopía de fluorescencia con un microscopio de escaneo láser confocal (modelo TCS SP5; Leica, Alemania). Para la polarización en cultivo con interfase aire-líquido en membranas semipermeables, 5x10⁵ células A549 se cultivaron en insertos semipermeables de 12 mm de diámetro Transwell® (poro de 3 µm; Corning Costar, Bodenheim, Alemania) con DMEM-SFB en el compartimiento basal y en el apical con renovación de medio cada dos días durante siete días a 37°C y CO₂ al 5% (v/v). Al séptimo día se eliminó el medio del compartimiento apical y se mantuvo el medio en el compartimiento basolateral durante dos

días. Transcurrido este tiempo se evaluó la integridad de las uniones estrechas por tinción de ocludina según se describió previamente en esta sección.

Las células 16HBE14o- fueron cultivadas según se describió en [384] a 37 °C en una atmósfera humidificada de aire con CO₂ al 5% (v/v) en botellas de cultivo tratadas con colágeno (Sigma) en medio MEM (Gibco) suplementado con 10% (v/v) de SFB (MEM-SFB) inactivado. Para la polarización en monocapas confluentes, 5x10⁵ células fueron inoculadas en placas de cultivo de 24 pocillos tratadas con colágeno en medio MEM-SFB a 37°C con renovación de medio cada dos días. Este número inicial de células utilizado (5x10⁵) determina que al inicio del cultivo el mismo ya se encuentre en condiciones de confluencia. Transcurridos 3, 5 y 7 días de cultivo se evaluó la formación de uniones estrechas por tinción de ocludina según se describe en [385] y previamente en esta sección para las células A549. La formación de uniones estrechas también se verificó por tinción de claudina utilizando el mismo protocolo de tinción con anticuerpos de ratón anti-claudina humana. Para la polarización en pequeños grupos o islas, 5x10³ células fueron inoculadas en placas de cultivo de 24 pocillos tratadas con colágeno y cultivadas como se describió para las monocapas. El grado de polarización de las islas fue monitoreado transcurridos 7 días de cultivo por tinción de ocludina según se describió previamente en esta sección. Todos los ensayos de infección se realizaron con células polarizadas durante 7 días en forma de islas o monocapas siguiendo el protocolo aquí descrito.

2.4. Ensayos de adhesión e internalización

Para los ensayos de adhesión e internalización, células 16HBE14o- polarizadas según se describió en la sección previa en forma de islas o monocapas sobre cubreobjetos y fueron incubadas con *B. pertussis* en MEM suplementado con BSA al 0,2% (p/v) con una multiplicidad de infección (MOI) de 20 bacterias por célula. En algunos ensayos, las células fueron incubadas con BpGR4 con una multiplicidad de infección de 200 bacterias por célula. Transcurridas 5 h a 37 °C en 5% (v/v) de CO₂, muestras de células infectadas se lavaron con PBS para remover las bacterias no adherentes y se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4% (p/v) para su posterior tinción. Las células se lavaron con PBS, se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con PBS conteniendo 50 mM de NH₄Cl y se trataron con BSA al 0,2% (p/v) en PBS para bloquear posibles uniones inespecíficas. Las bacterias adheridas a la superficie celular y las internalizadas por la célula fueron discriminadas por un procedimiento de tinción en dos pasos y posterior análisis por microscopía de fluorescencia

según se describe en [273]. Brevemente, las bacterias extracelulares fueron teñidas por incubación de las células con suero de conejo anti-*B. pertussis* por 30 min a temperatura ambiente, seguido de la incubación con fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-igG de conejo conjugados con FITC por otros 30 min a temperatura ambiente. Para determinar el número de bacterias intracelulares, luego de dos lavados con BSA al 0,2% (p/v) en PBS, las células fueron permeabilizadas con saponina al 0,1% (p/v) y BSA al 0,2% (p/v) en PBS por 30 min. Luego de esto, las células se incubaron con suero de conejo anti-*B. pertussis* por 30 min a temperatura ambiente con saponina al 0,1% (p/v) y BSA al 0,2% (p/v) en PBS, seguido de la incubación con fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-igG de conejo conjugados con Cy3 por otros 30 min a temperatura ambiente, también con saponina al 0,1% (p/v) y BSA al 0,2% (p/v) en PBS. Los núcleos se tiñeron por incubación con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 1 µg mL⁻¹ durante 5 min a temperatura ambiente y posteriormente lavadas con PBS. Luego, los cubreobjetos fueron montados con líquido de montaje *antifading* y analizados por microscopía de fluorescencia con un microscopio de escaneo láser confocal (modelo TCS SP5; Leica, Alemania). En todos los experimentos se examinaron un mínimo de 100 células eucariotas.

En determinados ensayos, las bacterias fueron pre incubadas durante 15 minutos con 35 µg mL⁻¹ de heparina (Sigma) en MEM+BSA y esta suspensión fue utilizada como inóculo para la infección de las células que se realizó en presencia de heparina y procesó según fue descrito en esta sección. En los ensayos en los que se indica, las células fueron pre incubadas durante 60 minutos con 35 µg mL⁻¹ de nistatina (Sigma) previo a la infección con *B. pertussis*. En este caso, el inóculo se preparó en MEM+BSA también en presencia de nistatina y la infección se realizó en presencia de nistatina y procesó según fue descrito en esta sección.

En determinados ensayos, células 16HBE14o- polarizadas en monocapas sobre cubreobjetos se incubaron con la cepa salvaje de *B. pertussis* o con Bp ΔCyaA a una multiplicidad de infección de 0,2 bacterias por célula en MEM-SFB a 37°C en presencia de 5% (v/v) de CO₂. Transcurridas 24 horas las células fueron lavadas con PBS para remover las bacterias no adherentes y se fijaron en PFA 4% (p/v). Las células se lavaron con PBS, se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con PBS conteniendo 50 mM de NH₄Cl y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% (v/v) y BSA al 0,2% (p/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se incubaron durante la noche con anticuerpos de ratón anti-occludina humana en presencia de Triton X-100 y BSA. Luego de esto, las bacterias se tiñeron por incubación de las células con suero de conejo anti-*B. pertussis* por 30 min a

temperatura ambiente en presencia de Triton X-100 y BSA. Luego de lavarlas con PBS conteniendo Triton X-100 y BSA, las células fueron incubadas con fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-ratón conjugados a Cy3 y fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-igG de conejo conjugados con FITC. Luego, las células fueron lavadas y los cubreobjetos fueron montados con líquido de montaje *antifading* y analizados mediante microscopía de fluorescencia con un microscopio de escaneo láser confocal (modelo TCS SP5; Leica, Alemania). En estos ensayos se calculó la tasa de organización de las uniones estrechas (TiJOR del inglés *Tight Junction Organization Rate*) utilizando un macro de ImageJ [386] para evaluar la ruptura de las uniones estrechas. El valor de TiJOR se calculó evaluando series de imágenes obtenidas por microscopía confocal.

2.5. Cultivo e infección en membranas semipermeables

Para la infección en membranas semipermeables, 5×10^5 células 16HBE14o- se cultivaron en insertos semipermeables Transwell® de 12 mm (diámetro de poro de 3 μm , Corning Costar, Bodenheim, Alemania) tratados con colágeno y se polarizaron durante 7 días sumergidas en medio MEM-SFB con cambio de medio cada dos días tanto en la cámara apical como en la basal. En este momento se evaluó la resistencia transepitelial (TER) con un voltámetro Millicell ERS-2 (Millipore, Billerica, MA, USA). Las monocapas mostraron valores de TER de aproximadamente $350 \Omega \cdot \text{cm}^2$ tras 7 días de cultivo. Las monocapas se incubaron con la cepa salvaje de *B. pertussis* y con la mutante isogénica defectiva en CyaA, Bp Δ CyaA, ambas a una multiplicidad de infección de 2 bacterias por célula en MEM suplementado con BSA al 0,2% (p/v) durante 5 h a 37 °C en 5% (v/v) de CO₂. A las 5 post infección se tomaron muestras de los compartimientos basal y apical y se lavaron las células para remover las bacterias no adherentes y se incubaron con medio de cultivo hasta las 24 horas, momento en que se repitió la toma de muestra de ambos compartimientos. Se realizaron diluciones seriadas a partir de las muestras de 5 y 24 horas y se inocularon en placas ABGs para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC).

2.6. Tráfico intracelular y colocalización

El tráfico intracelular se evaluó por microscopía confocal según se describió previamente [273]. Brevemente, células 16HBE14o- polarizadas sobre cubreobjetos fueron incubadas con *B. pertussis* o las cepas mutantes isogénicas defectivas en factores

determinados según se aclara en cada sección a una multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula. La incubación se realizó en MEM suplementado con BSA al 0,2% (p/v) durante 4hs a 37°C y en presencia de 5% CO₂. Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas tres veces con PBS para remover las bacterias no adherentes e incubadas durante una hora con sulfato de Polimixina B (Sigma) en una concentración de 100 µg mL⁻¹ en MEM-SFB, para eliminar las bacterias extracelulares. Luego de esto, la concentración de Polimixina B fue reducida a 5 µg mL⁻¹ hasta el final del ensayo. Muestras de células a 5 y 48 horas post infección fueron lavadas con PBS, fijadas con PFA 4%, lavadas nuevamente con PBS e incubadas por 10 min a temperatura ambiente con NH₄Cl 50 mM en PBS. Luego de esto, fueron tratadas con BSA 0,2% (p/v) en PBS para bloquear posibles uniones inespecíficas. Para la detección de las bacterias extracelulares adheridas en la superficie, las células fueron incubadas con suero de conejo anti-*B. pertussis* por 30 min a temperatura ambiente, seguido de la incubación con fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-igG de conejo conjugados con FITC por otros 30 min a temperatura ambiente. Para determinar el número de bacterias intracelulares y la colocalización con los marcadores, luego de dos lavados con BSA al 0,2% (p/v) en PBS, las células fueron incubadas con saponina al 0,1% (p/v) y BSA al 0,2% (p/v) en PBS por 30 min. Luego de esto, las células se incubaron con anticuerpo monoclonales de ratón anti-LAMP-2 (CD107b) humano y suero de conejo anti-*B. pertussis* o con anticuerpos monoclonales de ratón anti-catepsina D humana y suero de conejo anti-*B. pertussis* por 30 min a temperatura ambiente con saponina al 0,1% (p/v) y BSA al 0,2% (p/v) en PBS. Luego de lavarlas con saponina al 0,1% (p/v) y BSA al 0,2% (p/v) en PBS, las células fueron incubadas con fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-igG de conejo conjugados con Cy3 y fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-igG de ratón conjugados con Alexa-647 por otros 30 min a temperatura ambiente también diluidos en saponina al 0,1% (p/v) y BSA al 0,2% (p/v) en PBS. Luego de esta incubación las células fueron lavadas con BSA al 0,2% (p/v) en PBS, los cubreobjetos fueron montados con líquido de montaje *antifading* y analizados mediante microscopía confocal de fluorescencia con un microscopio de escaneo láser confocal (modelo TCS SP5; Leica, Alemania). En todos los experimentos se examinaron un mínimo de 100 células eucariotas.

Para los ensayos de adquisición de transferrina, la infección se llevó a cabo como se describió para el tráfico intracelular. Transcurridas 5 y 48 horas post infección las células fueron deplecionadas de transferrina mediante tres lavados y la posterior incubación en medio MEM conteniendo 1% (p/v) de BSA durante 10 min a 37°C. Transcurrido ese tiempo las células fueron incubadas con 10 µg mL⁻¹ de transferrina conjugada con Alexa-594

(Molecular Probes, Eugene, OR, EE. UU.) durante 30 min en medio MEM conteniendo 1% (p/v) para saturar la endocitosis inespecífica. Finalmente, las células fueron lavadas y fijadas en PFA 4% (p/v). Las bacterias extracelulares e intracelulares fueron teñidas y analizadas por microscopia confocal de fluorescencia como se describió en esta sección.

Para los ensayos de colocalización con caveolina, células 16HBE14o- polarizadas en monocapas sobre cubreobjetos se incubaron con *B. pertussis* a una multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula en MEM-SFB a 37°C en presencia de 5% (v/v) de CO₂. Transcurridas 5 horas las células fueron lavadas con PBS para remover las bacterias no adherentes y se fijaron en PFA 4% (p/v). Las células se lavaron con PBS, se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con PBS conteniendo 50 mM de NH₄Cl, se lavaron nuevamente y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% (v/v) en presencia de gelatina al 0,4% (p/v) para bloquear uniones inespecíficas. Luego se incubaron durante la noche con anticuerpos de ratón anti-caveolina humana en presencia de Triton X-100 y gelatina. Luego de esto, las bacterias se tiñeron por incubación de las células con suero de conejo anti-*B. pertussis* por 30 min a temperatura ambiente en presencia de Triton X-100 y gelatina. Luego de lavarlas con PBS conteniendo Triton X-100 y gelatina, las células fueron incubadas con fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-ratón conjugados a Cy3 y fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-igG de conejo conjugados con FITC. Luego, las células fueron lavadas y los cubreobjetos fueron montados con líquido de montaje *antifading* y analizados mediante microscopia confocal de fluorescencia como se describió en esta sección.

En todos los casos, el análisis de colocalización se llevó a cabo utilizando ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y el plugin “view5D” (<https://nanoimaging.de/View5D/>) para la determinación manual. Para cada fagosoma se generaron los histogramas de los canales rojo y verde y se estableció colocalización positiva cuando se superponían los picos de los dos histogramas. En la Figura A se muestra un ejemplo donde se observa la interfaz del programa y la superposición de la señal de los canales.

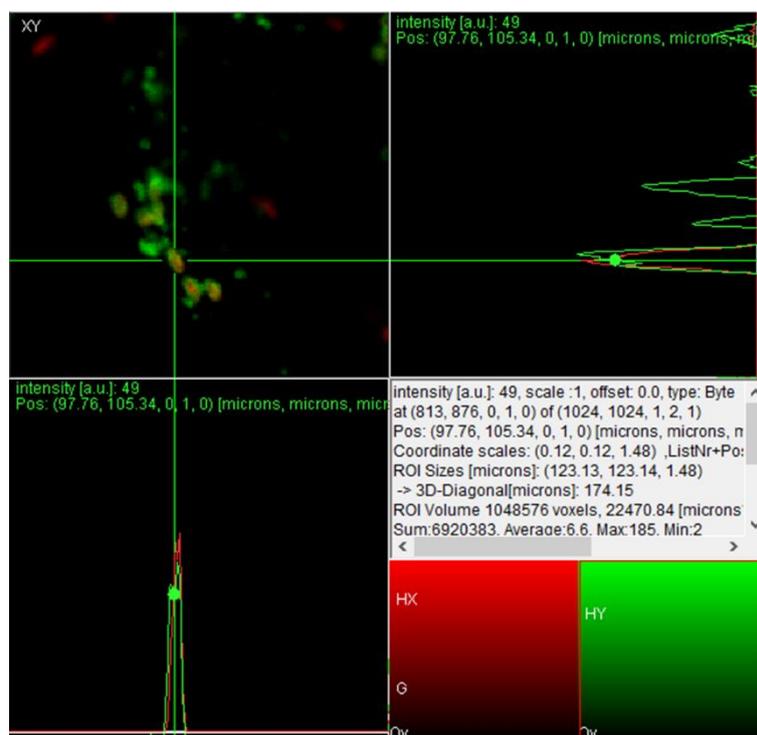


Figura A. Análisis de colocalización. Se muestra la interfaz del plugin “View5D” mostrando la colocalización de una bacteria (rojo) con el marcador con LAMP-2 (verde) determinada por la superposición en los picos de los histogramas de ambos colores.

2.7. Determinación de las bacterias viables por hibridación fluorescente *in situ*

Los estudios de hibridación fluorescente *in situ* fueron realizados según se describió previamente [387]. Brevemente, células 16HBE14o- polarizadas sobre cubreobjetos fueron incubadas con *B. pertussis* a una multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula en MEM suplementado con BSA al 0,2% (p/v) durante 4hs a 37°C y en presencia de 5% CO₂. Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas tres veces con PBS para remover las bacterias no adherentes e incubadas durante una hora con Polimixina B en una concentración de 100 µg mL⁻¹ en MEM-SFB para eliminar las bacterias extracelulares. Luego de esto, la concentración de Polimixina B fue reducida a 5 µg mL⁻¹ hasta el final del ensayo. Cuarenta y ocho horas luego de la infección las células fueron incubadas con LysoTracker DND-99 (Molecular Probes) durante 15 min a 37°C, lavadas y fijadas en PFA 4% (p/v). Se empleó una sonda de hibridación conjugada a Alexa488 EUB338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') diseñada para rRNA de bacterias [388]. La sonda non-EUB338 fue utilizada como control negativo [388]. La capacidad de detectar una bacteria en esta técnica depende de la cantidad de copias de ARN ribosomal, que son degradadas rápidamente luego de morir y que, debido a

esto, pueden ser utilizadas para determinar el estado fisiológico de la bacteria. Para la hibridación, las sondas fueron agregadas a una concentración final de 10 nM en buffer de hibridación sobre las células fijadas. Este buffer contiene NaCl 0,9 M, Tris/HCl pH 7.4 20 mM, dodecilsulfato de sodio (SDS) 0,01% (v/v) y formamida al 35% (v/v). La hibridación se llevó a cabo por 2 horas a 46°C en cámara húmeda, seguida por un lavado de 30 min a 48°C. El buffer de lavado contiene NaCl 80 mM, Tris/Hcl pH 7.4 20 mM, SDS 0,01% (v/v), formamida al 35% (v/v) y EDTA (pH 8) 5 mM. Las células fueron montadas en portaobjetos con líquido de montaje *antifading* y el análisis microscópico se llevó a cabo con un microscopio láser de escaneo confocal (modelo TCS, SP5; Leica).

2.8. Determinación de la sobrevida intracelular

Para la determinación de la sobrevida intracelular se realizaron ensayos de protección al antibiótico polimixina B según se describió en [273]. Brevemente, células 16HBE14o-polarizadas según se describió previamente fueron incubadas con la cepa salvaje de *B. pertussis* o con las mutantes defectivas para los factores indicados en cada sección a una multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula. La incubación se realizó en MEM suplementado con BSA al 0,2% (p/v) durante 4 horas a 37°C y en presencia de 5% CO₂. Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas tres veces con PBS para remover las bacterias no adherentes e incubadas durante una hora con Polimixina B en una concentración de 100 µg mL⁻¹ en MEM-SFB para eliminar las bacterias extracelulares. Luego de esto, la concentración de Polimixina B fue reducida a 5 µg mL⁻¹ hasta el final del ensayo. Para los controles de adhesión e internalización, la infección se realizó en las mismas condiciones y a las 5 horas las células fueron lavadas para remover las bacterias no adherentes, fijadas con PFA 4% (p/v) y el número de bacterias extracelulares e intracelulares fue discriminado con doble marcación fluorescente y cuantificado mediante microscopía de fluorescencia según el protocolo descrito en la sección 2.4 de este Capítulo. A 5 y 48 horas post infección las células se lavaron, fueron removidas por tratamiento con tripsina-EDTA (Gibco) al 0,05% (p/v) durante 10 minutos y se lisaron por incubación con saponina 0,1% (p/v) durante 10 minutos. Diluciones seriadas de los lisados fueron inoculadas en placas ABGs para enumerar unidades formadoras de colonias (UFC).

2.9. Análisis proteómico de bacterias aisladas de células epiteliales

Para realizar el análisis de *B. pertussis* aisladas de localización intracelular, células 16HBE14o- polarizadas según se describió previamente en este capítulo fueron incubadas con la cepa salvaje de *B. pertussis* a una multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula en MEM suplementado con BSA al 0,2% (p/v) durante 4 horas a 37°C en presencia de 5% CO₂. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante de infección fue separado para utilizar las bacterias infectantes como control extracelular y las células fueron lavadas tres veces con PBS para remover las bacterias no adherentes y se incubaron durante una hora en medio MEM-SFB para favorecer la internalización. Luego se incubaron durante una hora con Polimixina B en una concentración de 100 µg mL⁻¹ en MEM-SFB para eliminar las bacterias extracelulares. Luego de esto, la concentración de Polimixina B fue reducida a 5 µg mL⁻¹ hasta el final del ensayo. A 5 y 48 horas post infección las células se lavaron con PBS y se levantaron por incubación con tripsina-EDTA al 0,05% (p/v) durante 10 minutos para el posterior aislamiento de las bacterias intracelulares. En los ensayos de puesta a punto en los que se indica se realizó una centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos al inicio de la incubación célula-bacteria, o se realizó una incubación adicional de 10 minutos con tripsina-EDTA al 0,05% (p/v). En todos los ensayos de puesta a punto se evaluaron los niveles de adhesión e internalización por doble tinción fluorescente según el protocolo descrito en la sección 2.4 de este Capítulo.

El aislamiento de las bacterias intracelulares se realizó siguiendo un protocolo previamente optimizado por nuestro grupo basado en la lisis por sonicación de la célula infectada y posterior separación de las bacterias mediante centrifugación en un gradiente de sacarosa [274]. Para ello, las células infectadas con *B. pertussis* fueron suspendidas en sacarosa 0,2 M / imidazol 3 mM / HCl pH 7,4 suplementado con inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail 100×, Sigma) y sometidas a sonicación en un sonicador Branson Sonifier 250 (cinco veces durante 3 segundos a baja potencia en frío). Los núcleos y las células intactas se eliminaron por centrifugación a 505 × g durante 5 minutos a 4 °C sobre una solución de sacarosa 0,8 M. El sobrenadante se diluyó cinco veces en imidazol 3 mM/HCl pH 7,4, y se agregó en la parte superior de un gradiente de sacarosa discontinuo compuesto de tres capas: capa inferior (sacarosa 1M), compuesta de 1 mL de solución de sacarosa 1 M / imidazol 3 mM / HCl pH 7,4; capa intermedia (sacarosa 0,8 M) compuesta de 1 mL de solución de sacarosa 0,8 M / imidazol 3 mM/ HCl pH 7,4 ; y capa superior (sacarosa 0,4 M) compuesta de 1 mL de solución de sacarosa 0,4 M / imidazol 3 mM / HCl pH 7,4. El

gradiente, previamente preparado en un tubo SW40Ti (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, EE. UU.), se centrifugó a $3340 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . Las velocidades de aceleración y desaceleración se establecieron en ocho y uno, respectivamente. Las bacterias se encontraron en su mayoría en el precipitado fueron lavadas con agua grado HPLC y se recuperaron por centrifugación a $15.000 \times g$ durante 10 min a 4°C . Las bacterias se recuperaron del precipitado y se almacenaron a -70°C . Luego, fueron liofilizadas y procesadas para su análisis proteómico. Un total de seis replicados biológicos independientes realizados por duplicado pertenecientes a bacterias recuperadas de células 16HBE14o- a las 5 horas post infección y 48 horas post infección fueron obtenidos.

Las bacterias intracelulares liofilizadas fueron reconstituidas en $100 \mu\text{L}$ de agua grado HPLC con 1% de dodecil sulfato de sodio (SDS) en agitación durante 30 minutos. Luego de esto fueron sometidas a cinco ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a 37°C , se les agregó MgCl_2 y benzonasa (Pierce; Rockford, IL, USA) hasta obtener concentraciones finales de 4 mM y $0.005 \text{ U}\mu\text{L}^{-1}$ respectivamente, y fueron centrifugadas durante 30 minutos a $17.000 \times g$. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y se le realizó el ensayo de ácido bicinconínico (BCA) para determinar la cantidad de proteína utilizando un kit comercial (Micro BCA Assay Kit; Pierce) y BSA como standard en un rango de concentración ente 0 y $160 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$. Las absorbancias se midieron utilizando un fotómetro Synergy™ (BioTek-Agilent, Ratingen, Germany) y el análisis cuantitativo se realizó con la regresión mejor ajustada (*best-fit regression*).

Se tomaron muestras conteniendo $2,5 \mu\text{g}$ de proteína de cada condición para su digestión siguiendo un protocolo de preparación basado en partículas magnetizadas SP3 según se describe en [389]. Brevemente, partículas hidrofílicas e hidrofóbicas SeraMg Speed Beads (Thermo Scientific, Pittsburgh, EE. UU.) se mezclaron, lavaron y llevaron a la concentración de $20 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$. Se tomaron $10 \mu\text{L}$ de esta solución y se agregaron a cada muestra. Luego de agregar acetonitrilo para obtener una concentración final de 70% (v/v) se la mezcla se agitó durante 18 minutos a temperatura ambiente a 1400 rpm a fin de que las proteínas se unan a las partículas. El sobrenadante fue eliminado por separación magnética y se utilizó este procedimiento para lavar las proteínas unidas a las partículas dos veces con etanol 70% (v/v) y una vez con acetonitrilo. Luego de secar las partículas por aireación se agregó tripsina 20 mM en bicarbonato de amonio en una relación tripsina/proteína de 1:25 y se incubaron durante la noche. La actividad de la tripsina se detuvo por agregado de acentonitrilo al 95% (v/v). Luego de un lavado extra con acetonitrilo las proteínas fueron eluidas usando $10 \mu\text{L}$ de dimetilsulfóxido 2% (v/v) e incubando la mezcla por 5 minutos en

un baño de ultrasonificación. Luego de centrifugar 1 minuto a $17.000 \times g$, la solución de péptidos resultante fue transferida a un vial con buffer para espectroscopía de masas (MS-buffer) compuesto de 4% (v/v) de acetonitrilo y 0,2% (v/v) de ácido acético en agua grado HPLC (J.T. Baker, Thermo Scientific). Las muestras fueron congeladas a -20°C antes del análisis nano-LC-MS/MS.

2.10. Adquisición y análisis de datos de proteómica global por MS

Los péptidos fueron separados usando un dispositivo UltiMate 3000 nano-LC (Thermo Fisher Scientific) combinando una pre-columna (diámetro interno $100 \mu\text{m}$, tamaño de partícula $5 \mu\text{m}$, tamaño de poro 100 \AA , Acclaim PepMap, Thermo Fisher Scientific) y una columna analítica (25 cm, diámetro interno $75 \mu\text{m}$, tamaño de partícula $2,6 \mu\text{m}$, tamaño de poro 150 \AA , Accucore, Thermo Fisher Scientific) con ayuda de un gradiente binario de buffer A (0,1% (v/v) de ácido acético en agua grado HPLC) y buffer B (0,1% de ácido acético en ACN) aplicando un flujo de 300 nLmin^{-1} . Luego de la ionización, los péptidos fueron analizados usando un espectrómetro de masas Q ExactiveTM HF (Thermo Fisher Scientific) en el modo de adquisición independiente de datos (DIA del inglés *data independent acquisition*). Los espectros obtenidos fueron mapeados contra la base de datos de Uniprot de *B. pertussis* Tohama I usando el software Spectronaut (Biognosys, Suiza) utilizando R y el paquete Tidyverse. Los factores de normalización fueron extraídos de Spectronaut y las intensidades nulas fueron reemplazadas por el menor valor de intensidad media de todo el set de datos. La intensidad de las proteínas fue calculada usando el algoritmo maxLFQ [390] y las comparaciones estadísticas fueron realizadas a nivel de péptido utilizando el paquete PECA usando un test ROTS (abordaje ROPECA – *reproducibility-optimized peptide change averaging*) [391], [392]. Fueron consideradas en el análisis proteínas para las cuales se identificaron al menos dos péptidos en dos de los tres replicados biológicos de la localización extracelular y la intracelular a 5 horas. Para la comparación de la abundancia de proteínas entre las distintas condiciones ensayadas fueron consideradas significativamente distintas condiciones con una relación de abundancias (*fold change*) mayor a 1,5 (\log_2 del *fold change* mayor a 0,58) o menor a 0,67 (\log_2 del *fold change* menor a -0,58) y tanto el valor p como el valor p corregido por el método de Benjamini-Hochberg (q-valor) menor a 0,05.

Los análisis de enriquecimiento funcional de proteínas con abundancia modificada en dos condiciones fueron realizados utilizando la base de datos David 2021 [393]. La construcción y el análisis de redes se realizaron usando la base de datos STRING [394].

2.11. Análisis estadístico

La comparación de medias para dos grupos independientes fue realizada con la prueba t de Student con un grado de significación (p) de 0,05. La comparación estadística para más de dos grupos fue realizada con el análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación de los valores obtenidos (medias) se utilizó el test de Menor Diferencia Significativa (LSD) con un grado de significación (p) de 0,05.

Capítulo 3

Adhesión, internalización y sobrevivencia de
Bordetella pertussis en células bronquiales
humanas polarizadas

3. Adhesión, internalización y sobrevivencia de *Bordetella pertussis* en células bronquiales humanas polarizadas

3.1. Introducción

B. pertussis se transmite entre hospedadores a través de microgotas y aerosoles expelidos por las personas infectadas al hablar, toser o estornudar que son luego inhaladas por personas no infectadas. Esto determina que la primera interacción entre *B. pertussis* y el hospedador ocurra en el tracto respiratorio. El tracto respiratorio humano comienza en la nasofaringe y se ramifica a través de repetidas bifurcaciones desde la tráquea llegando a los bronquios, continuando con los bronquiolos y llegando finalmente a los alveolos donde ocurre el intercambio gaseoso con la sangre [316]. El epitelio que recubre al tracto respiratorio entre la nasofaringe y los alveolos está formado por una capa celular altamente organizada y continua que constituye la barrera entre el aire inhalado que contiene microorganismos y contaminantes y el tejido mucoso subepitelial. Las células polarizadas que componen esta barrera están unidas entre sí a través del denominado complejo apical de unión, de los desmosomas y de las uniones de tipo gap. Los últimos dos cumplen las funciones de otorgar fuerza mecánica y de transportar iones, segundos mensajeros o metabolitos pequeños, respectivamente. Por su parte, el complejo apical de unión comprende a las uniones estrechas y a las uniones adherentes formadas ambas por interacciones homotípicas y heterotípicas entre proteínas intercelulares [358]. Estas estructuras están compuestas de varias proteínas entre las que se incluyen ocludina, distintas claudinas, la proteína de unión JAM, las zonula ocludens 1, 2 y 3, y la cingulina [316]. Las uniones estrechas limitan la difusión libre de los componentes de membrana delimitando de esta forma la separación entre una membrana apical y una basolateral con composiciones diferentes entre sí y con diferentes roles en la función epitelial [358]. Además de esto, regulan el pasaje de determinadas partículas desde el lumen del tracto respiratorio (en contacto con la zona apical de las células) al espacio subepitelial (en contacto con la zona basal de las células) constituyendo una barrera con permeabilidad selectiva [316]. Otra de las funciones que cumplen las uniones estrechas en esta barrera epitelial es la de evitar el ingreso de microorganismos patógenos desde el lumen hacia los tejidos subyacentes en el hospedador. Las células de esta barrera también están equipadas con receptores de patrones moleculares de daño (DAMPs del inglés *damage associated molecular patterns*), como los

receptores de tipo toll (TLR) o los de tipo NOD (NLR) entre otros, por lo que el epitelio respiratorio también posee un rol activo en la inmunidad, respondiendo a infecciones y modulando la respuesta del hospedador [395]. Asimismo, si bien las células epiteliales no son células fagocíticas profesionales, existe cada vez más evidencia de su contribución en la captación, ingesta y degradación de microorganismos [396]. Varios patógenos han evolucionado estrategias que les permiten sobrevivir a estos mecanismos de defensa, vulnerar esta barrera e infectar al hospedador a través del epitelio respiratorio. Estas infecciones respiratorias pueden conducir a distintos resultados dependiendo del patógeno. Existen patógenos cuya infección se desarrolla en el espacio extracelular, en el cual proliferan o son finalmente eliminados, y otros que poseen una o varias fases intracelulares durante la infección [396]. Dentro de este último grupo existen patógenos cuya proliferación se desarrolla exclusivamente en localización intracelular, otros que combinan fases extracelulares e intracelulares a lo largo del proceso infeccioso, y otros que, luego de ser internalizados por células epiteliales, atraviesan la barrera epitelial se diseminan más allá de la misma [396]. Estudios recientes demostraron que varios patógenos respiratorios históricamente considerados extracelulares poseen fases intracelulares en el proceso de infección [375], [376], [377], [396], [397]. Una vez internalizados por las células epiteliales, los patógenos pueden seguir diferentes destinos. Uno de ellos puede ser la degradación en lisosomas y la resolución de la infección. Sin embargo, existen patógenos que evaden las vías degradativas, logrando la supervivencia y/o la diseminación. Estos patógenos, en general, suelen ser persistentes y de difícil erradicación. Hay patógenos que incluso establecen nichos replicativos en localización intracelular en vacuolas lisosomales con pH ácido y enzimas hidrolíticas, como *Coxiella burnetii* [398]. Otros se establecen en vacuolas no ácidas cuya fusión con los lisosomas está inhibida por el patógeno, como *Chlamydia pneumoniae* [399]. Otros como *Mycobacterium tuberculosis* sobreviven en autofagosomas [400], e incluso algunos como *Listeria monocytogenes* lo hacen en el citosol luego de escapar del fagosoma [401]. También se describió que algunos, como *Streptococcus pneumoniae*, no establecen nichos intracelulares replicativos, pero se mantienen viables en localización intracelular [402] y se especula que las células de la barrera epitelial podrían ser un primer paso para acceder al espacio subepitelial por transcitosis y diseminar la infección [403].

Como se mencionó anteriormente, la epidemiología de la tos convulsa evidencia que *B. pertussis* es capaz de colonizar e incluso persistir en el tracto respiratorio de individuos vacunados [246], [404]. La colonización inicia con la adhesión a células del tracto respiratorio superior, mediada principalmente por la adhesina más importante de este

patógeno es la hemaglutinina filamentosa, FHA [101], [102], [103], [105]. Estudios realizados con el modelo de infección en babuinos y a partir de autopsias de casos fatales describieron la presencia de *B. pertussis* en bronquios [21], [373], indicando que *B. pertussis* es capaz de dispersarse desde el sitio de contacto inicial y colonizar el tracto respiratorio inferior. Parte del éxito del proceso de colonización del tracto respiratorio por este patógeno podría explicarse por los mecanismos de evasión y modulación del sistema inmune del hospedador mediados principalmente por CyaA y PT. PT retarda la migración de neutrófilos al sitio de infección e inhibe la activación de células inmunes [64]. Por su parte CyaA es capaz interactuar con células inmunes como neutrófilos y macrófagos a través del receptor CD11b e inducir la producción descontrolada del segundo mensajero cAMP, conduciendo a la intoxicación de las mismas e interfiriendo con sus actividades bactericidas [85], [268]. Si bien no se detectó la expresión del receptor CD11b en células epiteliales respiratorias, se ha descrito la capacidad de CyaA de interactuar con este tipo celular e inducir la producción de cAMP, resultando en la intoxicación de las mismas [93], [94], [374], [405]. En este sentido, se describió que CyaA pura podría inducir la ruptura de las uniones estrechas y la disminución de la resistencia transepitelial [93].

B. pertussis fue históricamente considerada un patógeno extracelular, pero resultados obtenidos por nuestro grupo [83], [87], [273], [371] y confirmados por otros [257], [378], [379], [380] indican que es capaz de comportarse como un patógeno intracelular facultativo, siendo este otro mecanismo que contribuiría al éxito del proceso infeccioso de la bacteria. En este sentido, los resultados indican que *B. pertussis* es capaz de sobrevivir en localización intracelular en fagocitos profesionales evitando la fusión fagolisosomal y modulando la actividad bactericida de los mismos por acción de las toxinas CyaA y PT [83], [87], [273], [274]. Estas dos toxinas, además de ser secretadas en forma soluble por la bacteria, son vehiculizadas a través de vesículas de membrana externa en el sitio de infección [88], [406], y se demostró que son capaces de ejercer su efecto inmunomodulador y promover la sobrevida intracelular de *B. pertussis* también cuando son secretadas a través de este mecanismo [88]. Por su parte, los estudios realizados para evaluar la sobrevida intracelular en células epiteliales respiratorias mostraron que *B. pertussis* es capaz de sobrevivir en esta localización, pero la internalización bacteriana, al menos en los modelos de estudio usados, mostró ser extremadamente baja [369], [370], [371]. Sin embargo, se demostró que, a pesar de la baja internalización, *B. pertussis* intracelular es capaz de repoblar el medio extracelular [371], demostrando la viabilidad de las bacterias intracelulares y sugiriendo que las células epiteliales podrían constituir un nicho transitorio desde el cual colonizar el ambiente

extracelular bajo condiciones más favorables. Estos estudios fueron realizados en modelos de infección con células de línea cultivadas en subconfluencia sin uniones estrechas formadas. Estas células han perdido gran parte de las características de las células primarias que les dieron origen y no se polarizan en cultivo, por lo que carecen de características importantes de la barrera epitelial respiratoria. Con el fin de revisar la dinámica de la interacción de *B. pertussis* con el epitelio respiratorio, en este trabajo de Tesis se desarrolló un modelo epitelial de células bronquiales humanas que han retenido las características funcionales de las células primarias que les dieron origen, capaces de polarizarse en cultivo y de formar uniones estrechas. Con este modelo evaluamos el rol de las uniones estrechas, la importancia de la membrana apical y de la membrana basolateral en la adhesión inicial y la evolución de la interacción de *B. pertussis* con estas células a lo largo del tiempo.

3.2. Resultados

3.2.1. Optimización del modelo epitelial polarizado

Como se describió en la introducción de este capítulo, los primeros trabajos en los que se exploró la internalización y la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en células epiteliales fueron realizados en modelos de infección con células no polarizadas, creciendo en subconfluencia. A fin de contar con un modelo más relevante de infección en este estudio se trabajó en el desarrollo de un modelo epitelial que refleje mejor las condiciones de la infección *in vivo*, en las que *B. pertussis* interacciona con un epitelio respiratorio polarizado en el que las células se encuentran unidas mediante uniones estrechas.

En un abordaje inicial se evaluó la posibilidad de obtener una monocapa polarizada con uniones estrechas formadas utilizando la línea celular alveolar A549, previamente utilizadas por nuestro grupo y por otros, en la modelización de la interacción entre *B. pertussis* y células epiteliales respiratorias [104], [371], [374]. Para lograr esto, las células se cultivaron en placas multi-pocillo (*multiwell*) partiendo de un número de células que cubra completamente la superficie de cada pocillo para obtener una confluencia del 100%. A tiempos regulares se evaluó la eventual polarización a través de la formación e integridad de las uniones estrechas. Para ello se estudió por microscopía de fluorescencia el patrón de tinción de la proteína ocludina, constituyente fundamental de las mismas. Este marcador adquiere un patrón de tinción con apariencia reticular cuando las uniones estrechas se encuentran formadas [407]. La Figura 1 muestra que, a pesar de estar en confluencia del 100%, la señal del marcador ocludina tiene un patrón tenue y disperso indicando que esta línea celular no desarrolla uniones estrechas y por lo tanto no se polariza en estas condiciones de cultivo.

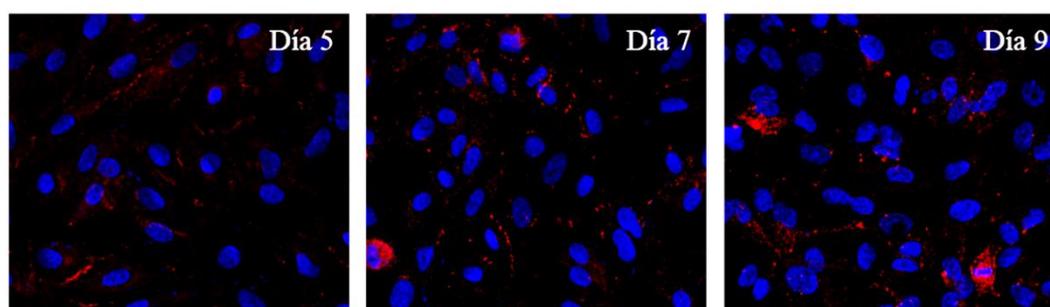


Figura 1. Monocapa de células A549 en cultivo sumergido. Células alveolares A549 se cultivaron sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro y se incubaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (DMEM+SFB) a 37°C. A distintos tiempos de

cultivo las células fueron fijadas y las uniones estrechas se detectaron utilizando anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra ocludina seguido de fracciones F(ab')₂ de anticuerpos de cabra contra ratón conjugados con el fluoróforo Cy3 (rojo) para su observación mediante microscopía de fluorescencia. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestran imágenes representativas de 2 experimentos independientes.

Se evaluó entonces, la posibilidad de formar una monocapa polarizada cultivando las células en insertos semipermeables y en una interfase aire-líquido. Para esto las células se cultivaron sobre los insertos y se mantuvieron durante 7 días con medio de cultivo en el compartimiento basolateral y en el apical. Transcurrido este tiempo se retiró el medio del compartimiento apical y se continuó el cultivo durante otros dos días en interfase aire-líquido según se describió previamente para esta línea celular [408]. En la Figura 2 se observa que la ocludina no desarrolló un patrón de tinción de apariencia reticular indicando que este protocolo de cultivo, al igual que el crecimiento sumergido, tampoco induce la formación de uniones estrechas en células A549.

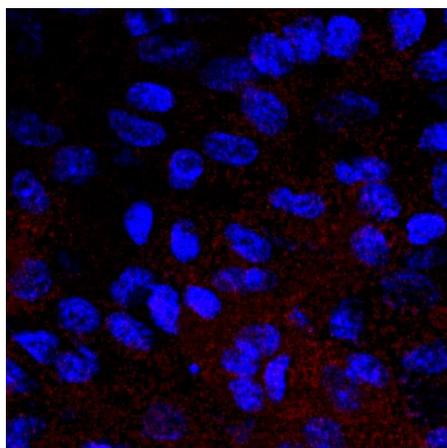


Figura 2. Monocapa de células A549 en interfase aire-líquido. Células alveolares A549 sembradas sobre insertos semipermeables con diámetro de poro de 0,4 μm fueron incubadas con medio DMEM+SFB en el compartimiento apical y en el basal durante 7 días. Transcurrido este tiempo se removió el medio del compartimiento apical y se incubaron durante otros dos días en interfase aire-líquido. En este momento las células fueron fijadas en PFA y las uniones estrechas se detectaron utilizando anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra ocludina seguido de fracciones F(ab')₂ de anticuerpos de cabra contra ratón conjugados con el fluoróforo Cy3 (rojo) para su observación mediante microscopía de

fluorescencia. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestran imágenes representativas de 2 experimentos independientes.

Tal como se ha observado previamente [409], [410], nuestros resultados indican que esta línea celular no forma uniones estrechas *in vitro*. Esto significa que no se puede esperar que estas células, aunque confluentes, formen una barrera polarizada. Debido a esto se decidió emplear otro modelo epitelial. Se optó por evaluar las células bronquiales humanas 16HBE14o- que han retenido parte de las características de las células primarias que les dieron origen, entre ellas la capacidad de polarización, la formación de uniones estrechas, el transporte direccional de iones y la formación de cilios cuando se cultivan en interfase de aire-líquido [384]). Estas células derivan de células bronquiales normales inmortalizadas por transfección con el genoma del virus SV40 defectivo en el origen de replicación [384].

Células 16HBE14o- se cultivaron en placas multi-pocillo partiendo de un número de células que cubra completamente la superficie de cada pocillo (confluencia 100%) y se cultivaron sumergidas monitoreando la eventual polarización a través de la formación e integridad de las uniones estrechas a tiempos regulares. Para ello se estudió por microscopía de fluorescencia el patrón de tinción de dos proteínas constituyentes de las uniones estrechas, claudina y ocludina. La Figura 3 muestra la evolución del patrón de tinción de ambas proteínas a distintos tiempos de cultivo. Según se observa en la figura, transcurridos los siete días de cultivo tanto la ocludina como la claudina poseen un patrón de tinción con apariencia de red, indicando que se han formado las uniones estrechas y las células están polarizadas [407], [411]. En vista de estos resultados, los ensayos que se describen a continuación en este trabajo se llevaron a cabo con monocapas polarizadas, es decir con 7 días de cultivo y uniones estrechas formadas.

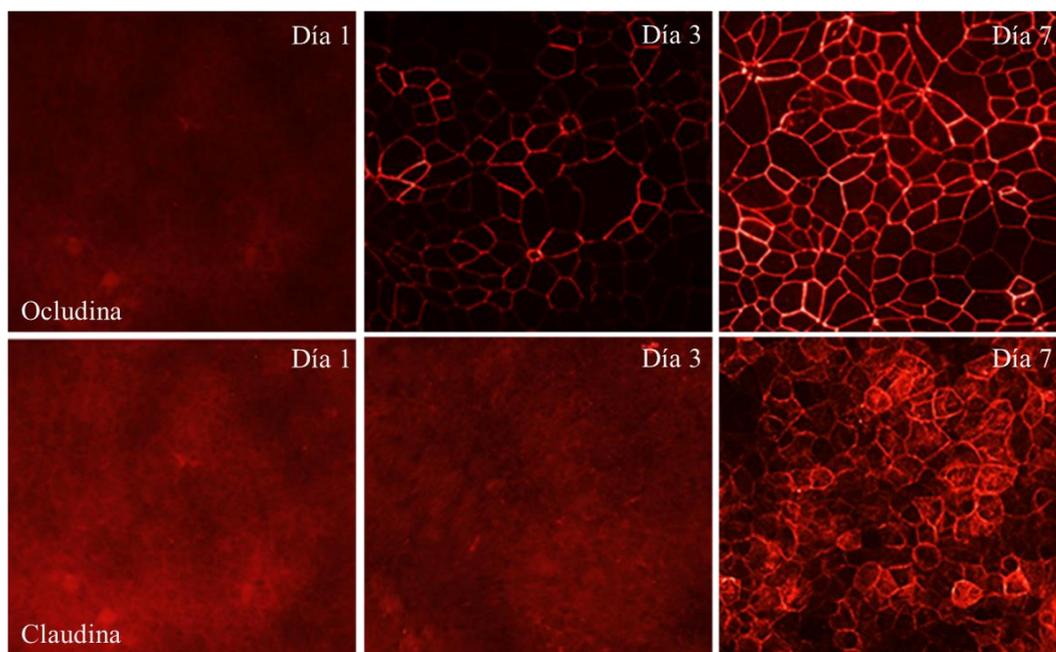


Figura 3. Monocapa de células 16HBE14o- en cultivo sumergido. Células bronquiales 16HBE14o- se sembraron sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro y se incubaron en medio MEM+SFB. A distintos tiempos de cultivo las células fueron fijadas en PFA y las uniones estrechas se detectaron utilizando anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra ocludina o claudina seguido de fracciones F(ab')₂ de anticuerpos de cabra contra ratón conjugados con el fluoróforo Cy3 (rojo) para su observación mediante microscopía de fluorescencia. Se muestran imágenes representativas de 2 experimentos independientes.

3.2.2. Adhesión de *B. pertussis* a monocapas de células epiteliales polarizadas

Las células bronquiales 16HBE14o- polarizadas según el protocolo descrito se incubaron con *B. pertussis* a una multiplicidad de infección (MOI) de 20 bacterias por célula durante 5 horas y, luego de eliminar las bacterias no adheridas mediante tres lavados con PBS, se analizó la adhesión por microscopía de fluorescencia. La Figura 4 muestra que una gran proporción de las bacterias adheridas se ubican sobre las uniones estrechas o cerca de ellas en la zona intercelular. La mayoría de las bacterias adheridas se encuentran en esta zona a pesar de que constituye una fracción menor del área total expuesta. Esta distribución particular sugiere la existencia de una adhesión preferencial a estas estructuras.

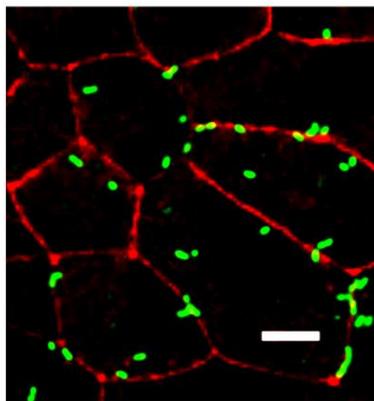


Figura 4. Adhesión de *B. pertussis* a monocapas de células epiteliales polarizadas.

Células bronquiales 16HBE14o- polarizadas durante siete días fueron incubadas con *B. pertussis* (MOI:20) por 5 horas a 37°C, lavadas con PBS y fijadas para su tinción. Las bacterias se detectaron utilizando sueros policlonales de conejo dirigidos contra *B. pertussis* seguido de fracciones F(ab')₂ de anticuerpos de cabra contra conejo conjugados con el fluoróforo FITC (verde) y las uniones estrechas se detectaron utilizando anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra ocludina seguido de fracciones de anticuerpos de cabra contra ratón conjugados con el fluoróforo Cy3 (rojo) para su observación mediante microscopía de fluorescencia. Imagen representativa de dos ensayos independientes. Barra de escala: 5 µm.

3.2.3. Adhesinas bacterianas involucradas en el tropismo de *B. pertussis* hacia las uniones estrechas

Si bien la principal adhesina de *B. pertussis* es FHA se han reportado otras adhesinas menores que contribuyen a la adhesión bacteriana a distintos tipos celulares [1]. Con el fin de evaluar la contribución relativa de FHA en el particular patrón de adhesión observado en la Figura 4, se incubaron monocapas de células 16HBE14o- polarizadas con uniones estrechas formadas con la cepa salvaje de *B. pertussis* y con una cepa mutante defectiva en FHA (BpΔFHA). La adhesión bacteriana se analizó por microscopía de fluorescencia a las 5 horas post infección. Teniendo en cuenta que en estudios anteriores [112] se ha observado que la ausencia de FHA determina una disminución significativa en la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales, se empleó una multiplicidad de infección mayor en el caso de la cepa defectiva en FHA (MOI BpWT: 20, MOI BpΔFHA: 200) para lograr un nivel de adhesión similar y evitar la pérdida de sensibilidad. La Figura 5 muestra que el porcentaje de bacterias adheridas a las uniones estrechas es significativamente menor si la bacteria no expresa FHA,

sugiriendo que esta adhesina está involucrada en el tropismo de la bacteria hacia las uniones estrechas.

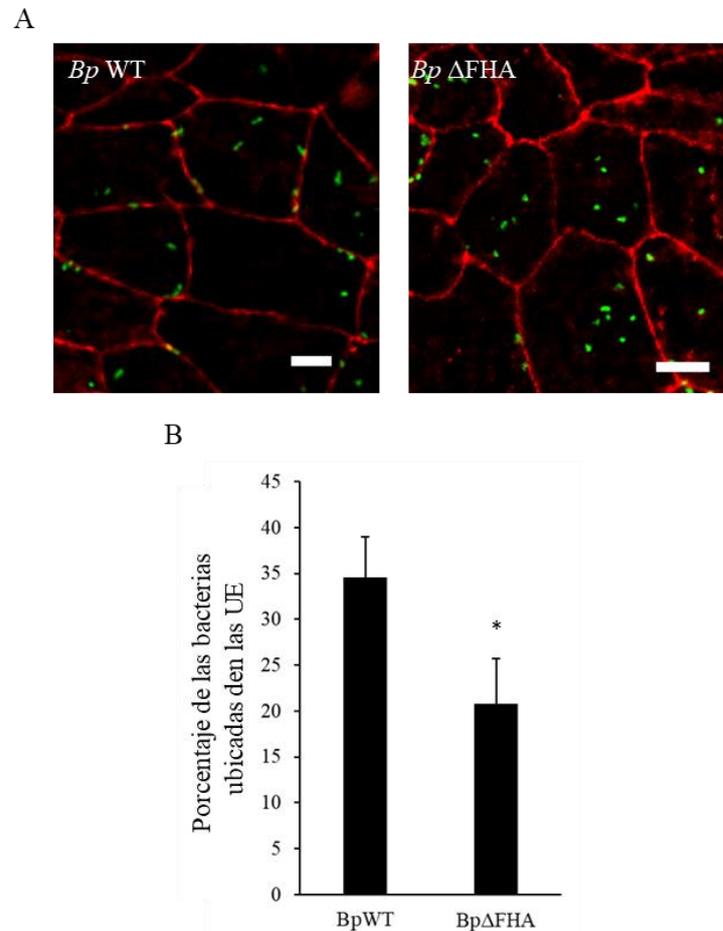


Figura 5. Rol de FHA en la adhesión de *B. pertussis* a uniones estrechas. Células bronquiales 16HBE14o- polarizadas durante siete días fueron incubadas con la cepa salvaje de *B. pertussis* (BpWT, MOI: 20) o con la cepa isogénica defectiva en FHA (BpΔFHA MOI: 200) por 5 horas a 37°C, lavadas con PBS y fijadas para su tinción. Las bacterias se detectaron utilizando sueros policlonales de conejo dirigidos contra *B. pertussis* seguido de fracciones F(ab')₂ de anticuerpos de cabra contra conejo conjugados con el fluoróforo FITC (verde) y las uniones estrechas se detectaron utilizando anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra ocludina seguido de fracciones de anticuerpos de cabra contra ratón conjugados con el fluoróforo Cy3 (rojo) para su observación mediante microscopía de fluorescencia. **A)** Distribución de las bacterias de cada cepa adheridas a células epiteliales polarizadas. Imagen representativa de dos ensayos independientes. Barra de escala: 5 μm. **B)** Porcentaje de las bacterias adheridas localizadas en las uniones estrechas (UE). Se muestra la media ± DE de dos experimentos independientes. El porcentaje de bacterias defectivas en

FHA adheridas en las UE difiere significativamente del de las bacterias salvajes (* $p < 0,05$ t-test de Student).

Estudios previos del grupo demostraron que FHA dirige a la bacteria hacia zonas enriquecidas en balsas lipídicas [112]. Las uniones estrechas son estructuras enriquecidas en balsas lipídicas [357], por lo que es posible especular que esta interacción sea la base del patrón de adhesión de *B. pertussis* a estas zonas específicas dado que FHA parece ser la responsable de la adhesión de *B. pertussis* a la zona de uniones estrechas. En este contexto se evaluó la colocalización de las bacterias con caveolina, un marcador de balsas lipídicas a las 5 horas post infección por microscopía confocal. En estos ensayos se elevó la multiplicidad de infección (MOI: 100 en lugar de MOI: 20) buscando observar con mayor claridad el patrón de adhesión de la bacteria. La Figura 6A muestra que el patrón de tinción de caveolina, aunque más disperso, es similar al de ocludina confirmando la presencia de balsas lipídicas en la zona de las uniones estrechas tal como se había documentado previamente [357]. La Figura 6B muestra que hay bacterias que adhieren en esas zonas y colocalizan con caveolina. Estos resultados sugieren que la adhesión preferencial de *B. pertussis* a las uniones estrechas podría deberse a la interacción entre la bacteria y estos dominios de membrana, probablemente mediada por FHA.

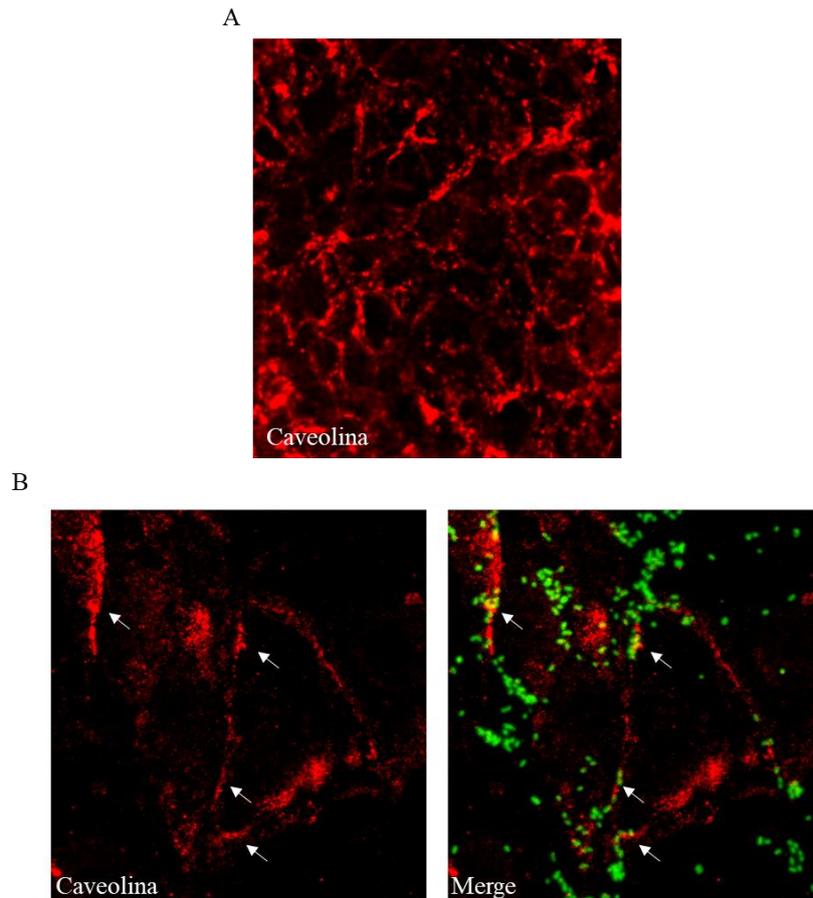


Figura 6. Rol de balsas lipídicas en la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales polarizadas. Células bronquiales 16HBE14o- polarizadas durante siete días fueron incubadas con la cepa salvaje de *B. pertussis* (MOI: 100) por 5 horas a 37°C, lavadas con PBS y fijadas para su tinción. Las bacterias se detectaron utilizando sueros policlonales de conejo dirigidos contra *B. pertussis* seguido de fracciones F(ab')₂ de anticuerpos de cabra contra conejo conjugados con el fluoróforo FITC (verde) y las balsas lipídicas se detectaron utilizando anticuerpos de ratón dirigidos contra caveolina seguido de fracciones de anticuerpos de cabra contra ratón conjugados con el fluoróforo Cy3 (rojo) para su observación mediante microscopía de fluorescencia. **A)** Patrón de tinción de la caveolina en una monocapa de células polarizadas sin infectar. **B)** Distribución de las bacterias adheridas a la monocapa de células polarizadas. Se muestra el patrón de tinción de caveolina (Caveolina) y la superposición del mismo con las bacterias adheridas (Merge). Las flechas señalizan bacterias colocalizando con caveolina. Imagen representativa de dos ensayos independientes.

3.2.4. Efecto de *B. pertussis* sobre las uniones estrechas

Estudios previos han mostrado que la toxina adenilato ciclasa (CyaA) purificada compromete la integridad de las uniones estrechas [93]). Durante la infección, la presencia de *B. pertussis* adherida en la cercanía de las uniones podría generar altas concentraciones locales de este factor de virulencia produciendo, eventualmente, la ruptura de las mismas. Para evaluar el efecto de CyaA durante la infección se empleó una cepa mutante defectiva en CyaA para infectar monocapas de células polarizadas con uniones estrechas formadas. Como control se realizaron infecciones con la cepa salvaje en paralelo. Las infecciones con ambas cepas se realizaron a una multiplicidad de infección baja (MOI: 0,2) para que la infección progrese por 24 horas. Luego de lavar las células para eliminar bacterias no adheridas se evaluó la integridad de las uniones estrechas por tinción de ocludina y microscopía de fluorescencia. La Figura 7A muestra que la cepa salvaje afecta el patrón de tinción de la ocludina mientras que la cepa mutante no. Estos resultados fueron confirmados cuantitativamente mediante el cálculo de la tasa de organización de las uniones estrechas (TiJOR, del inglés *Tight Junction Organization Rate*) [386] en cada condición. Como se observa en la Figura 7B, la organización de las uniones estrechas fue significativamente menor en las monocapas incubadas con la cepa salvaje que en las incubadas con la cepa deficiente en CyaA y que en el control sin infectar. Estos resultados demuestran que durante la infección *B. pertussis* induce la disrupción en la integridad de las uniones estrechas de las monocapas polarizadas a través de CyaA.

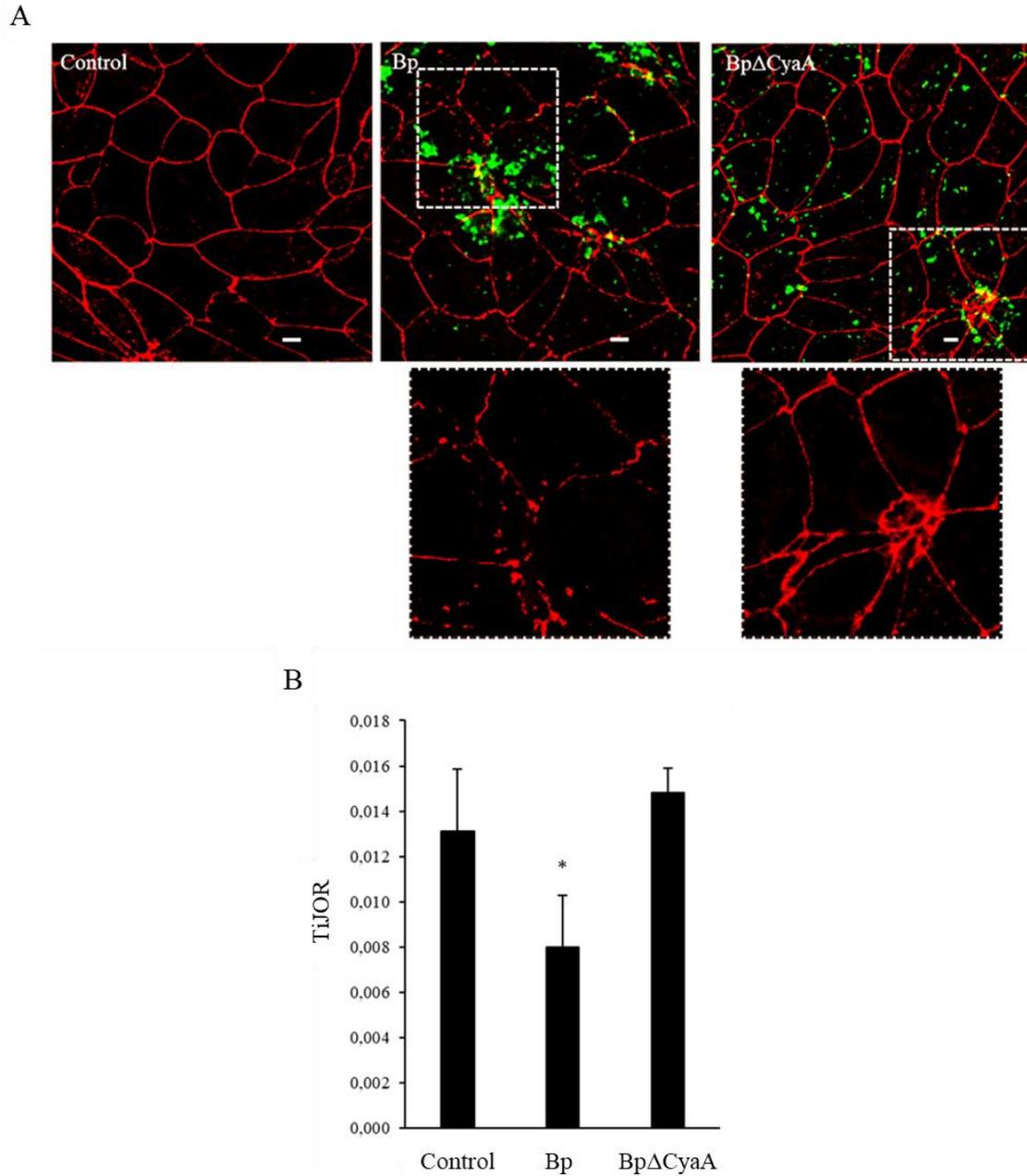


Figura 7. Rol de CyaA en la ruptura de uniones estrechas de células epiteliales polarizadas. Células bronquiales 16HBE14o- polarizadas durante siete días fueron incubadas con la cepa salvaje de *B. pertussis* (Bp) (MOI: 0,2) o con una cepa isogénica defectiva en CyaA (BpΔCyaA) (MOI: 0,2) durante 24 horas a 37°C, lavadas con PBS y fijadas para su tinción. Las bacterias se detectaron utilizando sueros policlonales de conejo dirigidos contra *B. pertussis* seguido de fracciones F(ab')₂ de anticuerpos de cabra contra conejo conjugados con el fluoróforo FITC (verde) y las uniones estrechas se detectaron utilizando anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra ocludina seguido de fracciones de anticuerpos de burro contra ratón conjugados con el fluoróforo Cy3 (rojo) para su observación mediante microscopía confocal. Como control se utilizaron monocapas de células polarizadas sin

infectar. **A)** Patrón de tinción de ocludina y distribución de bacterias adheridas. Las imágenes inferiores muestran con mayor detalle el patrón de tinción de la ocludina de las zonas señaladas por recuadros. Imagen representativa de dos ensayos independientes. Barra de escala: 5 μm . **B)** Tasa de organización de las uniones estrechas (TiJOR) para monocapas de células polarizadas sin infectar (Control), infectadas con la cepa salvaje (Bp) o infectadas con la cepa isogénica defectiva en CyaA (Bp Δ CyaA). En cada caso se muestra la media \pm DE de dos experimentos independientes realizados por triplicado. El valor de TiJOR de las células incubadas con la cepa salvaje de *B. pertussis* difiere significativamente de los valores de las células control y de las células incubadas con la cepa defectiva en CyaA (* $p < 0,05$ test de ANOVA).

Teniendo en cuenta que *B. pertussis* es capaz de vulnerar la integridad de las uniones estrechas se evaluó la capacidad de este patógeno de atravesar una monocapa de células bronquiales polarizadas y el rol de CyaA en este proceso. Para tal fin, monocapas de células 16HBE14o- polarizadas, cultivadas en insertos con membranas semipermeables con diámetro de poro de 3,0 μm durante siete días, fueron incubadas en el compartimiento apical con *B. pertussis* o con una cepa mutante de *B. pertussis* deficiente en CyaA, a una multiplicidad de infección (MOI) de 2 bacterias por célula. A las 5 horas post infección se tomaron muestras del compartimiento apical y del basolateral para realizar recuentos de bacterias viables como unidades formadoras de colonias (UFC) en placa. La toma de muestras se repitió a las 24 horas post infección. Los datos de la Tabla 1 muestran que a tiempos cortos post infección únicamente la cepa salvaje se encuentra en el compartimiento basal a pesar de haber igual cantidad de UFC de ambas cepas en el compartimiento apical. Esto indica que a tiempos cortos de infección *B. pertussis* atraviesa la barrera epitelial en un proceso mediado por CyaA. A tiempos más largos post infección se encontraron ambas cepas en el compartimiento basal indicando que, además de CyaA, otros factores de este patógeno son capaces de vulnerar la barrera epitelial permitiéndole acceder al espacio basal, aunque su acción requiere más tiempo. Si bien este diseño experimental no permite excluir la posibilidad de que *B. pertussis* atraviese la monocapa por una vía transcelular (en particular a tiempos más largos post infección), a partir de estos resultados se podría especular que la ruptura de las uniones estrechas mediada principalmente por CyaA, permite que *B. pertussis* atraviese la monocapa de células polarizadas de manera eficiente.

Tabla 1. *B. pertussis* es capaz de atravesar la monocapa epitelial

	UFC recuperadas por well			
	5 horas		24 horas	
	BpWT	BpΔCyaA	BpWT	BpΔCyaA
Apical	1.9*10 ⁶	1.8*10 ⁶	1.6*10 ⁷	2,1*10 ⁷
Basal	3210	n/d	3.8*10 ⁶	4,2*10 ⁶

n/d indica que no se detectaron UFC

La ruptura de las uniones estrechas y la vulneración de la barrera epitelial expone la membrana basolateral por la que varios patógenos tienen gran afinidad y a través de la cual tienen acceso al espacio intracelular [348], [350], [412], [413]. Para evaluar si la ruptura de las uniones estrechas mediada por CyaA afecta la internalización de *B. pertussis*, monocapas con uniones estrechas formadas se incubaron con *B. pertussis* o con *B. pertussis* mutante defectiva en CyaA, y se evaluó el nivel de internalización de cada cepa a las 5 horas post infección por microscopía de fluorescencia. La Figura 8 muestra que el nivel de internalización de la cepa defectiva en CyaA es inferior que el de la cepa salvaje sugiriendo que la presencia de CyaA favorece la internalización. Cabe señalar que, si bien la tendencia se observa claramente, la dispersión de los datos no permitió que la diferencia entre medias alcance el nivel de significancia.

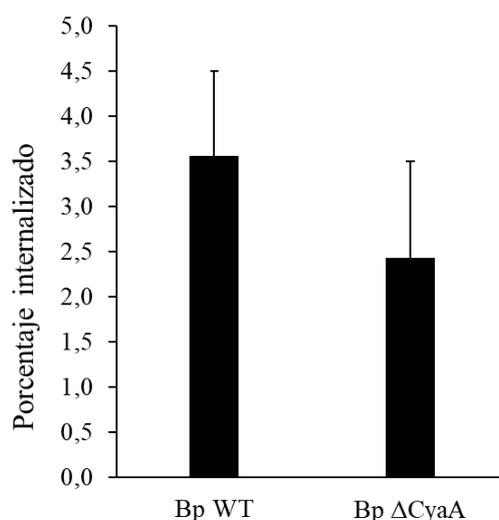


Figura 8. Rol de CyaA en la internalización de *B. pertussis* en monocapas de células epiteliales polarizadas. Células bronquiales 16HBE14o- polarizadas durante siete días fueron incubadas con la cepa salvaje de *B. pertussis* (Bp WT) o con la cepa isogénica

defectiva en CyaA (Bp Δ CyaA) a una MOI de 20 bacterias por célula por 5 horas a 37°C, lavadas con PBS y fijadas para su tinción. El número de bacterias extracelulares e intracelulares fue discriminado con doble marcación fluorescente y cuantificado mediante microscopía de fluorescencia. Se muestra el porcentaje de internalización calculado en base al número de las bacterias totales que se encuentra en localización intracelular. Se muestra la media \pm DE de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

3.2.5. Interacción de *B. pertussis* con la membrana basolateral

Como se mencionó previamente en esta sección, la ruptura de las uniones estrechas expone la membrana basolateral de las células epiteliales a los microorganismos que se encuentran en el espacio luminal y existe evidencia que indica que distintos patógenos invaden las células epiteliales polarizadas con más eficiencia a través de la membrana basolateral que a través de la apical [348], [350], [412], [413]. Con el fin de evaluar si ese es también el caso de *B. pertussis* se empleó un modelo de estudio diferente que consiste en células 16HBE14o- cultivadas durante siete días en grupos pequeños (islas) que poseen células centrales que únicamente exponen la membrana apical y células periféricas que exponen también la membrana basolateral. En la Figura 9A se observa el patrón de tinción del marcador de uniones estrechas ocludina que muestra que estas uniones están correctamente formadas entre las células del centro de la isla y no en las de la periferia. De esta forma, con este modelo se puede evaluar en simultáneo la interacción de *B. pertussis* con células que exponen membrana apical y membrana basolateral. Las islas fueron incubadas con *B. pertussis* durante 5 horas y luego lavadas para eliminar las bacterias no adheridas. Las bacterias totales y las internalizadas fueron discriminadas por doble tinción fluorescente. La Figura 9B muestra la distribución de las bacterias adheridas en islas de células. La Figura 9C muestra que el número de bacterias asociadas a las células de la periferia es significativamente mayor que el número de bacterias asociadas a las células del interior, que no exponen la membrana basolateral. Además de esto, en la Figura 9D se puede observar que el porcentaje de bacterias internalizadas es significativamente mayor en células de la periferia que exponen la membrana basolateral. Estos resultados sugieren que *B. pertussis* se adhiere más eficientemente a células que exponen la membrana basolateral, y que la internalización a través de esta membrana es mayor.

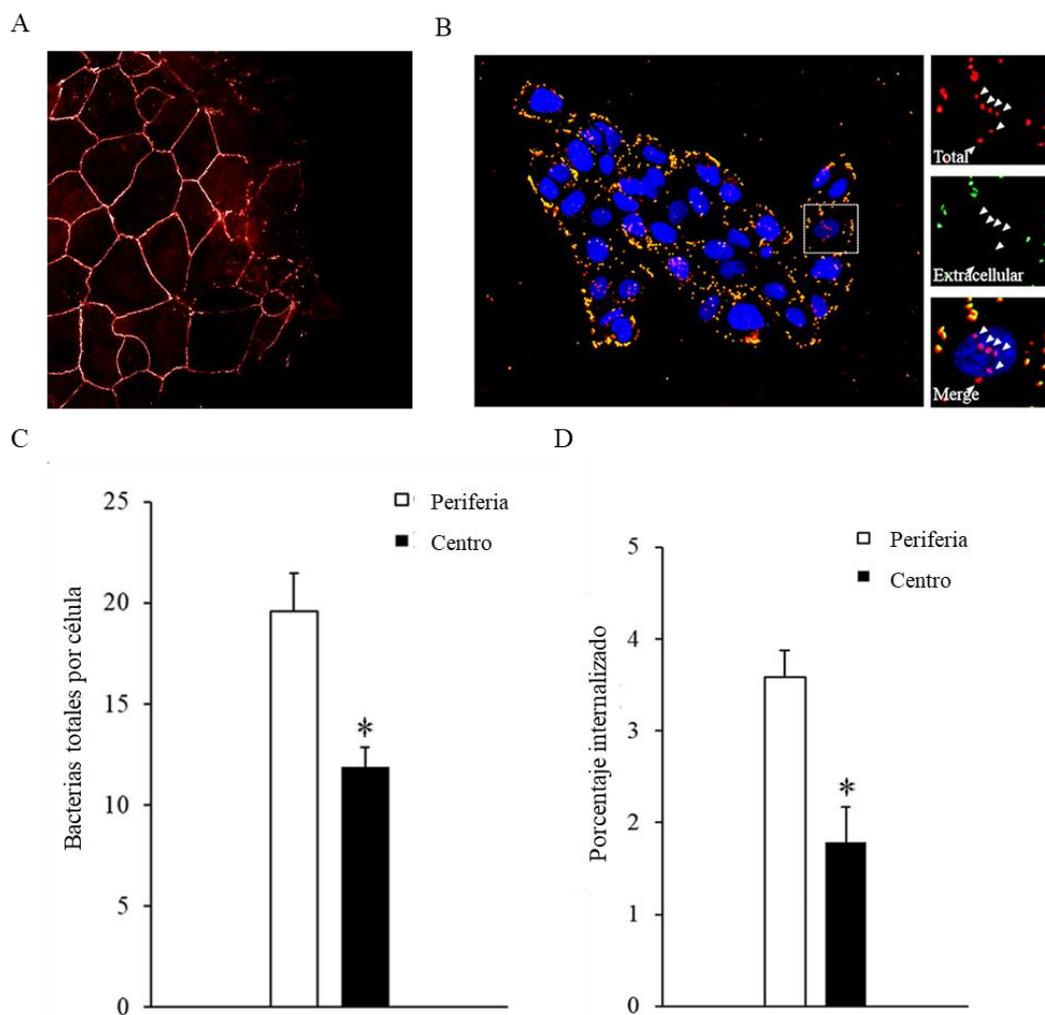


Figura 9. Adhesión e internalización de *B. pertussis* a través de la membrana basolateral. Células bronquiales 16HBE14o- polarizadas durante siete días en forma de islas fueron incubadas con *B. pertussis* (MOI:20) por 5 horas a 37°C, lavadas con PBS y fijadas para su tinción. Las uniones estrechas se detectaron utilizando anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra ocludina. El número de bacterias extracelulares e intracelulares fue discriminado con doble marcación fluorescente y cuantificado mediante microscopía de fluorescencia. **A)** Patrón de tinción de ocludina (rojo) en una isla de células polarizadas sin infectar. Se muestra una imagen representativa de dos experimentos independientes **B)** Distribución de las bacterias adheridas (amarillo) e internalizadas (rojo) a una isla de células. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (azul). Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. **C)** Número de bacterias totales por célula de la periferia o del centro de la isla. **D)** Porcentaje de las bacterias totales que se encuentra en localización intracelular. En cada caso se muestra la media \pm DE de tres experimentos independientes realizados por triplicado. El número de bacterias totales por célula y el porcentaje de

internalización de bacterias en células periféricas difiere significativamente del número de bacterias totales por célula y el porcentaje de internalización, respectivamente, en células del centro (* $p < 0,05$ t-test de Student).

3.2.6. FHA es responsable de la mayor afinidad de *B. pertussis* por la membrana basolateral

Según se describió en la introducción de este capítulo, las membranas apical y basolateral de las células epiteliales polarizadas poseen distinta composición [358]. Existen receptores específicos presentes en cada tipo de membrana y diferente concentración de receptores comunes a ambas. El nivel de adhesión diferente que muestra *B. pertussis* a estas membranas podría deberse a cualquiera de estos motivos. Teniendo en cuenta que FHA es la adhesina más importante de *B. pertussis* y su rol en el tropismo de la bacteria hacia las zonas cercanas de las uniones estrechas, se evaluó su eventual rol en la afinidad de la bacteria por la membrana basolateral. Para esto, islas de células polarizadas fueron incubadas con la cepa salvaje o la cepa mutante defectiva en FHA (MOI: 20 y MOI: 200 respectivamente) y se evaluó la adhesión por microscopía de fluorescencia. En primer lugar, la Figura 10A muestra que la adhesión bacteriana es significativamente menor en ausencia de FHA por más que la multiplicidad de infección utilizada para la cepa fue diez veces mayor según ya se describió, confirmando el rol central de esta adhesina en la adhesión a células epiteliales. Por otro lado, la Figura 10A muestra que la adhesión preferencial de *B. pertussis* por la membrana basolateral esta mediada por FHA ya que en ausencia de FHA no se observa diferencia en la adhesión bacteriana a células del centro y de la periferia.

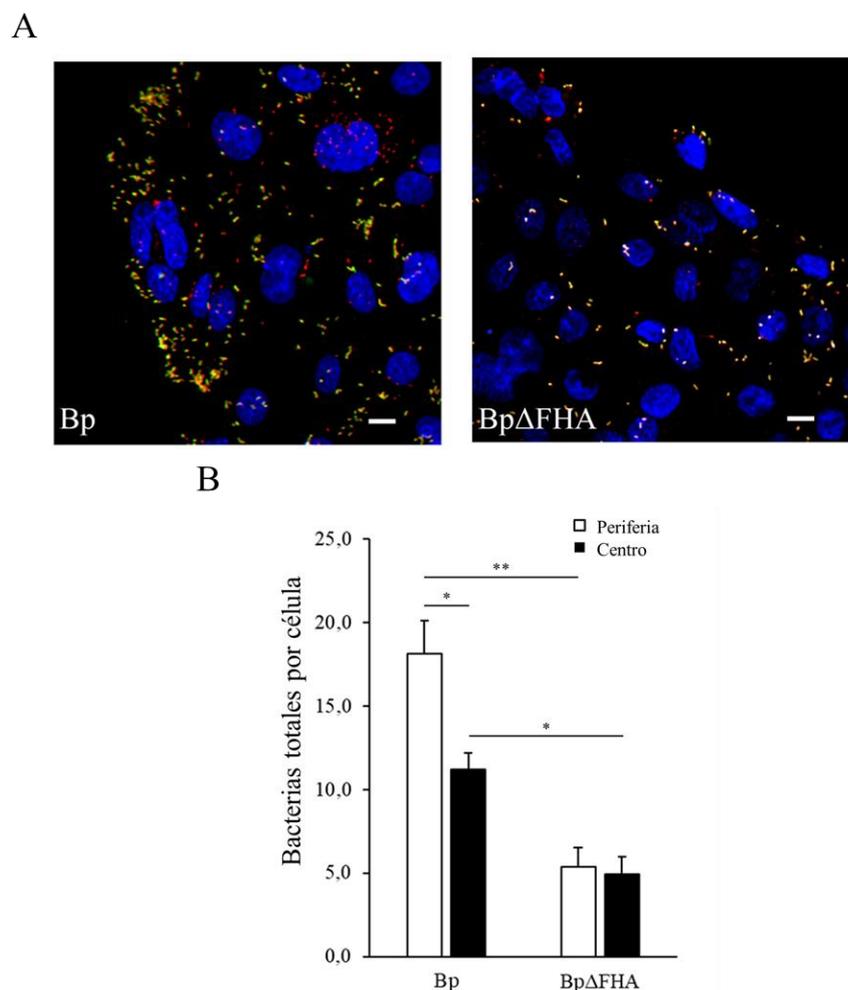


Figura 10. Rol de FHA en la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales que exponen membrana basolateral. Células bronquiales 16HBE14o- polarizadas durante siete días en forma de islas fueron incubadas con la cepa salvaje de *B. pertussis* (Bp, MOI: 20) o con la cepa isogénica defectiva en FHA (BpΔFHA, MOI: 200) por 5 horas a 37°C, lavadas con PBS y fijadas para su tinción. El número de bacterias adheridas fue detectado por doble marcación inmunofluorescente y cuantificado mediante microscopía de fluorescencia. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI. **A)** Imágenes representativas mostrando la distribución de las bacterias de ambas cepas adheridas a islas. **B)** Se muestra el número de bacterias totales por célula de la periferia o del centro para cada cepa. Se muestra la media \pm DE de dos ensayos independientes realizados por triplicado. El número total de bacterias de la cepa salvaje adheridas por célula difiere significativamente entre las células del centro y de la periferia de la isla (* $p < 0,05$ t- test de Student). El número total de bacterias de la cepa salvaje por célula periférica difiere significativamente del número total de bacterias de la cepa defectiva en FHA adheridas a las células periférica (* $p < 0,05$ t-test de Student). El

número de bacterias de la cepa salvaje por célula del centro difiere significativamente del número de bacterias defectivas en FHA por célula del centro (* $p < 0,05$ t-test de Student).

Estudios previos demostraron la relevancia de la interacción, mediada por FHA, entre *B. pertussis* y las balsas lipídicas en la adhesión a células epiteliales cultivadas en subconfluencia [112] y también a células inmunes [83]. Teniendo en cuenta que la adhesión a membrana basolateral está mediada por FHA, se evaluó el rol de las balsas lipídicas en la adhesión a células que exponen membrana basolateral mediante ensayos de adhesión en presencia de nistatina. En bajas concentraciones, la nistatina se une al colesterol presente en las balsas lipídicas comprometiendo la dinámica de las mismas. Para llevar a cabo este estudio, islas de células se pre incubaron con nistatina, se infectaron con *B. pertussis* y se evaluó la adhesión de la bacteria por microscopía de fluorescencia. La Figura 11 muestra que el agregado de nistatina disminuyó significativamente la adhesión a células de la periferia que exponen la membrana basolateral pero no a células del centro que sólo exponen la membrana apical. Esto sugiere que las balsas lipídicas están involucradas en la adhesión de *B. pertussis* a la membrana basolateral de células epiteliales polarizadas.

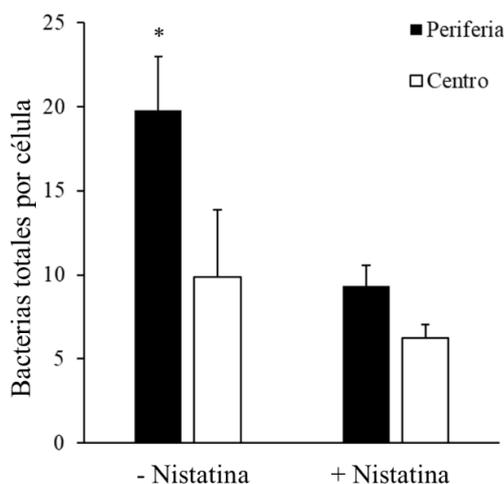


Figura 11. Rol de las balsas lipídicas en la adhesión de *B. pertussis* en células epiteliales que exponen membrana basolateral. Células bronquiales 16HBE14o-polarizadas durante siete días en forma de islas fueron incubadas con $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nistatina por 60 minutos y luego con *B. pertussis* (MOI:20) en presencia de la droga por 5 horas a 37°C , lavadas con PBS y fijadas para su tinción. Como control se infectaron células sin tratar con la droga. El número de bacterias extracelulares e intracelulares fue discriminado con doble marcación fluorescente y cuantificado mediante microscopía de fluorescencia. Los

núcleos de las células se tiñeron con DAPI. Las barras muestran el número de bacterias totales adheridas por célula de la periferia y el número de bacterias totales adheridas por célula del centro de la isla en células sin tratar (-Nistatina) o tratadas con nistatina (+Nistatina). Se muestra la media \pm DE de tres experimentos independientes realizados por triplicado. El número de bacterias totales por célula periférica en ausencia de nistatina difiere significativamente del resto de las condiciones ($*p < 0,05$ ANOVA).

Existen varios dominios de unión ya descritos para FHA. En particular, existe un dominio del tipo lectina inhibible por heparina que es relevante en la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales [107], [109]. Este dominio de unión interacciona con polisacáridos sulfatados cuya expresión se encuentra aumentada en la membrana basolateral de células epiteliales polarizadas [350]. Teniendo esto en cuenta, se analizó el rol de este dominio en la interacción de *B. pertussis* con la membrana basolateral mediante la realización de ensayos de competencia con heparina. Para esto se pre incubaron las bacterias con heparina durante 15 minutos y luego se incubaron, manteniendo la heparina, con islas de células polarizadas. Como control se realizó la infección en ausencia de heparina con bacterias sin pre incubar con la misma. La Figura 12 muestra que la presencia de heparina determinó una disminución significativa de la adhesión a las células de la periferia mientras que la adhesión a las células centrales no se modificó. Esto indica que el dominio de unión a heparina de FHA es el principal involucrado en la adhesión a la membrana basolateral expuesta en las células periféricas. Además de esto, la ausencia de diferencias en adhesión a células centrales sugiere que este dominio no está involucrado en la adhesión a la membrana apical.

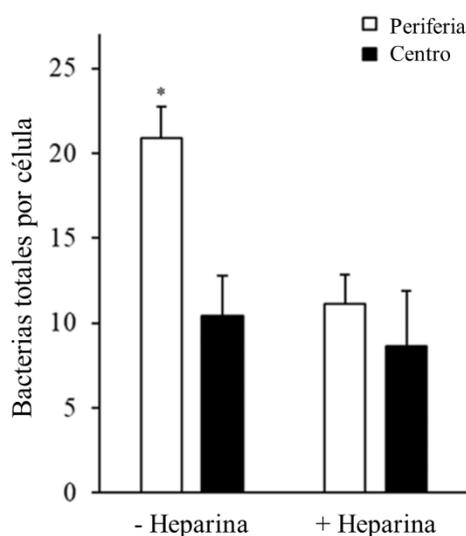


Figura 12. Rol del dominio inhibible por heparina de FHA en la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales que exponen membrana basolateral. Células bronquiales 16HBE14o- polarizadas durante siete días en forma de islas fueron incubadas en presencia de 1 mg mL^{-1} heparina con *B. pertussis* (Bp, MOI:20) pretratada con heparina durante 15 minutos (+ Heparina). Como control se incubaron células bronquiales 16HBE14o- polarizadas durante siete días en forma de islas con *B. pertussis* sin pretratar con heparina (- Heparina). En ambos casos, transcurridas 5 horas a 37°C las células fueron lavadas con PBS y fijadas para su tinción. El número de bacterias adheridas fue detectado por doble tinción fluorescente y cuantificado mediante microscopía de fluorescencia. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI. Las barras muestran el número de bacterias totales por célula de la periferia en presencia o en ausencia de heparina. Se muestra la media \pm DE de dos ensayos independientes realizados por triplicado. El número de bacterias totales por célula periférica en ausencia de heparina difiere significativamente del resto de las condiciones.

3.2.7. Tráfico intracelular de *B. pertussis*

Con el fin de investigar el tránsito intracelular de *B. pertussis* luego de ser internalizada por las células epiteliales se emplearon marcadores y microscopía confocal. Para esto, células polarizadas durante siete días se incubaron con *B. pertussis* durante cuatro horas, fueron lavadas para eliminar las bacterias no adheridas y luego incubadas con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares. Luego de esto, la concentración del antibiótico se redujo a niveles bacteriostáticos hasta el final del ensayo. Transcurridas 5 y 48 horas post infección, muestras de células se fijaron y tiñeron para su análisis por microscopía confocal. En la Figura 13 se observa que alrededor del 90% de las bacterias internalizadas colocalizan con el marcador de endosoma tardío LAMP-2 tanto a tiempos tempranos como tardíos post infección. Por su parte, la colocalización de *B. pertussis* con el marcador de lisosomas catepsina D fue bajo a las 5 horas y no aumentó a tiempos largos post infección, sugiriendo que *B. pertussis* podría inhibir la fusión fagolisosomal y permanecer en compartimentos con características de endosomas tardíos no degradativos a juzgar por la ausencia de marcadores lisosomales en la mayoría de los fagosomas.

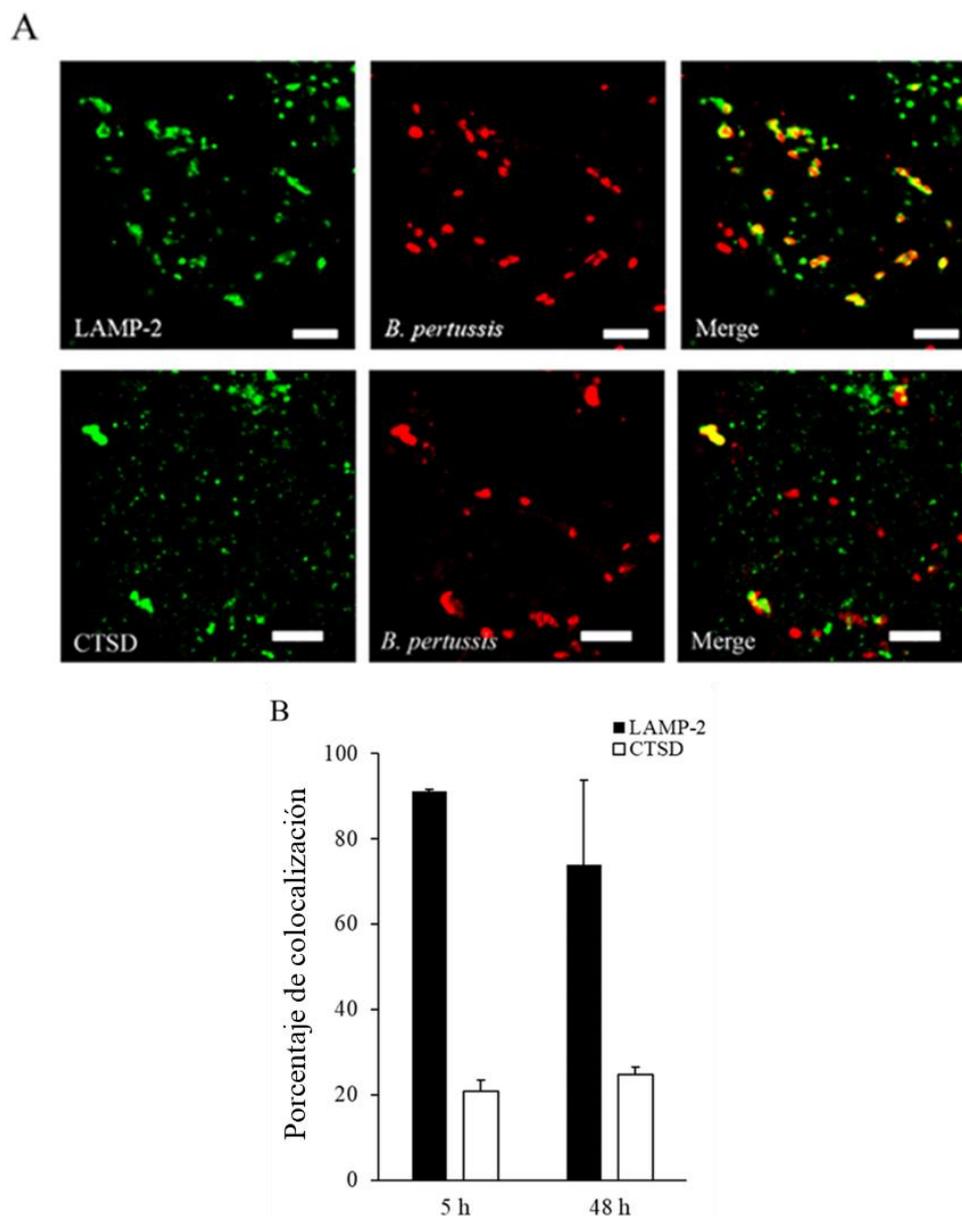


Figura 13. Tráfico intracelular de *B. pertussis* en células epiteliales polarizadas. Células bronquiales 16HBE14o- polarizadas durante siete días en forma de islas fueron incubadas con *B. pertussis* (MOI 20) durante 4 horas a 37°C, lavadas e incubadas con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares. A las 5 y 48 horas post infección muestras de células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y permeabilizadas. Las bacterias se detectaron utilizando sueros policlonales de conejo dirigidos contra *B. pertussis* seguido de fracciones F(ab')₂ de anticuerpos de cabra contra conejo conjugados con Cy3 (rojo). El marcador LAMP-2 (CD107b) se detectó utilizando anticuerpos monoclonales de ratón seguido de fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de burro contra ratón conjugados con Alexa-647 (verde). La Catepsina D fue detectada con anticuerpos monoclonales de ratón seguido de fragmentos F(ab')₂ de anticuerpo de burro contra ratón conjugado con Alexa-647

(verde). **A)** Imágenes representativas de tres experimentos independientes. **B)** Las barras muestran el porcentaje de las bacterias internalizadas que colocalizan con cada marcador a 5 y 48 horas post infección. La figura muestra la media \pm DE de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Dado que *B. pertussis* parece alojarse mayoritariamente en fagosomas con marcadores de endosomas tardíos, se evaluó si la bacteria tiene acceso a nutrientes provenientes del entorno extracelular a través de las vías de reciclaje tal como se describió en macrófagos en los que *B. pertussis* reside en fagosomas con características de endosoma temprano [273]. Para ello, células polarizadas durante siete días se incubaron con *B. pertussis* durante cuatro horas, se lavaron para eliminar las bacterias no adheridas y luego se incubaron con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares. Luego de esto, la concentración del antibiótico se redujo a niveles bacteriostáticos hasta el final del ensayo. Transcurridas 48 horas post infección las células fueron incubadas con transferrina conjugada con un fluoróforo y se evaluó la colocalización de este marcador con las bacterias internalizadas. La Figura 14 muestra bacterias colocalizando con este marcador, lo cual sugiere que efectivamente las bacterias intracelulares tienen acceso a nutrientes extracelulares a través de las vías de reciclaje.

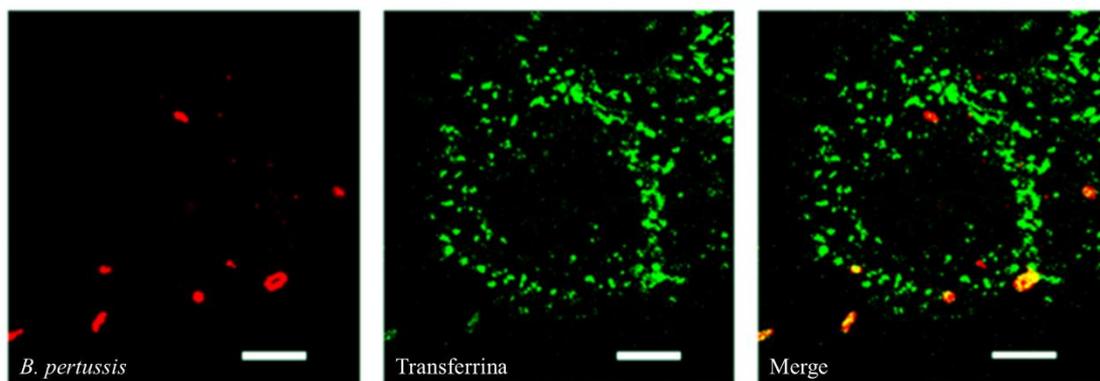


Figura 14. Acceso de *B. pertussis* a nutrientes extracelulares mediante la vía de reciclaje en células epiteliales polarizadas. Células bronquiales 16HBE14o- polarizadas durante siete días en forma de islas fueron incubadas con *B. pertussis* (MOI 20) durante 4 horas a 37°C, lavadas e incubadas con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares. A las 48 horas post infección las células fueron incubadas con transferrina-Alexa-594 (verde) por 30 minutos. Luego de esto las células fueron lavadas, fijadas, y las bacterias se detectaron utilizando sueros policlonales de conejo dirigidos contra *B. pertussis*

seguido de fracciones F(ab')₂ de anticuerpos de cabra contra conejo conjugados con Cy3 (rojo). Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. Barra de escala: 5 μm.

3.2.8. Sobrevida intracelular de *B. pertussis*

Tomados en conjunto, los resultados de las Figuras 13 y 14 sugieren que la mayoría de las bacterias inhiben la fusión fagolisosomal permaneciendo en fagosomas con características de endosomas tardíos y tienen acceso a nutrientes extracelulares incluso a tiempos largos post infección, un compartimiento con características de un nicho intracelular de persistencia. Con el fin de evaluar la viabilidad de *B. pertussis* intracelular se estudió la presencia de bacterias metabólicamente activas en localización intracelular por hibridación fluorescente *in situ* (FISH del inglés *fluorescence in situ hybridization*) a las 48 horas post infección. Esta técnica de tinción utiliza una sonda de ADN conjugada a un fluoróforo y con complementariedad al ARN ribosomal bacteriano. Ya que la viabilidad de la bacteria está relacionada con el número de ribosomas que contiene, la fluorescencia detectada permite en simultáneo confirmar la viabilidad y la ubicación intracelular de la bacteria. En paralelo se evaluó la colocalización de las bacterias viables con el marcador lisosomal LysoTracker. Para ello, células polarizadas durante siete días se incubaron con *B. pertussis* durante cuatro horas, fueron lavadas para eliminar las bacterias no adheridas y luego incubadas con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares. Luego de esto, la concentración del antibiótico se redujo a niveles bacteriostáticos hasta el final del ensayo. Transcurridas 48 horas post infección las células se incubaron con LysoTracker, se fijaron y las bacterias intracelulares se sometieron a la tinción por FISH. La Figura 15A muestra que luego de 48 horas de infección hay bacterias metabólicamente activas en localización intracelular y que las mismas no se encuentran en lisosomas.

Con el fin de confirmar la viabilidad de *B. pertussis* en localización intracelular se llevaron a cabo ensayos de protección al antibiótico polimixina B y recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). Los resultados de la Figura 15B muestran que se recuperó un gran número de UFC que no se modificó significativamente a lo largo del tiempo del ensayo, evidenciando un bajo nivel bactericida intracelular, lo cual sugiere, en vista de los resultados del tráfico intracelular, que *B. pertussis* permanece viable en endosomas tardíos dentro de las células epiteliales.

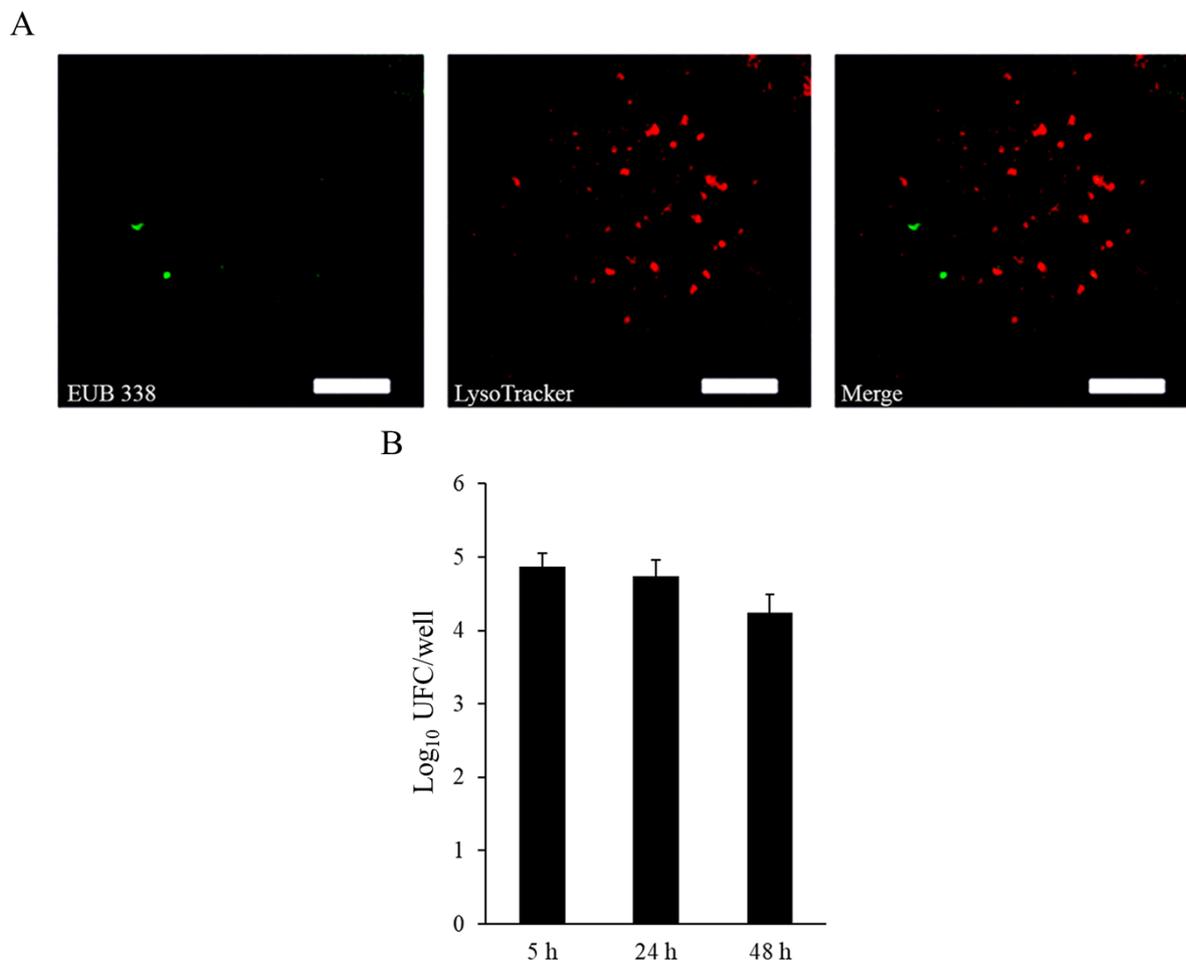


Figura 15. Hibridación fluorescente *in situ* y sobrevida intracelular de *B. pertussis* en células epiteliales polarizadas. A) Células 16HBE14o- polarizadas durante siete días en forma de islas fueron incubadas con *B. pertussis* (MOI: 20) durante 4 horas a 37°C, lavadas e incubadas con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares. A las 48 horas post infección las células fueron incubadas con LysoTracker (rojo) por 15 minutos y fijadas. Las bacterias intracelulares viables fueron marcadas por hibridación fluorescente *in situ* con la sonda EUB-338 conjugada con Alexa-488 (verde). Se muestran imágenes representativas de dos experimentos independientes B) Células 16HBE14o- polarizadas durante siete días fueron incubadas con *B. pertussis* durante 4 horas a 37°C, lavadas e incubadas con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares. A las 5 y 48 horas post infección, las células se lisaron y se determinó el número de unidades formadoras de colonias por pocillo. La figura muestra la media \pm DE de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado.

En conjunto, los ensayos de tráfico intracelular, los estudios de FISH y los de protección a antibiótico muestran una alta colocalización de las bacterias viables

internalizadas con LAMP-2, una baja colocalización con catepsina D, la nula colocalización con LysoTracker y una alta tasa de sobrevivencia intracelular, indicando que *B. pertussis* permanecería viable en endosomas tardíos no degradativos, que no se acidifican y que no contienen enzimas hidrolíticas. La existencia de estos endosomas tardíos que no se acidifican se evaluó analizando la colocalización entre LAMP-2 y LysoTracker en células infectadas. En la Figura 16 se observa que, si bien hay vesículas ácidas que contienen LAMP-2, no todas las vesículas que poseen este marcador se acidifican, indicando la existencia de compartimientos que reclutan LAMP-2 que podrían no ser degradativos, permitiendo que *B. pertussis* se mantenga viable en su interior.

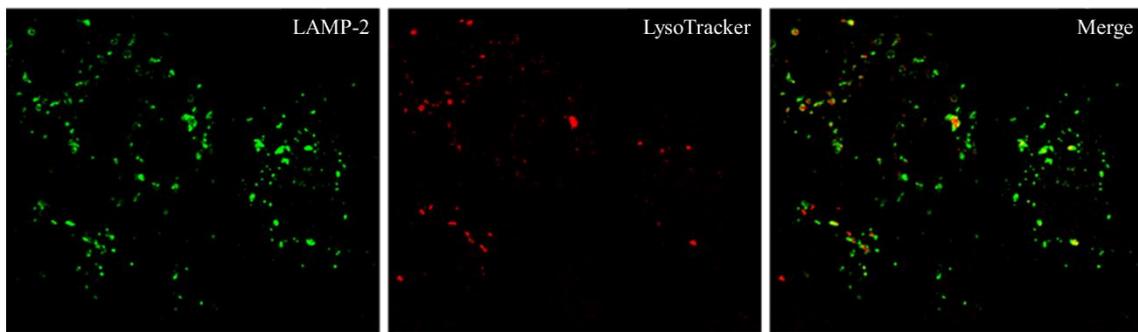


Figura 16. Vesículas no ácidas que acumulan el marcador LAMP-2. Células bronquiales 16HBE14o- polarizadas durante siete días fueron pulsadas con el marcador LysoTracker (rojo) por 15 minutos y fijadas con paraformaldehído al 4%. LAMP-2 (CD107b) se detectó utilizando anticuerpos monoclonales de ratón seguido de fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de burro contra ratón conjugados con el fluoróforo Alexa-647 (verde). Se muestra una imagen representativa de dos experimentos independientes.

3.3. Discusión

Bordetella pertussis ha sido históricamente considerado un patógeno extracelular, pero resultados previos de nuestro grupo [83], [87], [273], [371], [381] y corroborados por otros [184], [378], [379], [380] demostraron que puede actuar como un patógeno intracelular facultativo. Estos estudios demostraron que *B. pertussis* es capaz de sobrevivir a la interacción innata con células inmunes como macrófagos y neutrófilos, e incluso evitar la fusión fagolisosomal y la producción de especies reactivas de oxígeno en las mismas, favoreciendo así su sobrevida en localización intracelular en ambos tipos celulares [83], [87], [273], [274]. En particular en el caso de macrófagos, encontramos que esta capacidad de inhibir la fusión fagolisosomal y modular la actividad celular bactericida está ligada a la acción de dos de sus principales toxinas, CyaA y PT, [87], [273] y se vincula con la sobrevida intracelular de la bacteria dentro de endosomas tempranos con acceso a nutrientes. En base a estos hallazgos podría especularse que los macrófagos constituyen un reservorio o un nicho de persistencia para *B. pertussis*, tal como se observó para otros patógenos bacterianos de difícil control [414], [415], [416], [417]. Estudios previos también mostraron cierta capacidad de persistencia intracelular en células de origen epitelial, aunque con bajos niveles de sobrevida [257], [369], [370]. Nuestro grupo trabajó en un modelo epitelial alveolar [371] en el que se observaron resultados similares con muy bajos niveles de internalización y de sobrevida intracelular, pero con la capacidad de repoblar el medio extracelular desde la localización intracelular, demostrando la viabilidad de la bacteria en esta localización y abriendo la posibilidad de que el epitelio respiratorio sea entonces un nicho transitorio. En un intento por seguir evaluando esta hipótesis, en este trabajo de Tesis se estudió la importancia de la barrera epitelial respiratoria en el proceso de establecimiento de infecciones por *B. pertussis* y el potencial de las células del epitelio como un nicho de persistencia para esta bacteria empleando un modelo de estudio más relevante.

Los mecanismos de infección de *B. pertussis* se han estudiado utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* con los beneficios y limitaciones que implica cada uno. La principal limitación de los modelos *in vivo* radica en que *B. pertussis* es un patógeno humano y la extrapolación de resultados obtenidos con modelos de infección animales debe realizarse con precaución. En este sentido, los modelos más utilizados históricamente han sido los murinos que, si bien poseen algunas coincidencias con lo observado en humanos, la infección en si misma difiere considerablemente de lo que se observa en el hospedador natural [279], [280]. Recientemente se desarrolló un modelo de infección en primates no humanos que muestra mayores

similitudes con la infección en humanos, reproduciendo la sintomatología y las características clínicas típicas de la enfermedad como la tos, la leucocitosis, la colonización del tracto respiratorio y la transmisión entre individuos, constituyendo una herramienta útil para el estudio de la misma [225], [418], [419]. Los modelos *in vitro* son limitados porque generalmente se llevan a cabo con células de línea que han perdido las características de las células que les dieron origen perdiendo poder predictivo a pesar de ser más manejables y menos costosos que los modelos *in vivo* [420]. Una solución de compromiso entre estos dos tipos de modelos son los modelos *ex vivo* que comprenden tejidos epiteliales respiratorios obtenidos de humanos y cultivados en un ambiente artificial preservando aspectos relevantes de los modelos *in vivo*, pero aumentando la procesividad y reduciendo costos. La principal limitación de estos últimos suele ser la dificultad para obtener material, la acotada vida media de estas células y la inherente e inmanejable variabilidad entre donantes. Una alternativa entre estas posibilidades es emplear células inmortalizadas que hayan retenido las principales características de las células que le dieron origen. Estos modelos, aún con sus limitaciones, demostraron ser representativos de lo que ocurre *in vivo* y permitieron lograr avances significativos en el estudio de la barrera epitelial respiratoria y su respuesta a las infecciones por patógenos y a otros estímulos [384], [410], [421], [422], [423], [424], [425]. En este trabajo de tesis se empleó un modelo de estas características para estudiar la interacción de *B. pertussis* con el epitelio respiratorio.

El epitelio respiratorio constituye la primera barrera a la invasión de patógenos y es un actor importante en el montaje de la respuesta inmune del hospedador [395]. Existen, sin embargo, patógenos capaces de vulnerar esta barrera y/o los mecanismos inmunes asociados a la misma y desarrollar infecciones en el tracto respiratorio [396]. Una de las consecuencias de vulnerar esta barrera es el desarrollo de infecciones intracelulares que permite a los patógenos acceder a un ambiente protegido y con acceso a nutrientes [396], [397]. Los resultados mostrados en este capítulo indican que *B. pertussis* podrían vulnerar la barrera epitelial y desarrollar infecciones de este tipo en el epitelio respiratorio humano y revelan, además, nuevos aspectos de la interacción de *B. pertussis* con células epiteliales bronquiales. Los mismos sugieren un mecanismo de infección que se inicia con la adhesión bacteriana en cercanías de las uniones estrechas, seguido por la ruptura de estas estructuras mediante el efecto de toxinas. También sugieren que luego de la ruptura de las uniones estrechas y la exposición de la membrana basolateral, la adhesión y la internalización ocurriría con mayor eficiencia a través de esta membrana. Luego de la internalización, un alto porcentaje de bacterias internalizadas sobrevive en localización intracelular en vesículas con características

de endosomas tardíos que no son degradativos, no se acidifican y en las que *B. pertussis* tiene acceso a nutrientes extracelulares.

Estudios previos con distintos patógenos han indicado la relevancia de las uniones estrechas y de la existencia de membranas apical y basolateral diferenciales en la interacción entre distintos patógenos con células epiteliales. Por ejemplo, está descrito que *P. aeruginosa* interactúa con distintos receptores en membrana apical y basolateral a través de distintos factores de virulencia de la bacteria y promoviendo distintas respuestas en cada caso [350], [426]. También se demostró que *C. jejuni* [412] y *H. influenzae* [413] interactúan de manera diferencial con las membranas apical y basolateral promoviendo la invasión preferentemente a través de la última. Teniendo esto en cuenta, se buscó desarrollar un modelo con uniones estrechas formadas utilizando las células de línea de origen alveolar A549, previamente utilizadas en el estudio de *B. pertussis*. Los resultados de la puesta a punto indicaron que estas células no generan uniones estrechas funcionales a pesar de estar en confluencia ya sea en cultivo sumergido o en cultivo en interfase aire-líquido. Estos resultados motivaron la búsqueda de otro modelo capaz de representar esta característica. Se evaluó entonces un proceso de polarización *in vitro* utilizando células bronquiales 16HBE14o-. Estas células tienen la particularidad de haber retenido las características morfológicas y funcionales de las células bronquiales que les dieron origen, polarizarse y formar uniones estrechas según se describió previamente [384], [409], [410] y se verificó durante la puesta a punto en este trabajo de Tesis. Si bien el contacto inicial de *B. pertussis* con el hospedador ocurriría con células de origen nasofaríngeo y traqueal, resultados previos indican que la interacción con células bronquiales del tracto respiratorio inferior es relevante durante el proceso infeccioso. Estos estudios demostraron que en el modelo de infección con babuinos las bacterias estarían presentes principalmente en las zonas de conducción del tracto respiratorio que incluye tráquea, bronquios y bronquiolos, y en menor medida en la zona de intercambio gaseoso compuesta por los alveolos [373]. Además, estudios de autopsias de casos fatales de tos convulsa confirmaron la existencia de bacterias en localización tanto extracelular como intracelular en bronquios [21]. Estudios previos también han sugerido que la proteasa SphB1 escinde FHA expuesta en la superficie de las bacterias adheridas al epitelio traqueal y/o nasofaríngeo, dando lugar a la liberación de las mismas y posibilitando la dispersión desde las microcolonias iniciales hacia sectores del tracto respiratorio no colonizados como los bronquios [100].

Utilizando este modelo de epitelio bronquial polarizado en cultivo y con uniones estrechas formadas, se observó que *B. pertussis* adhiere en las cercanías o sobre las uniones

estrechas entre células epiteliales polarizadas. Este patrón de adhesión fue descrito previamente en otros patógenos como *P. aeruginosa* [427] y *E. coli* enteropatogénica [428] aunque no se profundizó en ninguno de los dos casos acerca de los mecanismos o factores involucrados. En el caso de *B. pertussis*, nuestros resultados indican que este tropismo de la bacteria hacia estas zonas podría estar mediado por la interacción de FHA con las balsas lipídicas presentes en las uniones estrechas. Las uniones estrechas están enriquecidas en este tipo de microdominios [357] y FHA, la principal adhesina de *B. pertussis* posee una gran afinidad por estas balsas según hemos observado en estudios anteriores [112]. La colocalización de la bacteria con el marcador de balsas lipídicas caveolina y la similitud entre los patrones de tinción de caveolina (marcador de balsas lipídicas) y ocludina (marcador de uniones estrechas) apoyan esta hipótesis.

Los resultados de este trabajo muestran que luego de la adhesión, *B. pertussis* es capaz de romper las uniones estrechas mediante un mecanismo dependiente principalmente, aunque no únicamente, de CyaA. Estudios previos llevados a cabo con la toxina purificada mostraron que la misma afecta la resistencia eléctrica transepitelial en monocapas de células epiteliales [93]. Los resultados aquí obtenidos indican que la toxina liberada por las bacterias durante la infección compromete la integridad de las uniones estrechas. Este proceso se vería favorecido por el patrón de adhesión de *B. pertussis* ya que las bacterias adheridas en cercanías de las uniones estrechas implicarían altas concentraciones locales de la toxina en esta zona en particular. Estudios realizados utilizando insertos semipermeables confirmaron que a tiempos cortos el efecto de esta toxina permite a *B. pertussis* atravesar la monocapa epitelial desde el compartimiento apical hacia el compartimiento basal. Además del rol de CyaA, los resultados de este trabajo de Tesis indican que *B. pertussis* posee otros mecanismos que le permiten atravesar la monocapa epitelial a tiempos más largos. En concordancia con esto, existen reportes que indican que otros factores de virulencia expresados por *B. pertussis* son capaces de vulnerar la barrera epitelial. Entre ellos, PT fue asociada a una disrupción transitoria de la función de barrera en células endoteliales [429]. También se reportó que la citotoxina traqueal estaría implicada en la ruptura de la barrera epitelial [256]. La actividad de estos factores podría explicar que a las 24 horas post infección también se hayan recuperado unidades formadoras de colonias de la cepa deficiente para CyaA en el compartimiento basal. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la infección con una cepa deficiente en CyaA, que expresa PT y TCT no modifica el patrón de tinción de ocludina a las 24 horas post infección. Esto podría explicarse porque en los estudios citados se utilizaron PT y TCT puras y en el diseño experimental utilizado en este trabajo las concentraciones locales de las

mismas podrían ser insuficientes para generar efectos apreciables por microscopia. De esta forma, la aparición de unidades formadoras de colonias de la cepa defectiva para CyaA en el compartimiento basal a las 24 horas después de la infección podría deberse a vulneraciones en las uniones estrechas promovidas por PT y TCT, que no son apreciables en el patrón de tinción de ocludina pero que permiten el pasaje de las bacterias al compartimiento basal. También podría ocurrir que en el lapso de 24 horas las bacterias atravesen la barrera epitelial por transporte transcelular, sobre todo teniendo en cuenta que ya se detectan bacterias internalizadas transcurridas cinco horas de infección.

Los resultados aquí presentados describen la relevancia de CyaA y la potencial contribución de otros factores en la ruptura de las uniones estrechas y la vulneración de la barrera epitelial durante la infección. Se desconocen aún las implicancias que podría tener para el proceso infeccioso general esta eventual capacidad de *B. pertussis* de atravesar el epitelio respiratorio. Este proceso podría promover la invasión de las células epiteliales o bien la diseminación del patógeno al espacio subepitelial o incluso al torrente sanguíneo. Si bien *B. pertussis* no es considerada una bacteria invasiva existen reportes de bacteriemia en pacientes inmunocomprometidos [430] resaltando la necesidad de estudios futuros que evalúen esta hipótesis en modelos de infección relevantes y en ausencia de comorbilidades. El conocimiento del mecanismo a través del cual CyaA rompería las uniones estrechas es otro aspecto que requiere la realización de más estudios, pero resultados previos permiten especular que podría estar mediado por la activación de las calpaínas del hospedador ya que algunos blancos de clivaje de estas proteasas dependientes de calcio serían proteínas de las uniones estrechas [431]. De esta forma, el aumento de cAMP inducido por CyaA conduciría a la activación de la proteína quinasa A (PKA) que a su vez activaría canales de calcio promoviendo el ingreso de este catión [432] y la activación de las calpaínas que degradan ocludina y otras proteínas que hacen a la integridad de las uniones estrechas [433]. Cabe destacar que también se describió que CyaA intoxica a las células epiteliales polarizadas con mayor eficiencia cuando está en contacto con la membrana basolateral [94]. Si bien son necesarios más estudios para dilucidar los mecanismos involucrados en este efecto polar de CyaA, el mismo podría explicarse por las diferencias en composición entre las membranas apical y basolateral. La translocación del dominio catalítico de CyaA ocurre a través de microdominios lipídicos ricos en colesterol luego de la unión de la toxina a estructuras glicosiladas presentes en los mismos [434] implicando que la mayor eficacia de translocación a través de la membrana basolateral podría deberse entonces a su composición particular. Otra posible explicación podría ser la localización de la fosfodiesterasa 4D en el lado

citoplasmático de la membrana apical. Esta fosfodiesterasa es regulada por la PKA activada por cAMP y su actividad constituiría una barrera que impida la difusión del segundo mensajero desde el lado apical [435], lo que haría menos efectiva la intoxicación por CyaA cuando su interacción es a través de esta membrana. Tomados en conjunto, los resultados de este estudio y los citados parecen sugerir un mecanismo de infección del epitelio pulmonar que comprende la adhesión bacteriana a balsas lipídicas en las cercanías o sobre las uniones estrechas y la liberación de la toxina CyaA que se internalizaría a través de las mismas balsas lipídicas y que compromete la funcionalidad de las uniones estrechas exponiendo la membrana basolateral. El acceso a esta membrana y la intoxicación más eficiente generaría de esta forma un bucle de retroalimentación positiva de ruptura de uniones estrechas e intoxicación que favorecería a su vez la internalización de *B. pertussis*. Además de ser secretada en forma soluble por las bacterias, se ha demostrado que esta toxina puede ser vehiculizada mediante vesículas de membrana externa [88], [406]. Estudios previos indican que estas vesículas son secretadas por *B. pertussis* en el entorno de infección [406], que transportan factores de virulencia bacterianos, entre ellos CyaA y PT activas, y que dichas toxinas vehiculizadas de esta forma presentan un efecto similar al de las toxinas solubles, pero con la ventaja de estar protegidas de proteasas que pudiera haber en el sitio de liberación [88]. En este contexto, y dado que la adhesina FHA también se encuentra presente en estas vesículas [88], se podría especular que tendrán un patrón de adhesión similar al de las bacterias que les dan origen, lo que originaría un aumento de la concentración de toxinas en el sitio de adhesión, resultando en un efecto sinérgico. En estudios preliminares realizados durante este trabajo de Tesis con vesículas de membrana externa de *B. pertussis* purificadas se observó este patrón de adhesión similar, pero no un efecto claro de las mismas sobre las uniones estrechas, probablemente debido a que las concentraciones de toxina vehiculizada por las mismas en nuestro diseño experimental no hayan sido suficientes para generar un efecto apreciable en la integridad de las uniones estrechas. Actualmente se están evaluando otros diseños experimentales para investigar esta potencial contribución.

La ruptura de las uniones estrechas expone la membrana basolateral y el espacio subepitelial. Los resultados presentados en este trabajo de Tesis muestran que *B. pertussis* adhiere preferentemente a la membrana basolateral indicando que el efecto de CyaA en las uniones estrechas favorecería esta interacción promoviendo de esta forma la infección. La mayor afinidad por la membrana basolateral fue previamente descrita para patógenos como *P. aeruginosa* [350] *E. coli* enteropatogénica [348], *H influenzae* [413] y *C jejuni* [412]. Los resultados indican que, si bien FHA está involucrada en la adhesión tanto a la membrana

apical como a la basolateral, la adhesión preferencial a la basolateral depende de esta adhesina ya que la ausencia de la misma determinó una caída mayor en la adhesión a células que exponen membrana basolateral que en las que únicamente exponen membrana apical, resultando en niveles de adhesión similares a ambas membranas. En concordancia con esto, en estudios realizados en paralelo a este trabajo de Tesis, resultados de nuestro grupo indicaron que el patógeno relacionado *B. parapertussis*, que también expresa FHA, posee también una afinidad preferencial por la membrana basolateral [385]. La interacción entre FHA y la membrana basolateral parece estar mediada por las balsas lipídicas presentes en la membrana, ya que la interferencia promovida por la nistatina afectó únicamente la adhesión a células que exponen esta membrana. FHA contiene distintos dominios de unión que median la adhesión a distintos receptores en las células del hospedador. Los más estudiados son el triplete Arg-Gly-Asp (RGD) involucrado en adhesión a fagocitos profesionales [102], [103], un dominio de unión a carbohidratos involucrado en la adhesión a macrófagos y células epiteliales [105], un dominio C-terminal también involucrado en unión a células inmunes y epiteliales [106] y un dominio de unión del tipo lectina que posee afinidad por heparina y otros polisacáridos sulfatados y estaría involucrado en adhesión a células epiteliales [107]. Los resultados de este trabajo indican que este último dominio está involucrado en la adhesión a la membrana basolateral ya que, en ensayos de competencia, la presencia de heparina determinó una disminución significativa en los niveles de adhesión bacteriana a las células que exponen esta membrana sin modificarlos en células que exponen únicamente la membrana apical. En concordancia con estos resultados, estudios previos han reportado la expresión polarizada de proteoglicanos modificados con polisacáridos sulfatados con un enriquecimiento de los mismos en la membrana basolateral [350]. La presencia de nistatina tuvo un efecto similar al agregado de heparina en la adhesión a células que exponen la membrana basolateral. Teniendo en cuenta que se ha documentado la asociación entre proteoglicanos modificados con polisacáridos sulfatados y las balsas lipídicas [436] sería esperable que el efecto de la nistatina en estas últimas también afecte la interacción entre FHA y los polisacáridos sulfatados. Además, la caída significativa de la adhesión a células que exponen únicamente membrana apical observada para la cepa defectiva en FHA sugiere que la adhesión a esta membrana estaría mediada mayoritariamente por otros dominios de la misma adhesina. También se deduce a partir de los resultados aquí presentados que *B. pertussis* posee otras adhesinas menores que permiten que la bacteria se adhiera a las células epiteliales en ausencia de FHA. Nuestros resultados también sugieren que, al igual que fue descrito para otros patógenos, *B. pertussis* es internalizada con mayor eficiencia a través de

la membrana basolateral. En este sentido, la expresión basolateral de la subunidad β_1 de la integrina $\alpha_5\beta_1$ (VLA-5) en células epiteliales polarizadas [437], [438] puede estar relacionada con esta tasa de internalización diferencial para este patógeno. Estudios previos indican que esta integrina está involucrada en la internalización de *B. pertussis* en células epiteliales alveolares y bronquiales mediante la interacción con el dominio RGD de FHA [104]. Teniendo en cuenta estos resultados previos y los aquí presentados se podría postular un mecanismo de internalización a través de la membrana basolateral en dos pasos para este patógeno. Este mecanismo comprendería una interacción inicial entre la bacteria y la membrana basolateral de la célula hospedadora mediada por polisacáridos sulfatados y el dominio de unión tipo lectina de FHA y un segundo paso de internalización de la bacteria mediado por la integrina $\alpha_5\beta_1$ y el dominio RGD de FHA, favorecido por la mayor concentración de esta integrina en la membrana basolateral. Se ha propuesto un mecanismo similar para especies del género *Chlamydia* en el cual existiría una primera interacción mediada por polisacáridos sulfatados y que llevaría a una posterior unión con receptores del hospedador como el receptor de manosa, el receptor del factor de crecimiento epidérmico o la integrina β_1 y que éstos mediarían la subsiguiente internalización del patógeno [439].

Nuestros resultados indican que *B. pertussis* internalizada por este tipo celular evade el tráfico intracelular bactericida en su mayoría. En este estudio se observó que las bacterias poseen acceso a nutrientes del entorno extracelular, una baja colocalización de las mismas con el marcador lisosomal catepsina D y altos niveles de sobrevida intracelular en los ensayos de protección a polimixina B, indicando que un porcentaje de las bacterias internalizadas están viables y no se encuentran en lisosomas degradativos 48 horas post internalización. Esto sugiere que, la mayoría de las bacterias serían capaces de evadir la fusión fagolisosomal tal como se observó en células inmunes [83], [273]. Sólo alrededor de un 20% de las bacterias internalizadas fueron encontradas colocalizando con el marcador de lisosomas degradativos catepsina D en ambos tiempos evaluados. Sin embargo, se observó un alto porcentaje de bacterias colocalizando con LAMP-2, un marcador de endosomas tardíos, tanto a tiempos cortos como tiempos largos post infección. También se observó que la mayoría de las vesículas positivas para LAMP-2 no colocalizan con el marcador LysoTracker, sugiriendo que *B. pertussis* podría permanecer viable en este tipo de compartimientos no degradativos ni ácidos. En estudios de colocalización de bacterias viables con el marcador de compartimientos ácidos LysoTracker se confirmó que las bacterias que permanecen viables no están en compartimientos ácidos. Estudios previos también reportaron la existencia de endosomas positivos para LAMP que no poseen marcadores de lisosomas degradativos como

catepsinas [440] y que varios patógenos bacterianos son capaces de sobrevivir en el interior de células epiteliales en este tipo de endosomas tardíos que no maduran a lisosomas. Entre ellos, *C. jejuni* [441], *B. cenocepacia* [442], *H. pylori* [443] y *E. coli* uropatógena [444] son ejemplos de patógenos que residen en vesículas que adquieren marcadores de endosomas tardíos como LAMP, pero no marcadores lisosomales como catepsinas.

Si bien se ha observado previamente la capacidad de *B. pertussis* de sobrevivir en localización intracelular en líneas celulares de origen epitelial y en modelos de cultivos primarios obtenidos a partir de muestras nasales y traqueales [257], [369], [370], [371], en el modelo bronquial polarizado utilizado en este estudio se observaron niveles más altos tanto de internalización como de supervivencia intracelular. El trabajo realizado por Lamberti y col. en nuestro grupo de investigación utilizó una línea celular de origen alveolar mientras que los trabajos de Gueirard y col. y de Bassinet y col. fueron ambos realizados utilizando una línea celular de origen traqueal, sin polarizar y en condiciones de cultivo subconfluentes con las limitaciones previamente descritas. Por su parte, Sivarajan y col. utilizaron modelos de infección con cultivos primarios aislados de muestras nasales y traqueales de donantes sanos y observaron diferencias en la interacción de *B. pertussis* con cada uno de ellos. Esto sugiere que las diferencias observadas en niveles de internalización y supervivencia observados entre los distintos modelos podrían deberse a que este patógeno interactúa de manera diferente con los distintos tipos celulares utilizados en cada estudio. Esto podría deberse a que los distintos tipos celulares y las distintas condiciones en las que se cultivan podrían expresar distintos tipos y cantidades de ligandos y receptores con los que interactúa *B. pertussis* y también podría ocurrir *in vivo* con los distintos tipos celulares presentes en cada zona del tracto respiratorio. De cualquier forma, los niveles observados en este modelo sugieren que el epitelio respiratorio puede haber sido previamente subestimado como nicho intracelular de persistencia. La habilidad de sobrevivir en el interior de las células del epitelio podría favorecer la persistencia en la barrera epitelial respiratoria del hospedador proveyendo un ambiente en donde el patógeno puede evitar mecanismos inmunes durante la etapa aguda de la infección y la respuesta del hospedador. Se ha documentado que *B. pertussis* es capaz de repoblar el medio al liberarse del entorno intracelular [371], por lo que también se podría especular que este estadio intracelular constituya una etapa del proceso infeccioso luego de la cual el patógeno podría proliferar en localización extracelular o infectar otros tipos celulares como los macrófagos o incluso otros individuos. Como se describió anteriormente, además de constituir la barrera física que recubre el tracto respiratorio, el epitelio posee un papel en la inmunidad. Mientras que la capacidad fagocítica y antibacteriana de las células epiteliales es

considerablemente menor que la de los fagocitos profesionales, el vasto número de las mismas implica una contribución relevante en la captación y eliminación de los patógenos, siempre y cuando estos no sean capaces de evitar esta respuesta defensiva. Teniendo esto en cuenta, los resultados aquí presentados sugieren que la sobrevida intracelular de *B. pertussis* en células epiteliales podría constituir una estrategia de patogénesis. Además de su actividad antimicrobiana, las células epiteliales responden a determinantes bacterianos secretando citoquinas que moldean la respuesta inmune desarrollada contra el patógeno invasor. En consecuencia, la respuesta montada por la barrera epitelial durante el desarrollo de la infección intracelular es determinante para el resultado de la infección. Teniendo en cuenta los mecanismos inmunomoduladores de *B. pertussis*, sería esperable que esta función inmune se encuentre afectada durante su infección, también aumentando de esta forma las chances del patógeno de sobrevivir en el hospedador.

Sumado a la actividad inmunomoduladora de esta bacteria, la capacidad de formar *biofilms* en el epitelio, y la de sobrevivir a la interacción con células del sistema inmune, estos resultados agregan ahora la capacidad de sobrevivir en localización intracelular en otro tipo celular relevante como el epitelio respiratorio al repertorio de estrategias de patogénesis de *B. pertussis*.

Capítulo 4

Evolución del proteoma de *Bordetella pertussis* en localización intracelular en células epiteliales

4. Evolución del proteoma de *Bordetella pertussis* en localización intracelular en células epiteliales

4.1. Introducción

Durante el establecimiento de una infección los patógenos se adaptan a las condiciones que encuentran en el hospedador a fin de resistir las defensas del mismo y colonizar el nicho [445], [446]. El estudio de la interacción entre patógeno y hospedador permite comprender mejor los procesos relevantes tanto para la defensa del hospedador como para la virulencia del patógeno y aportar, de esta forma, a las posibles soluciones para controlar las enfermedades infecciosas [445], [446], [447]. Un abordaje relevante y cada vez más utilizado para el estudio de esta interacción es la evaluación de los cambios en los niveles de expresión de las proteínas ya que estas son, en buena medida, responsables de las funciones y procesos biológicos [446]. Históricamente se ha estudiado el rol de factores bacterianos y del hospedador de forma aislada, utilizando mutantes específicos y moléculas que interfieren con la interacción del patógeno con el hospedador [447]. Si bien estos estudios aportaron significativamente al conocimiento de estos procesos, constituyen una visión acotada que posee sus limitaciones ya que existen cientos o miles de proteínas actuando durante la interacción entre el patógeno y el hospedador, y varias de estas proteínas pueden, a su vez, tener funciones redundantes [448]. El desarrollo de las herramientas ómicas ha permitido llevar este tipo de estudios a una escala global de genoma completo, superando las limitaciones de los estudios enfocados en factores individuales. El estudio sistemático a gran escala de las proteínas se engloba en el concepto de proteómica [446]. Este estudio generalmente comprende la separación, identificación y cuantificación de las proteínas de un sistema biológico en un determinado momento y permite evaluar el resultado de la interacción patógeno-hospedador a nivel proteico de una manera robusta y utilizando modelos de infección relevantes [445], [446], [447], [448], [449]. Cabe destacar, sin embargo, que existen diferencias cuando se aplica este tipo de herramientas al estudio de la respuesta del hospedador o al estudio de la adaptación del patógeno. Debido a la diferencia de tamaño entre ambos, en cualquier entorno de infección la cantidad de proteína del hospedador será mayor que la del patógeno [448], [449], por lo que en estos sistemas existen limitaciones y dificultades técnicas en cuanto a la determinación de las proteínas del patógeno. En general, esto es válido tanto para infecciones naturales como para modelos de infección *in vivo*, *ex*

vivo e *in vitro*, y vuelve notoriamente más complejo el análisis del patógeno. Por este motivo, una estrategia utilizada para el estudio de la adaptación de patógenos a un entorno determinado es realizar el cultivo *in vitro* del patógeno en condiciones que simulen las condiciones de infección, en ausencia de componentes del hospedador [447], [450]. De esta forma, se han realizado distintos abordajes ómicos de patógenos sometidos a condiciones ambientales de temperatura, pH, limitación de nutrientes y diferentes tipos de estrés que se espera que encuentre durante la infección. Naturalmente, si bien estos estudios permiten comprender mecanismos de adaptación del patógeno a distintas condiciones, la posibilidad de entender cómo es el proceso de adaptación en un nicho real queda acotada por la dificultad para simular las condiciones del mismo [448], [451]. Por esta razón se destinan cada vez más esfuerzos a la obtención de muestras de buena calidad de patógenos provenientes de su respectivo entorno de infección.

Los patógenos pueden establecer su relación con el hospedador de diversas formas. Pueden interactuar con un tipo celular determinado ubicado en un tejido u órgano específico y establecer infecciones extra o intracelulares. La principal dificultad para el análisis del proteoma de un patógeno intracelular es la correcta detección e identificación de proteínas del patógeno en un entorno contaminado con proteínas del hospedador [447], situación que se da habitualmente por la gran proporción de proteínas del hospedador respecto a las del patógeno en estos sistemas. Debido a esto, el proceso de aislamiento del patógeno de las células del hospedador es crítico para facilitar el análisis. El primer paso de este proceso de separación comprende la ruptura de las células mediante un método que no perjudique al patógeno ni la calidad de la muestra de proteínas a analizar. Las estrategias utilizadas generalmente implican lisis por presión osmótica [417], [452], sonicación [453], [454], [455] o detergentes [456]. Una vez lisadas las células se procede a la separación del patógeno de los restos celulares y proteínas del hospedador. Entre las estrategias más empleadas para este último paso se encuentran la centrifugación diferencial [417], [452], [453], [454], [455], [456], la separación inmunomagnética [451] y la separación asistida por citometría de flujo [447], [457].

Las dos metodologías más empleadas para el estudio del proteoma son la electroforesis en geles bidimensionales de poliacrilamida (2D-GE) o bien el análisis global de tipo *shotgun* independiente de gel mediante cromatografía líquida (LC) acoplada a espectrometría de masas en tándem (MS/MS). La primera metodología comprende una separación inicial de las proteínas de la muestra en geles de poliacrilamida mediante una electroforesis bidimensional. Esta técnica permite separar las proteínas de acuerdo a su punto

isoelectrico en una dimensión y de acuerdo a su masa en la otra dimensión. Ya que la poli(acrilamida) posee una absorbancia similar a la de las proteínas, estas últimas deben ser teñidas para su visualización y cuantificación una vez separadas. Para esta tinción suelen utilizarse plata y/o el *Coomassie blue*. Luego de esto, las proteínas individuales son recuperadas del gel y digeridas utilizando enzimas proteolíticas. Los péptidos resultantes de la degradación son analizados mediante espectrometría de masas para la identificación proteica. Esta metodología presenta varios inconvenientes, como un rango dinámico acotado, un poder de resolución que suele ser insuficiente para separar por completo todas las proteínas de una muestra compleja, sobre todo en rangos altos y bajos de pesos moleculares, y que requiere grandes cantidades de muestra [458]. Un estudio del proteoma por 2D-GE requiere una muestra del orden de 10^8 bacterias. Ya que generalmente es difícil aislar esta cantidad de bacterias del entorno intracelular, tanto *in vivo* como *in vitro*, para estudios del proteoma de patógenos intracelulares los métodos de análisis global basados en nano-LC-MS/MS resultan más adecuados. La mayor sensibilidad de este tipo de análisis permite identificar y analizar alrededor de un millar de proteínas utilizando muestras de aproximadamente 10^6 células bacterianas [459]. El procedimiento general de este método consiste en una completa digestión enzimática de la muestra proteica y una posterior separación de los péptidos obtenidos mediante nano cromatografía líquida capilar (nano-LC) [460]. Estos péptidos son identificados y cuantificados mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS). La principal diferencia entre el análisis por 2D-GE y el de tipo *shotgun* es que en este último no son las proteínas las que se separan y cuantifican, sino que son los péptidos que se obtuvieron a partir de la degradación de las proteínas presentes en la muestra [460]. Una vez identificados, los péptidos se mapean contra las secuencias codificadas por el genoma de referencia para asignarlos a las proteínas que los originaron. La cantidad de péptidos que se recupera de cada proteína se usa para cuantificar la abundancia relativa de esa proteína en la muestra original. Para identificar y cuantificar proteínas por espectrometría de masas se pueden aplicar distintas estrategias, divididas principalmente en metodologías con etiquetas y metodologías sin etiquetas. Las metodologías sin etiquetas emplean el recuento espectral y la cuantificación se realiza a partir de la intensidad de señal de espectrometría de masa de los iones derivados de cada péptido [461]. Las metodologías con etiquetas, en cambio, utilizan el etiquetado de los péptidos con isótopos a fin de imprimirles una etiqueta de masa específica que luego será reconocida por un espectrómetro de masas y proporcionará la base para la cuantificación [462].

Como se mencionó previamente en este trabajo de Tesis, *B. pertussis* ha sido históricamente considerada un patógeno extracelular, pero resultados obtenidos por nuestro grupo y otros de la temática indican que es capaz de sobrevivir en el interior de células hospedadoras fagocíticas profesionales y células de otros tipos [83], [184], [273], [371], [378], [379], [380]. Nuestro grupo encontró evidencia que sugiere que los macrófagos podrían constituir nichos de persistencia para esta bacteria. La existencia de infecciones intracelulares podría explicar la epidemiología de esta enfermedad y la dificultad para controlar la circulación de este patógeno en la población. Los estudios descritos en el Capítulo 3 sugieren que *B. pertussis* es capaz de acceder al espacio intracelular y también persistir en localización intracelular en células del epitelio respiratorio. Como se mencionó previamente, el establecimiento de una infección intracelular requiere que el patógeno sea capaz de evadir los mecanismos de defensa de la célula hospedadora y ajustar su metabolismo a las condiciones de entorno y de disponibilidad de nutrientes. Estos cambios adaptativos se reflejan, principalmente, en modificaciones en la abundancia y la actividad de factores proteicos. Con el fin de evaluar el potencial del epitelio respiratorio como nicho de persistencia para *B. pertussis*, y avanzar en la comprensión de su biología y los mecanismos de supervivencia, en este capítulo se estudió la adaptación de este patógeno al entorno intracelular en células del epitelio respiratorio a través del análisis del proteoma bacteriano a lo largo de la infección intracelular. Para ello se analizó el proteoma de bacterias aisladas de localización intracelular en células epiteliales a las 5 y 48 horas post infección, y de las bacterias infectantes para ser usadas como control. Para llevar a cabo este estudio la ruptura de las células hospedadoras se llevó a cabo por sonicación y centrifugación diferencial, un método de recuperación de bacterias intracelulares eficiente, rápido, de bajo costo, que fue utilizado con éxito en otros estudios similares [274], [417], [452], [454]. El análisis de las muestras se llevó a cabo empleando nano-LC-MS/MS sin etiquetas debido a que requiere menor cantidad de muestra y tiene una mejor cobertura y rango dinámico que las metodologías con etiquetas [463]. El criterio utilizado para la elección de muestras intracelulares de 5 y 48 horas post infección fue observar una primera adaptación a la localización intracelular a las 5 horas y un estadio tardío de adaptación a las 48 horas, que reflejaría la adaptación a largo plazo en el entorno intracelular en el que la bacteria estaría adaptada a compartimentos con características de endosoma tardío, LAMP positivos, pero sin enzimas hidrolíticas como catepsina D ni acidificados según se demostró en el capítulo anterior.

4.2. Resultados

4.2.1. Puesta a punto de la infección y el aislamiento de bacterias intracelulares

En primera instancia se trabajó en la puesta a punto de un protocolo de infección que permitiera obtener las cantidades necesarias de muestra de bacterias internalizadas para realizar el estudio proteómico. Tal como se trabajó en el capítulo anterior, la infección comprendió una incubación inicial de las células epiteliales 16HBE14o- polarizadas y con uniones estrechas formadas con *B. pertussis* durante 4 horas, lavados para eliminar las bacterias no adheridas, una incubación de una hora más para facilitar la internalización de las bacterias aún adheridas a la superficie celular, y luego la inactivación de las bacterias extracelulares mediante la incubación con antibiótico. Con el fin de disminuir el número de bacterias que pudieran permanecer en superficie sin internalizar y de disminuir la interferencia que pudieran generar en la determinación del proteoma de las bacterias intracelulares, se ajustó la multiplicidad de infección y se ensayaron estrategias de eliminación de las mismas. En primer lugar, se evaluó la posibilidad de promover la eliminación de las bacterias extracelulares aún adheridas luego del tratamiento con polimixina B, utilizando una segunda incubación con tripsina, adicional a la necesaria para levantar las células del pocillo. La tripsina no solo ayuda a romper el anclaje de la célula a la superficie del pocillo, sino que también remueve las bacterias adheridas a superficie ya que las adhesinas de *B. pertussis* son fundamentalmente de naturaleza proteica. Para esto, las células infectadas se incubaron con tripsina y, una vez en suspensión, se dividieron en dos alícuotas. Una se fijó y la otra se lavó con PBS y se incubó nuevamente con tripsina previo a la fijación. Una vez fijadas, ambas alícuotas fueron sometidas a doble tinción fluorescente para evaluar los niveles de adhesión e internalización en cada caso. Este análisis reveló que la cantidad de bacterias adheridas luego de la segunda incubación con tripsina no disminuyó significativamente en comparación con el número de bacterias adheridas luego de la primera incubación. Además, el número de células recuperadas luego de la segunda incubación con tripsina fue significativamente menor, disminuyendo consecuentemente la cantidad de muestra de bacterias intracelulares que podrían obtenerse de las mismas para el análisis del proteoma. Debido a esto, se optó por realizar una única incubación con tripsina para levantar las células del pocillo. Se evaluaron también distintas multiplicidades de infección para maximizar la relación entre bacterias internalizadas y bacterias totales. Los ensayos de infección descritos en el Capítulo 3 mostraron que luego de la incubación de la monocapa con una multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula, el número de bacterias

internalizadas por célula es levemente menor a 0,1. Teniendo esto en cuenta y a fin de aumentar el número de bacterias internalizadas se evaluaron multiplicidades de infección mayores. Las células infectadas con distintas multiplicidades de infección se incubaron con tripsina para levantar las células del pocillo y las bacterias fueron sometidas a una doble tinción fluorescente para evaluar los niveles de adhesión e internalización por microscopía de fluorescencia. La Figura 1 muestra que al aumentar la multiplicidad de infección a 100 bacterias por célula el número de bacterias internalizadas por célula aumenta hasta 0,6 con un porcentaje de internalización cercano al 80%, y unas 0,15 bacterias extracelulares por célula. Además, la Figura 1 muestra que, al aumentar la multiplicidad de infección a 200 bacterias por célula, el número de bacterias internalizadas por célula se mantiene similar pero con un porcentaje de internalización cercano al 60%, determinando que en este caso el número de bacterias extracelulares por célula sea de 0,4. Ya que para el estudio se buscaba maximizar tanto las bacterias internalizadas por célula como el porcentaje de internalización se optó por realizar los ensayos con la multiplicidad de infección igual a 100 bacterias por célula.

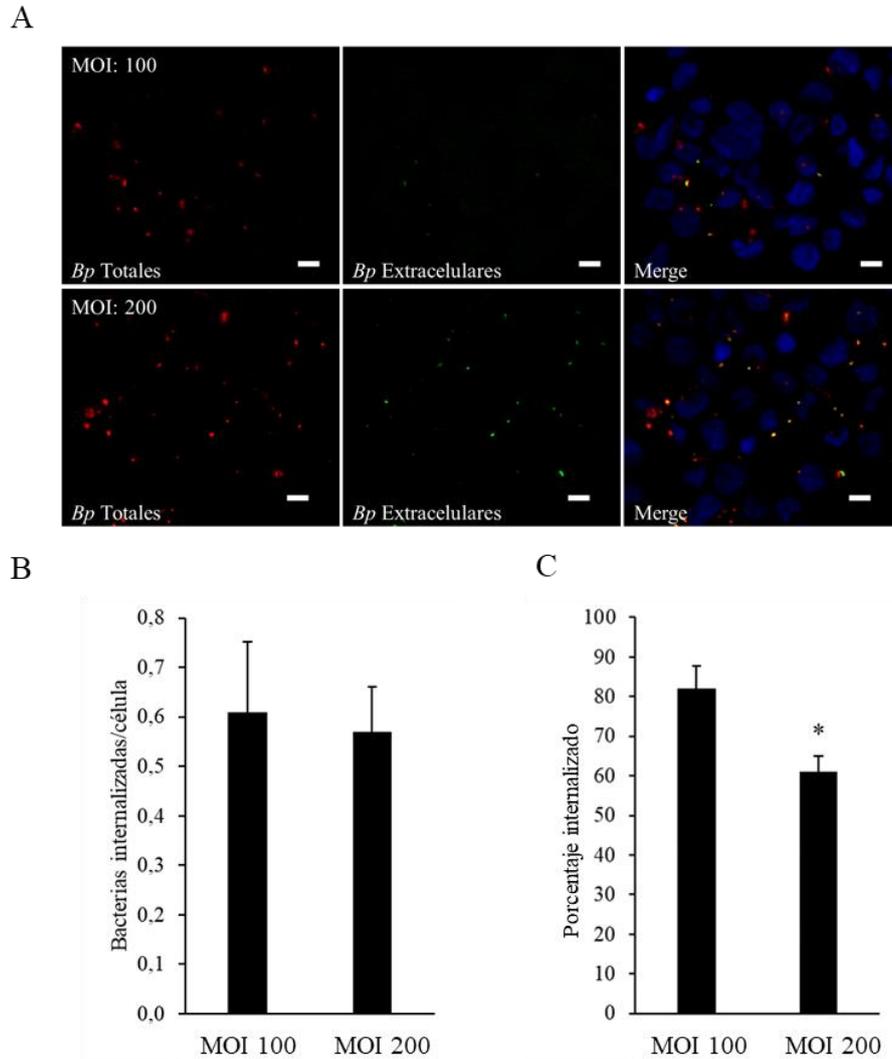


Figura 1. Efecto de la multiplicidad de infección en el número de bacterias internalizadas y en el porcentaje de internalización. Células 16HBE14o- polarizadas durante siete días fueron incubadas con *B. pertussis* a diferentes multiplicidades de infección (MOI) por 4 horas a 37°C, lavadas, e incubadas durante una hora adicional. Luego de esto fueron incubadas con polimixina B durante una hora, incubadas con tripsina y sometidas a dobles tinción fluorescente para evaluar la adhesión e internalización. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI. **A)** Imagen representativa de las bacterias totales e internalizadas. **B)** Número de bacterias internalizadas por célula. **C)** Porcentaje internalizado del total de las bacterias asociadas. En cada caso se muestra la media \pm DE de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El porcentaje internalizado en la infección realizada con la MOI de 200 bacterias por célula difiere significativamente del de la infección realizada con la MOI de 100 bacterias por célula. * $P < 0,05$ t-test de Student.

En varios modelos de infección *in vitro* se ha utilizado una centrifugación a baja velocidad para favorecer la interacción entre el patógeno y células epiteliales adheridas. A fin de evaluar el efecto de este diseño experimental se realizó la infección según se describió en el apartado anterior empleando una centrifugación a baja velocidad para favorecer la interacción. Ensayos sin centrifugación se llevaron a cabo en paralelo como control. Como se observa en la Figura 2, en este modelo de infección la centrifugación favoreció la adhesión total pero no la internalización, resultando en un mayor número de bacterias adheridas a la superficie celular y un menor porcentaje de internalización. Al no presentar beneficios se optó por no centrifugar durante la infección.

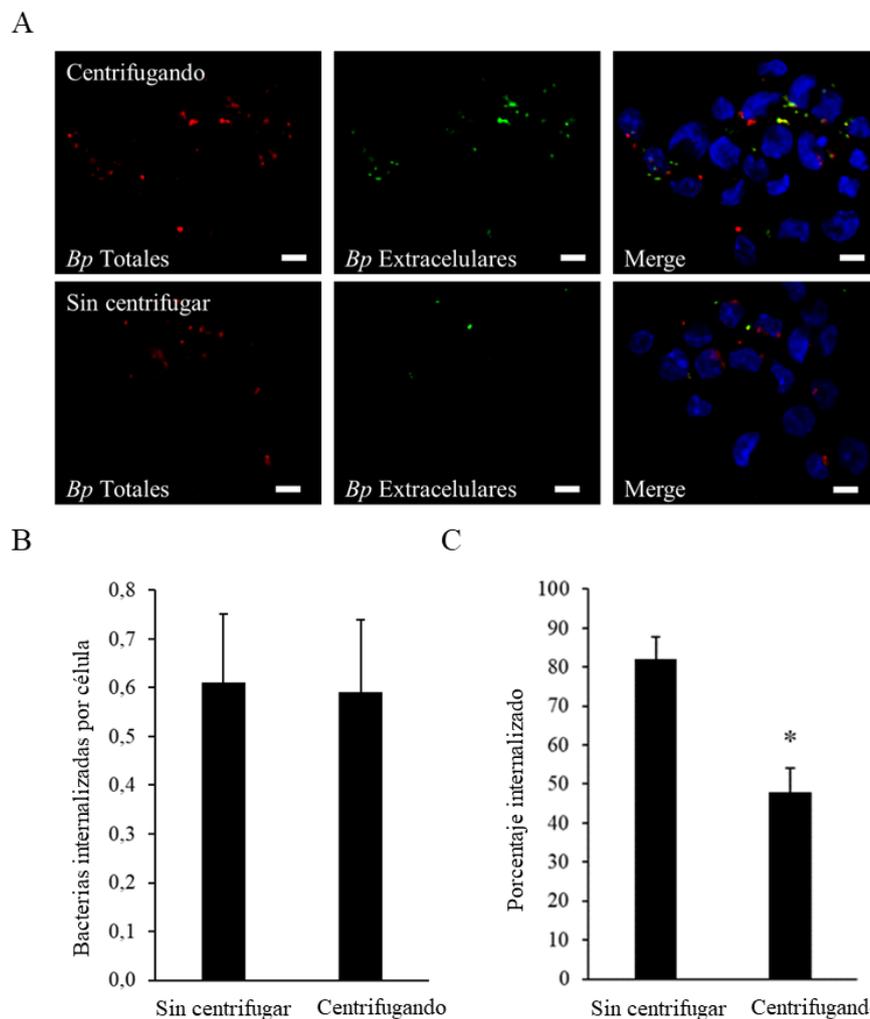


Figura 2. Efecto de la centrifugación en el número de bacterias internalizadas y en el porcentaje de internalización. Células 16HBE14o- polarizadas durante siete días fueron incubadas con *B. pertussis* (MOI:100) por 4 horas a 37°C con o sin centrifugación al inicio de la infección, lavadas, e incubadas a 37°C durante una hora adicional. Luego de esto

fueron incubadas con polimixina B durante una hora, incubadas con tripsina y sometidas a dobles tinción fluorescente para evaluar la adhesión e internalización. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI. **A)** Imagen representativa de las bacterias totales e. **B)** Número de bacterias internalizadas por célula. **C)** Porcentaje internalizado del total de las bacterias asociadas. En cada caso se muestra la media \pm DE de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El porcentaje internalizado de la infección realizada sin centrifugar difiere significativamente del de la infección realizada centrifugando. $P < 0,05$ t-test de Student.

El siguiente paso fue determinar el número de células a infectar que permitieran obtener, luego de la purificación, un número de bacterias intracelulares adecuado para la identificación y cuantificación de proteínas en el estudio proteómico. Para ello, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la puesta a punto, la infección comprendió una incubación inicial de las células con *B. pertussis* a una multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula durante 4 horas sin centrifugar al comienzo. Luego se realizaron lavados para eliminar las bacterias no adheridas, una incubación de una hora más para facilitar la internalización de las bacterias aún adheridas a la superficie celular y luego la inactivación de las bacterias extracelulares mediante incubación con polimixina B. Transcurridas 5 o 48 horas las células se levantaron por incubación con tripsina, y un número conocido de células fue lisado y empleado para la recuperación de las bacterias intracelulares por centrifugación diferencial en gradiente de sacarosa según se describe en la sección de materiales y métodos. Debido a que la recuperación por centrifugación diferencial no puede realizarse en condiciones de esterilidad el número de bacterias recuperadas no puede determinarse por recuento de unidades formadoras de colonias. Además, debido al tamaño de *B. pertussis*, tampoco es posible realizar recuentos bacterianos por microscopía en cámara de Neubauer. Para estimar este número entonces se realizó un recuento mediante microscopía de fluorescencia previamente utilizado por nuestro grupo en el aislamiento de bacterias intracelulares aisladas de macrófagos [274]. Para tal fin se tomaron cultivos de *B. pertussis* con densidad óptica conocida y se incubaron con el fluoróforo yoduro de propidio. Luego de esto se hicieron diluciones y un volumen conocido de estas se filtró a través de membranas de policarbonato con poros de 0,22 μm de diámetro. Las membranas fueron analizadas por microscopía de fluorescencia para cuantificar la cantidad de bacterias por campo, en campos seleccionados al azar. Esto permitió obtener una curva que correlaciona el número de bacterias en una muestra líquida con el número de bacterias encontradas en un campo de microscopía. Utilizando esta

curva y aplicando este procedimiento de tinción, filtración y análisis por microscopía sobre muestras provenientes del aislamiento de *B. pertussis* intracelular se estimó el número de bacterias presentes en las muestras. En la Figura 3 se muestran imágenes representativas de membranas luego de filtrar suspensiones con diferentes cantidades de bacterias y luego de filtrar una muestra obtenida luego del aislamiento de *B. pertussis* intracelular. Las muestras analizadas presentaron entre 2×10^7 y 4×10^7 bacterias que provenían de alrededor de 5×10^7 células. A partir de estos datos se estimó un número de células a infectar para recuperar la cantidad necesaria de bacterias para el análisis del proteoma.

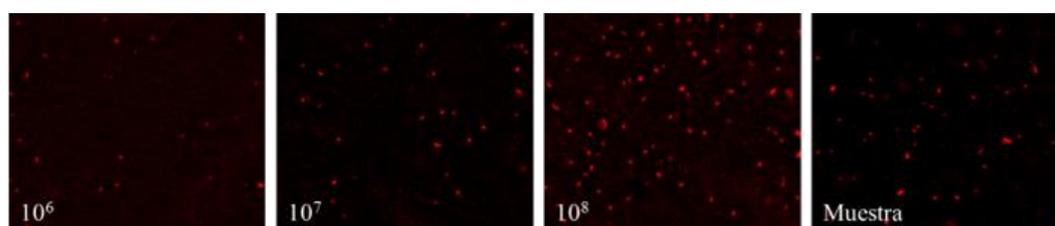


Figura 3. Estimación del número de células a infectar. Cantidades conocidas de bacterias (10^6 , 10^7 o 10^8) se incubaron con el fluoróforo yoduro de propidio, se diluyeron en 10 mL de PBS y se filtró todo el volumen a través de membranas de policarbonato con poros de $0,22 \mu\text{m}$ de diámetro. En paralelo, bacterias intracelulares recuperadas luego del aislamiento por centrifugación diferencial se sometieron al mismo procedimiento de dilución y filtrado (Muestra). Secciones de las membranas fueron analizadas por microscopía de fluorescencia para determinar el número de bacterias presentes en campos al azar. Se muestran campos representativos de cada condición.

4.2.2. Análisis del proteoma de *B. pertussis* en localización intracelular

4.2.2.1. Análisis global

Para el estudio de la evolución del proteoma bacteriano en localización intracelular se analizó, según se mencionó previamente, el proteoma de bacterias aisladas a las 5 y 48 horas post infección y el proteoma de bacterias recuperadas del sobrenadante de infección a las 4 horas, para ser usado como control de bacterias infectantes. Además de esto, como control interno del proceso de purificación se mezclaron bacterias con células con una relación de 100 bacterias por célula. Se generaron varias alícuotas de esta mezcla y se conservaron a -80°C . En el procesamiento de cada replicado biológico para obtener muestras intracelulares de 5 y 48 horas, se descongeló una alícuota de esta mezcla y fue sometida al proceso de

purificación en paralelo con las muestras. Las bacterias aisladas del entorno intracelular, las infectantes obtenidas del entorno extracelular (control) y las recuperadas del control interno de purificación fueron liofilizadas y enviados para su análisis. Para el análisis, las muestras liofilizadas fueron reconstituidas con SDS al 1% en agua para HPLC y la cantidad de proteína presente en cada muestra se determinó por el ensayo de ácido bicinónico (BCA). Los volúmenes de muestra se ajustaron de acuerdo a la cantidad de proteína, teniendo en cuenta que es necesario emplear 2,5 μg de proteína total para llevar a cabo la cromatografía líquida asociada a dos espectrómetros de masas en tándem (LC-MS/MS). Se enviaron un total de seis replicados biológicos realizados cada uno con duplicados técnicos para cada condición. Al comparar las proteínas obtenidas en las muestras con las bases de datos del genoma humano y el genoma de *B. pertussis* se detectó una gran cantidad de proteínas de origen humano. Si bien estas proteínas no son tenidas en cuenta para las comparaciones de abundancias entre muestras agregan variabilidad interna en las mismas. Por este motivo sólo se tuvieron en cuenta para el análisis, los tres replicados biológicos con mayor cantidad de proteínas bacterianas. La Figura 4A muestra el número de proteínas totales (tanto humanas como bacterianas) identificadas en cada uno de ellos para las tres condiciones evaluadas, esto es, bacterias extracelulares, bacterias intracelulares aisladas a las 5 horas y bacterias intracelulares aisladas a las 48 horas. Se observa que en las muestras provenientes de localización intracelular el número de proteínas identificadas es mucho mayor que el de las muestras obtenidas de localización extracelular debido a que en las primeras se identifican una gran cantidad de proteínas de origen eucariota. En la Figura 4B se muestra el número de proteínas específicas de *B. pertussis* identificadas en cada replicado independiente, en cada condición evaluada. La diferencia entre el número de proteínas totales (Figura 4A) y las proteínas específicas de *B. pertussis* (Figura 4B) en las muestras obtenidas de localización intracelular muestra la contaminación con proteínas humanas en las mismas. También se observa en la Figura 4B un descenso en la cantidad de proteínas específicas de *B. pertussis* con el avance de la infección. Esto podría deberse a la leve disminución en el número de unidades formadoras de colonias a medida que progresa la infección descrita en el capítulo anterior.

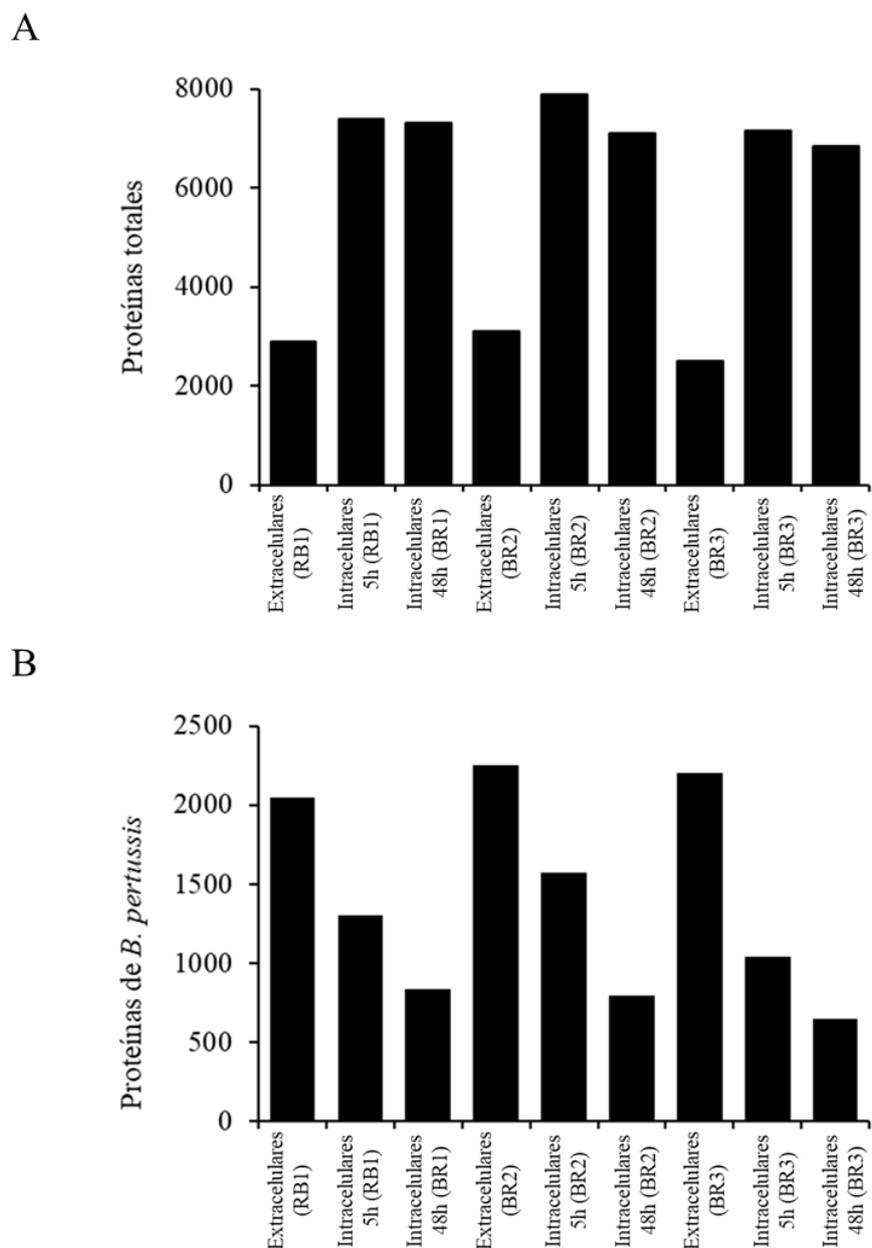


Figura 4. Cantidad de proteínas únicas identificadas en el estudio del proteoma. Número de proteínas únicas identificadas en el estudio del proteoma para cada uno de los tres replicados biológicos analizados (RB1, RB2 y RB3) en cada condición evaluada (bacterias extracelulares, bacterias intracelulares aisladas a las 5 horas y bacterias intracelulares aisladas a las 48 horas). **A)** Proteínas únicas identificadas incluyendo proteínas de origen bacteriano y humano. **B)** Proteínas únicas identificadas provenientes de *B. pertussis*.

Como resultado del análisis fueron identificadas, considerando los tres replicados independientes y las tres condiciones evaluadas un total de 1048 proteínas bacterianas diferentes que constituyen un 27,5% de las proteínas codificadas por todo el genoma de *B.*

pertussis y se listan en la Tabla Anexa. Para realizar una caracterización funcional de las mismas se analizaron utilizando términos GO (del inglés *gene ontology*). Este análisis de términos GO permite describir y clasificar a los genes y sus productos en base a tres aspectos generales: función molecular, procesos biológicos y componente celular. El término función molecular describe actividades en la que una determinada proteína interviene y que ocurren, justamente, a nivel molecular como podrían ser “catálisis”. El término de componente celular se refiere al compartimiento o componente de la célula en el cual se localiza el producto génico. El término procesos biológicos se relaciona con procesos más amplios, que ocurren por la acción de varias funciones moleculares organizadas. Pueden ser de un nivel específico como “biosíntesis de AMPc” o de un nivel más elevado o abstracto como “crecimiento celular”, “patogénesis” o “reproducción”. La Figura 4 muestra la clasificación de las proteínas totales identificadas en los términos GO relacionados con los procesos biológicos. Se observa que los términos más representados fueron regulación biológica, procesos biosintéticos, muerte celular, reproducción, regulación de procesos metabólicos y señalización. Cabe destacar que no todas las proteínas identificadas en el estudio están clasificadas según este criterio de términos GO. De las 1048 identificadas, 750 poseen anotaciones de términos GO relacionados con procesos biológicos mientras que las 299 restantes aún no están caracterizadas según este criterio y no se ven representadas en este análisis de categorías. La clasificación de las proteínas de acuerdo a los términos función molecular y componente celular no se muestran ya que no aportó información adicional relevante debido a que el número de proteínas con anotaciones de acuerdo a estos términos es mucho menor.

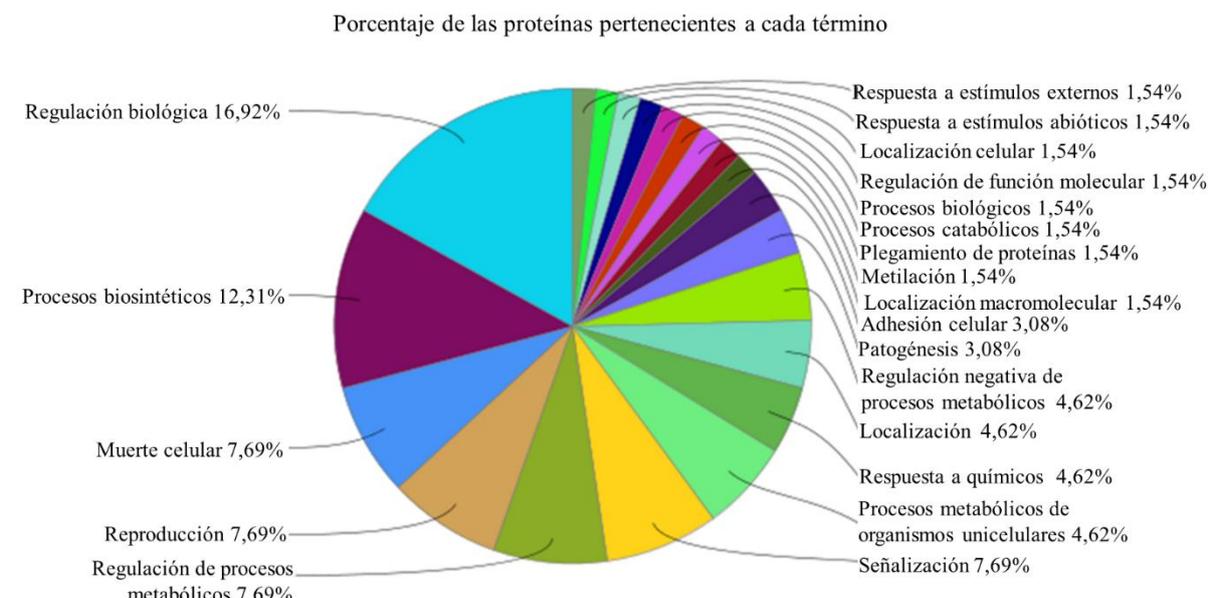


Figura 4. Clasificación de las proteínas identificadas de acuerdo a los términos GO relacionados con procesos biológicos. Porcentaje de las proteínas totales identificadas en este estudio que pertenecen a cada término GO relacionado con los procesos biológicos.

4.2.2.2. Análisis de proteínas con abundancia modificada en localización intracelular

Con el fin de detectar proteínas cuya abundancia se vio modificada en las distintas condiciones se hizo un análisis cuantitativo a partir de los recuentos espectrales de los péptidos identificados. Se consideró que una proteína modificó su abundancia cuando la relación de expresión entre las condiciones comparadas (*fold change*) fue superior a 1,5 o menor a 0,67 y tanto el valor p como el p ajustado por el método de Benjamini-Hochberg (q-valor), fueron menores de 0,05 según se describió en la sección de Materiales y métodos. En el análisis se observaron un total de 140 proteínas (13,4% de las identificadas) que modificaron su abundancia en respuesta al entorno intracelular (se muestran sombreadas en la Tabla Anexa). De estas proteínas, 8 aumentaron su abundancia en respuesta al entorno intracelular y 131 la disminuyeron (0,9% y 12,5% del total de las identificadas respectivamente). Entre las proteínas en las que se observó un aumento en la abundancia, se identificaron 5 que aumentan únicamente a las 48 horas. Solo una proteína mostró abundancia aumentada a las 5 horas y se mantuvo aumentada hasta las 48 horas. Por otro lado, dos proteínas se observaron con abundancia aumentada a las 5 horas post infección y no se pudo determinar con claridad si continuaron con abundancia aumentada a las 48 horas, ya

que en este punto no muestran diferencias significativas con el control de bacterias extracelulares infectantes ni con la condición intracelular de las 5 horas. En el caso de las proteínas con abundancia disminuida en respuesta al entorno intracelular, se observaron 29 proteínas con abundancia disminuida a las 5 horas post infección, que se mantuvieron disminuidas hasta las 48 horas respecto al control. Se observaron, además, 84 proteínas con abundancia disminuida respecto al control únicamente a las 48 horas posteriores a la infección. Por último, y al igual que sucedió con las proteínas con abundancia aumentada, se identificaron 18 proteínas con abundancia disminuida a las 5 horas posteriores a la infección, de las cuales no se pudo determinar con claridad si la abundancia se mantuvo disminuida a las 48 horas, ya que la abundancia de las mismas no mostró cambios significativos respecto a ninguna de las otras dos condiciones (control e intracelular a 5 horas post infección). Para esclarecer la evolución de la abundancia intracelular de estas 20 proteínas (2 aumentadas y 18 disminuidas) son necesarios nuevos ensayos con un mayor número de replicados independientes.

La única proteína cuya abundancia aumentó en el entorno intracelular a tiempos cortos y se mantuvo aumentada luego de 48 horas, es BP2016 (BrfB). Esta proteína es un receptor de sideróforos dependiente del sistema TonB que estaría involucrada en la adquisición de hierro quelado. También se encontró aumentada a las 48 horas la abundancia de BP0903, una proteína putativa de membrana que estaría regulada por la disponibilidad de hierro. Asimismo, se encontraron aumentadas a las 48 horas BP2224 (BapA), BP0665, BP1412 (FolC) y BP0842 (NuoB). La proteína BapA es un autotransportador potencialmente involucrado en la formación de *biofilms*, BP0665 y FolC son dos enzimas metabólicas relacionadas respectivamente con la síntesis de nucleósidos-difosfato y de ácido fólico, y NuoB es la subunidad B del complejo de la NADH ubiquinona oxidoreductasa involucrada en la cadena transportadora de electrones y cuya función es acoplar la reducción de NADH a la generación de un gradiente de protones que luego se utiliza para la generación de ATP. Por otro lado, BP3573, anotado como transportador de tipo ABC de aminoácidos ramificados, es una de las proteínas que aumentó a las 5 horas y cuyo nivel de abundancia no está completamente determinado a las 48 horas. El aumento de abundancia de estas proteínas sugiere que *B. pertussis* está llevando a cabo una adaptación a un nuevo entorno en donde seguramente deba modificar vías metabólicas (BP0665, FolC) y fuentes de adquisición de nutrientes (BP2016, BP0903, BP3537) y que estas modificaciones alteran a su vez la obtención de energía (NuoB).

Con relación a las 131 proteínas con abundancia disminuida en localización intracelular, el análisis global de las mismas mostrado en la Tabla 1 indica que los términos GO enriquecidos en este grupo de proteínas en la categoría de procesos biológicos son aquellos asociados a “procesos biosintéticos”, “procesos biosintéticos de sustancias orgánicas”, “procesos biosintéticos celulares”, “procesos biosintéticos de compuestos orgánicos nitrogenados”, “procesos biosintéticos de moléculas pequeñas” y “traducción”.

ID del término	Descripción del término	Genes observados	Genes totales del término	Tasa de falso descubrimiento
GO:0009058	Procesos biosintéticos	57	730	0,0000491
GO:1901576	Procesos biosintéticos de sustancias orgánicas	55	711	0,0000711
GO:0044249	Procesos biosintéticos celulares	50	700	0,0027
CO:1901566	Procesos biosintéticos de compuestos orgánicos nitrogenados	38	459	0,0027
GO:0044271	Procesos biosintéticos de compuestos celulares nitrogenados	32	376	0,0068
GO:0044281	Procesos metabólicos de moléculas pequeñas	42	617	0,0357
GO:0006412	Traducción	14	110	0,0374

Tabla 1: Términos GO enriquecidos entre las proteínas con abundancia disminuida en localización intracelular. Las columnas de la tabla muestran el número de identificación del término, la descripción del mismo, la cantidad de genes observados en la muestra, los genes totales anotados para el término y la tasa de falso descubrimiento. Este último valor describe el nivel de significancia del enriquecimiento en base a los p-valores para múltiples testeos usando el procedimiento de Benjamini-Hochberg.

Por otra parte, el análisis de enriquecimiento de las vías metabólicas de la base de datos KEGG sugiere que en localización intracelular disminuye en la actividad de las vías de biosíntesis de metabolitos secundarios, el metabolismo de fructosa y manosa, la biosíntesis de aminoácidos y la vía de las pentosas fosfato según se observa en la Tabla 2.

ID del término	Descripción del término	Genes observados	Genes totales del término	Tasa de falso descubrimiento
bpe01110	Biosíntesis de metabolitos secundarios	31	287	0,0000285
bpe01100	Vías metabólicas	49	662	0,00013
bpe03010	Ribosoma	10	54	0,0035
bpe00051	Metabolismo de fructosa y manosa	4	6	0,0084
bpe01230	Biosíntesis de aminoácidos	14	118	0,0084
bpe00030	Vía de las pentosas fosfato	4	10	0,0249

Tabla 2: Vías metabólicas de la base de datos KEGG enriquecidas entre las proteínas con abundancia disminuida en localización intracelular. Las columnas de la tabla muestran el número de identificación del término, la descripción del mismo, la cantidad de genes observados en la muestra, los genes totales anotados para el término y la tasa de falso descubrimiento. Este último valor describe el nivel de significancia del enriquecimiento en base a los p-valores para múltiples testeos usando el procedimiento de Benjamini-Hochberg.

En conjunto, los resultados mostrados en ambas tablas sugieren que la adaptación de *B. pertussis* al entorno intracelular va acompañada de una disminución de varios procesos biosintéticos y del metabolismo en general, lo cual es compatible con un estado de dormancia asociado a la persistencia bacteriana en entornos hostiles [464].

Con el fin de avanzar en la comprensión del posible significado biológico de los cambios de abundancia, las proteínas con expresión modificada se analizaron empleando la base de datos de redes de interacciones proteicas, STRING (del inglés *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*), a fin de revelar posibles asociaciones funcionales entre las mismas. En la representación de este tipo de redes, cada círculo representa una proteína y las líneas indican asociaciones posibles entre las mismas. De este modo una mayor cantidad de líneas entre dos proteínas indican una mayor cantidad de asociaciones posibles en base a distintos criterios [394].

En primer lugar, en relación a las proteínas que mostraron un aumento en abundancia en las bacterias intracelulares, es bajo el número de proteínas identificadas, y probablemente sea necesario repetir este estudio con más replicados biológicos para confirmar si efectivamente son pocas las proteínas cuya abundancia aumenta en localización intracelular, o se trata de un problema experimental. De cualquier forma, se encontró una vinculación entre BrfB y BP0903 según se puede observar en la Figura 5. La asociación predicha entre estas dos proteínas se basa en la coocurrencia de los genes en distintos genomas (línea azul, indica que los genes tienen patrones de ocurrencia similares en distintos genomas), de la coexpresión de los mismos (línea negra, indica que la expresión de los genes muestra una correlación), de la vecindad génica de genes homólogos (línea verde, indica que homólogos de estos genes se han observado en la vecindad génica del otro gen), y que genes homólogos han sido mencionados en conjunto en trabajos publicados (línea amarilla, surge de la minería de textos de la base de datos de PubMed). El hecho que en el número relativamente bajo de proteínas con abundancia aumentada en localización intracelular se encuentren dos

relacionadas con la adquisición de hierro resalta la importancia de este elemento para el establecimiento de la infección intracelular.

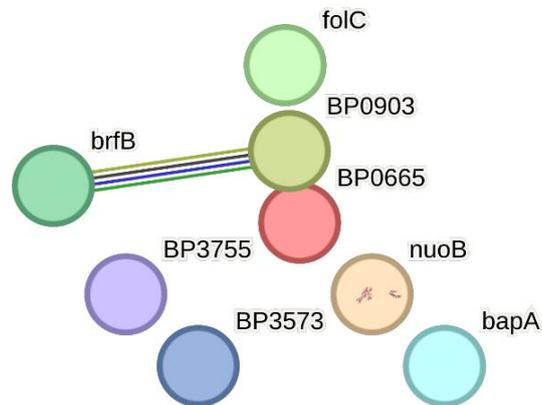


Figura 5. Red de interacción entre proteínas con abundancia aumentada en localización intracelular. Los círculos representan proteínas individuales y las líneas representan interacciones proteína-proteína de acuerdo al siguiente código de color: amarilla para evidencia de minería de textos; celeste para evidencia de bases de datos; violeta para evidencia experimental; negra para evidencia de coexpresión; verde para evidencia de vecindad génica; azul para coocurrencia génica.

Cuando se analiza la red de relaciones que incluye las 131 proteínas disminuidas mostrada en la Figura 6 se observa una gran complejidad y la predicción de un gran número de interacciones entre ellas.

online en el siguiente link que dirige al sitio web de STRING para su observación con mayor detalle

<https://string-db.org/cgi/network?taskId=bw6EAJcS9gJI&sessionId=bDgd6kleVkXG>

La zona de mayor densidad de proteínas e interacciones contiene en su mayoría proteínas ribosomales y polimerasas de ácidos nucleicos. La relación entre estas proteínas está muy bien documentada y evidencia una desaceleración de la traducción y biosíntesis proteica, sugiriendo que *B. pertussis* desacelera la producción de biomasa en localización intracelular. Las proteínas pertenecientes a esta red e involucradas con estas funciones se resaltan en color rojo en la Figura 7. Además, para facilitar la visualización de esta compleja red, en la Figura 7 se reemplazó el código de colores de las asociaciones por una única línea entre cada par de proteínas. El grosor de la misma es proporcional al número de asociaciones predichas entre ambas proteínas, es decir, la mayor cantidad de líneas de distintos colores observados en la Figura 6 fue reemplazada por una línea de mayor grosor en la Figura 7.

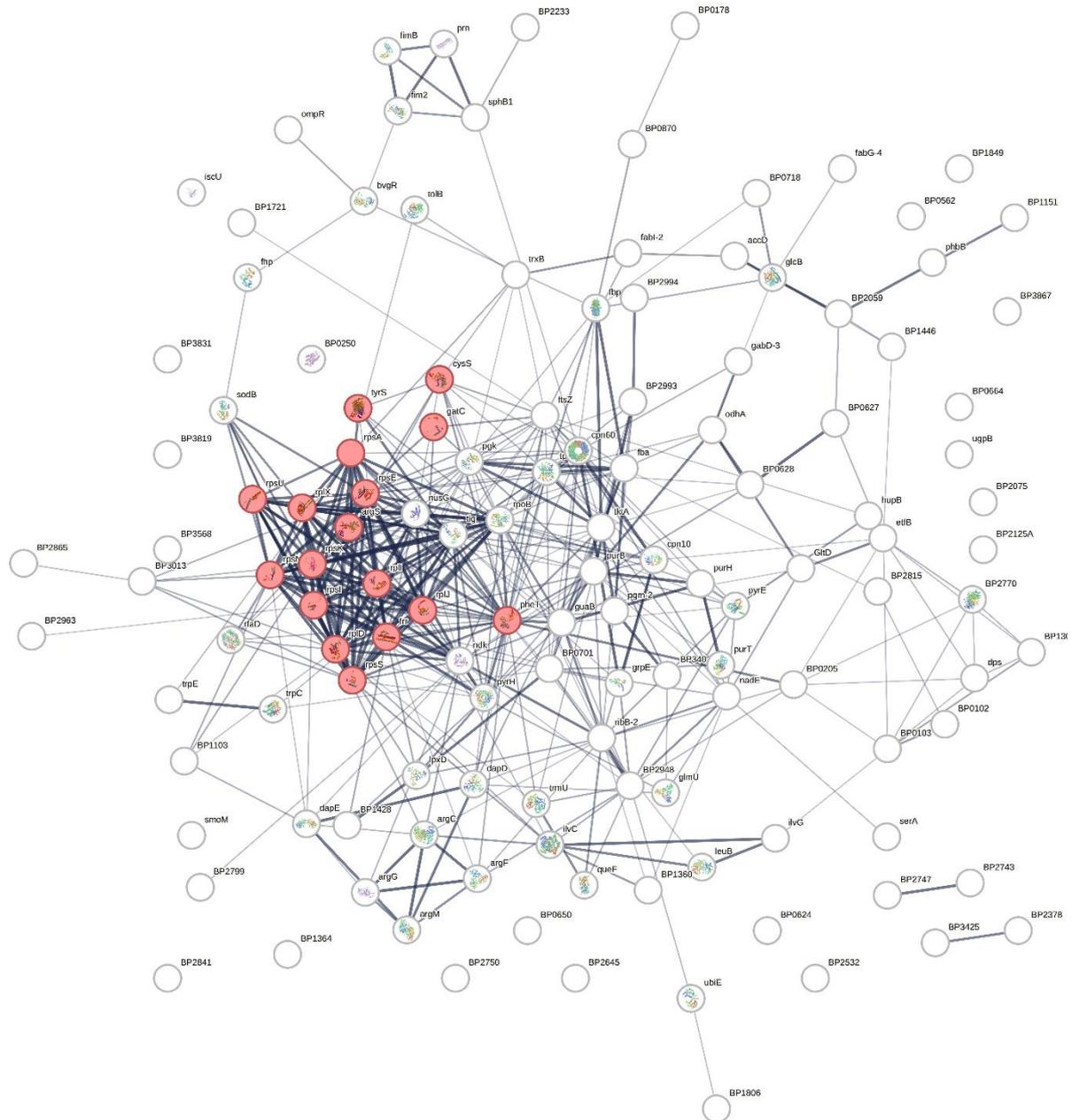


Figura 7. Proteínas relacionadas con la traducción y síntesis proteica en la red de interacción entre proteínas con abundancia disminuida en localización intracelular. Los círculos representan proteínas individuales y las líneas representan interacciones proteína-proteína. El grosor de las líneas representa una mayor cantidad de asociaciones predichas entre las dos proteínas que conecta.

Además del nodo de proteínas relacionadas con procesos ribosomales y transcripcionales se observa una gran cantidad de proteínas relacionadas con la síntesis de metabolitos secundarios sugiriendo que en localización intracelular la producción de estos metabolitos se ve disminuida en *B. pertussis*, probablemente en favor del metabolismo

asociado a mantenimiento celular y la supervivencia. Estas proteínas se resaltan en rojo en la Figura 8.

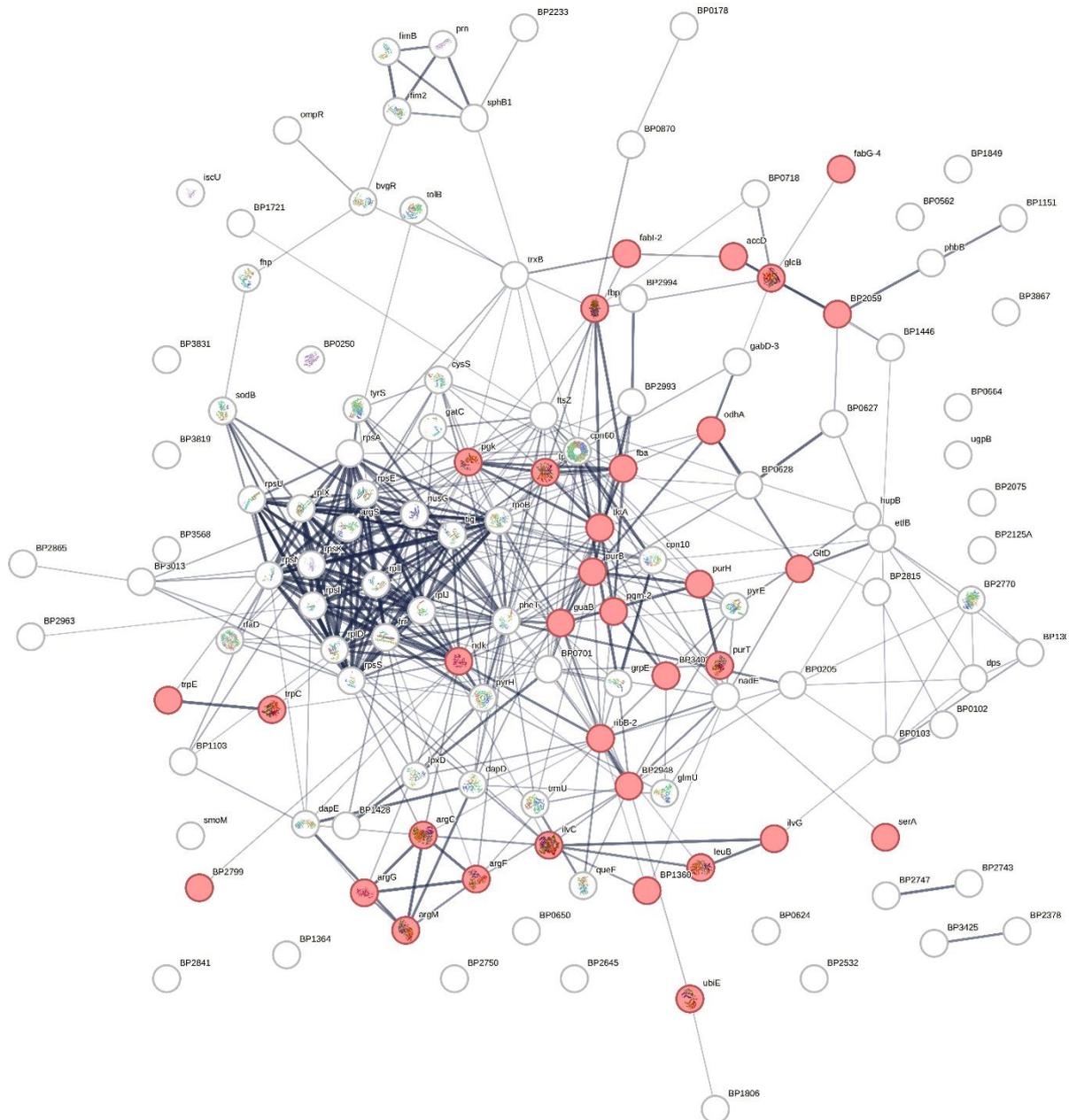


Figura 8. Proteínas relacionadas con la síntesis de metabolitos secundarios en la red de interacción entre proteínas con abundancia disminuida en localización intracelular. Los círculos representan proteínas individuales y las líneas representan interacciones proteína-. El grosor de las líneas representa una mayor cantidad de asociaciones predichas entre las dos proteínas que conecta.

4.2.2.3. Análisis de proteínas relacionadas con el metabolismo

En lo que se refiere a las proteínas con expresión disminuida cabe analizar algunas proteínas relacionadas con distintas vías metabólicas en particular.

Se encontró que en localización intracelular disminuye la abundancia de BP2441, BP3215 (FabI), y BP3591 (AccD), todas ellas implicadas en la biosíntesis de ácidos grasos sugiriendo que *B. pertussis* podría estar adaptándose a un entorno pobre en fuente de carbono y energía, desacelerando la acumulación de reservas energéticas y la síntesis de membranas lipídicas.

Asimismo, en localización intracelular se verificó una disminución significativa de proteínas relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos. Entre ellas, BP0155 (SerA, involucrada en la síntesis de serina, cisteína y glicina), BP2960, BP3537 y BP3538 (ArgC, ArgG y ArgF respectivamente, involucradas en la síntesis de arginina), BP0791 y BP1538 (IlvC e IlvG respectivamente, involucradas en la síntesis de aminoácidos ramificados), BP3754 (GltD, involucrada en la síntesis de glutamina y glutamato), BP1763 y BP1764 (DapE y DapD respectivamente, involucradas en la síntesis de lisina) y BP3261 (TrpC involucrada en la biosíntesis de triptófano, fenilalanina y tirosina). La disminución de la expresión de estas proteínas sumada a la disminución de proteínas ribosomales sugiere una desaceleración de la síntesis proteica y de la biomasa en general.

Otras proteínas disminuidas en localización intracelular se relacionan con el metabolismo de factores de crecimiento como la vitamina K2 (BP0161), vitamina B5 (BP1360), vitamina B2 (BP2948 y BP3484).

En este mismo sentido, también se encontraron disminuidas las proteínas BP0801 (TpiA) y BP0868 (Fbp) relacionadas con la gluconeogénesis. Esta vía es central para *B. pertussis* ya que no posee una vía glucolítica funcional por lo que su fuente de carbono y energía son los aminoácidos y debe generar este sacárido *de novo* a partir de los mismos por la vía gluconeogénica. Una desaceleración de esta ruta es coherente con los resultados que indican una disminución general en la actividad anabólica en localización intracelular.

De acuerdo con esta desaceleración del metabolismo, también se observó la disminución de BP0702 (PurT), BP2202 (Ndk), BP2626 (GuaB), BP2890 (PurB), BP3416 (PurH), todas relacionadas con la síntesis de bases nitrogenadas, sugiriendo una desaceleración en la síntesis de material genético.

También disminuyó la abundancia de BP1721 y BP3018 (FtsZ) relacionadas con la regulación de la producción de membranas y pared celular durante la duplicación celular y la regulación de este proceso.

La disminución de la abundancia de estas proteínas en conjunto con los niveles de sobrevida observados en el Capítulo 4 sugieren que la adaptación de *B. pertussis* al entorno intracelular conlleva a una desaceleración de los procesos anabólicos y de producción de biomasa, acorde a un fenotipo de persistencia en un ambiente hostil. En la Tabla 3 se detallan las proteínas descritas en esta sección y la evolución de su abundancia a lo largo de la infección intracelular. En la misma se observa que algunas proteínas ya disminuyen su abundancia a tiempos cortos post infección y que la mayoría muestra una diferencia significativa a tiempos más largos. Esto sugiere que, si bien la adaptación metabólica observada comienza antes de las 5 horas post infección, el proceso continúa luego de ese momento y podría, incluso, tomar más de 48 horas.

Tabla 3. Proteínas relacionadas con el metabolismo.

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control	Intracelular 48h vs control	Intracelular 48h vs Intracelular 5h
BP2441	fabG	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	NS	Disminuida	NS
BP3215	fabI1	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]	NS	Disminuida	NS
BP3591	accD	acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta	NS	Disminuida	NS
BP0155	serA	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	NS	Disminuida	NS
BP2960	argC	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	NS	Disminuida	NS
BP3537	argG	argininosuccinate synthase	NS	Disminuida	NS
BP0791	ilvC	ketol-acid reductoisomerase	NS	Disminuida	NS
BP3754	BP3754	glutamate synthase [NADPH] small chain	NS	Disminuida	NS
BP1763	dapE	succinyl-diaminopimelate desuccinylase	NS	Disminuida	NS
BP1764	dapD	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase	NS	Disminuida	NS
BP3261	trpC	indole-3-glycerol phosphate synthase	NS	Disminuida	NS
BP0161	ubiE	ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase	NS	Disminuida	NS
BP1360	BP1360	putative ketopantoate reductase	NS	Disminuida	NS
BP3484	ribB	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	NS	Disminuida	NS
BP0868	fbp	fructose-1,6-bisphosphatase	NS	Disminuida	NS
BP0702	purT	phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2	NS	Disminuida	NS
BP2890	purB	adenylosuccinate lyase	NS	Disminuida	NS
BP3416	purH	bifunctional purine biosynthesis protein	NS	Disminuida	NS
BP1721	BP1721	putative peptidase	NS	Disminuida	NS
BP3018	ftsZ	cell division protein FtsZ	NS	Disminuida	NS
BP0801	tpiA	triosephosphate isomerase	Disminuida	Disminuida	NS
BP3538	argF	ornithine carbamoyltransferase	Disminuida	Disminuida	NS
BP2948	BP2948	putative riboflavin-specific deaminase	Disminuida	Disminuida	NS
BP1538	ilvG	putative acetolactate synthase large subunit	Disminuida	Disminuida	NS
BP2202	ndk	nucleoside diphosphate kinase	Disminuida	Disminuida	NS

NS indica que la abundancia no se modificó significativamente ente las dos condiciones analizadas.

4.2.2.4. Análisis de proteínas relacionadas con la respuesta a estrés

Una vez en el entorno intracelular, el patógeno es sometido a diferentes estrategias de defensa de la célula tendientes a promover su eliminación y degradación, implicando diferentes tipos de estrés que el patógeno deberá enfrentar para poder sobrevivir. La capacidad de respuesta a estas condiciones de estrés define en muchos casos la virulencia y capacidad de persistencia de un patógeno. Estudios previos de nuestro grupo modelaron *in vitro* los distintos tipos de estreses a los que podría enfrentar *B. pertussis* en el hospedador como son la escasez de nutrientes y la presencia de especies reactivas de oxígeno, logrando avanzar en la identificación de factores bacterianos involucrados en las diferentes respuestas de este patógeno a estas condiciones [186], [465].

Existen 59 proteínas anotadas en el término GO relacionado con la respuesta a estrés en *B. pertussis*. De este universo se encontraron en este estudio proteómico un total de 28 y solo una de ellas con abundancia modificada, BP1616, que mostró una disminución significativa a las 48 horas post infección. La proteína BP1616 (Dps) es una proteína putativa de unión a ADN. El grupo de proteínas perteneciente a este término GO comprende en su mayoría proteínas relacionadas con la reparación y demás procesos del ADN, así como también algunas proteínas reguladoras, transportadoras, sensores de dos componentes y proteínas de respuesta a estrés oxidativo. En este último grupo de particular relevancia se encuentran anotadas cuatro proteínas, de las cuales fueron identificadas dos en este estudio, la peroxidasa BP0974 (TyrA) y la catalasa BP3852 (KatA), ambas sin cambios entre las condiciones estudiadas.

Además de las proteínas comprendidas en este término GO, *B. pertussis* codifica para las superóxido dismutasas A y B (BP0913 y BP2761, SodA y SodB respectivamente), ambas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo, aunque no están comprendidas en este término en particular. En este estudio la expresión de SodA no fue detectada y se observó una disminución de la abundancia de SodB en localización intracelular. También por fuera de este término, *B. pertussis* expresa proteínas que comparten homología con proteínas de respuesta a estrés descritas en *E. coli*. Entre ellas, BP1175 (que comparte homología con YgiW) y BP2452 (que comparte homología con YaaA). Ambas se identificaron en este estudio sin modificaciones en su abundancia entre las condiciones intracelular y el control. Asimismo, en este estudio se observó que el regulador post-transcripcional Hfq (BP2193), implicado en la sobrevivencia intracelular en macrófagos y en la respuesta de la bacteria a varios tipos de estrés,

entre ellos, el estrés nutricional y al estrés oxidativo [186], no modificó su abundancia en localización intracelular y a diferencia de lo observado en *B. pertussis* en localización intracelular en macrófagos [274]. La disminución o falta de inducción de este grupo de proteínas ligadas a la respuesta bacteriana al estrés sugiere que en el interior de las células epiteliales *B. pertussis* no está sometida a los típicos factores de estrés previamente reportados y estudiados en otros tipos celulares. La Tabla 4 muestra el detalle de las proteínas relacionadas con la respuesta a estrés que fueron identificadas en este estudio y su relación de abundancia entre las distintas condiciones evaluadas.

Tabla 4. Proteínas relacionadas con la respuesta a estrés.

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control	Intracelular 48h vs control	Intracelular 48h vs Intracelular 5h
BP1616	dps	putative DNA-binding protein	NS	Disminuida	NS
BP2761	sodB	superoxide dismutase	NS	Disminuida	NS
BP0244	mutL	DNA mismatch repair protein	NS	NS	NS
BP0369	BP0369	putative endonuclease	NS	NS	NS
BP0864	mfd	transcription-repair coupling factor	NS	NS	NS
BP0947	tyrA	prephenate dehydrogenase	NS	NS	NS
BP1040	BP1040	PhoH-like protein	NS	NS	NS
BP1105	recJ	single-stranded-DNA-specific exonuclease	NS	NS	NS
BP1227	radA	DNA repair protein	NS	NS	NS
BP1315	BP1315	universal stress family protein	NS	NS	NS
BP1549	dnaX	DNA polymerase III subunit Tau	NS	NS	NS
BP1566	mutS	mismatch repair protein	NS	NS	NS
BP1612	recG	ATP-dependent DNA helicase	NS	NS	NS
BP1759	uvrD	DNA helicase II	NS	NS	NS
BP1796	uvrB	excinuclease ABC subunit B	NS	NS	NS
BP1909	BP1909	DNA-3-methyladenine glycosylase	NS	NS	NS
BP2110	BP2110	putative exodeoxyribonuclease III	NS	NS	NS
BP2471	BP2471	conserved hypothetical protein	NS	NS	NS
BP2498	dnaJ	molecular chaperone	NS	NS	NS
BP2506	BP2506	DNA repair protein	NS	NS	NS
BP2546	recA	RecA protein	NS	NS	NS
BP2788	BP2788	hypothetical protein	NS	NS	NS
BP3240	uvrA2	putative excinuclease ABC subunit	NS	NS	NS
BP3417	ruvC	crossover junction endodeoxyribonuclease	NS	NS	NS
BP3418	ruvA	holliday junction DNA helicase	NS	NS	NS
BP3421	ruvB	holliday junction DNA helicase	NS	NS	NS
BP3560	ligA	DNA ligase	NS	NS	NS
BP3660	uvrA	excinuclease ABC subunit A	NS	NS	NS
BP3852	katA	catalase	NS	NS	NS
BP1175	BP1175	putative exported protein	NS	NS	NS
BP2452	BP2452	conserved hypothetical protein	NS	NS	NS
BP2193	hfq	putative RNA-binding regulatory protein	NS	NS	NS

NS indica que la abundancia no se modificó significativamente ente las dos condiciones analizadas.

4.2.2.5. Análisis de proteínas reguladoras de respuesta

La adaptación de la bacteria al entorno supone un cambio controlado en la expresión de varias proteínas a través de reguladores de respuesta. Se han descrito varios sistemas reguladores de dos componentes que intervienen en la transducción de señales de *B. pertussis* y existen varios sistemas regulatorios potenciales aún no caracterizados en profundidad que se encuentran anotados como tales. El más estudiado es el sistema de dos componentes BvgAS que en este estudio no mostró diferencias significativas en su abundancia entre bacterias extra e intracelulares. Otro sistema de dos componentes recientemente caracterizado es el de PlrSR (del inglés *persistence in the lower respiratory tract*) cuyo sensor con actividad quinasa es BP0571 (PlrS) y el regulador de respuesta es BP0572 (PlrR) [182]. Ambos componentes fueron identificados en este estudio proteómico sin modificaciones de abundancia en las distintas condiciones estudiadas. En este estudio se identificó también sin modificaciones en su abundancia al regulador de respuesta BP0160 que codificaría, junto a BP0159 (no identificada en este estudio), un sistema de dos componentes homólogo al sistema PhoPR descrito en *E. coli* como sensible a los niveles de fosfato inorgánico [309]. Otro regulador de respuesta que se identificó sin modificaciones en su abundancia en este estudio es BP2934 que, junto a BP2935, codifica el ampliamente conservado sistema RegAB involucrado en la respuesta a distintas condiciones redox [466], [467]. Recientemente nuestro grupo describió el factor BP1092, un sensor histidina quinasa que estaría involucrado en la regulación de varios factores de virulencia y en la sobrevivencia intracelular en macrófagos (Debandi y col. en revisión). En este estudio proteómico se identificó a BP1092 sin cambios en la abundancia en localización intracelular.

Otro sistema de dos componentes muy estudiado en *Bordetella* es RisAS, implicado principalmente en la regulación de la virulencia del patógeno junto con BvgAS. El factor RisS no fue detectado en este estudio, lo cual era esperable porque *risS* de *B. pertussis* está inactivado por una mutación. Por su parte, el regulador de respuesta RisA fue identificado sin modificaciones en su abundancia. Estudios previos demostraron que la quinasa que fosforila a RisA en ausencia de RisS en *B. pertussis* es la quinasa denominada RisK (BP3223) [180] codificada en otro operón, y que forma un sistema de dos componentes con el regulador de respuesta BP3222. En este estudio se identificaron RisK sin modificaciones en su abundancia y BP3222 con abundancia disminuida en localización intracelular a las 5 horas post infección. No está caracterizada la función de BP3222, pero su disminución podría estar involucrada en

la regulación de varios factores que contribuyen a la adaptación del fenotipo de *B. pertussis* al entorno intracelular según sugieren estudios previos del grupo en macrófagos humanos [274].

4.2.2.6. Análisis de factores de virulencia en la adaptación al entorno intracelular epitelial

El sistema de dos componentes más estudiado de *B. pertussis* es el sistema BvgAS implicado en la regulación de la virulencia del patógeno. Existe evidencia de que los factores de virulencia regulados por este sistema están involucrados en la sobrevivencia intracelular de la bacteria. En este estudio en células epiteliales, ninguno de los dos componentes del sistema BvgAS (el sensor BvgS y la proteína reguladora de respuesta BvgA) mostró cambios en su nivel de expresión en bacterias intracelulares con respecto al control. De cualquier forma, la principal regulación de este sistema ocurre mediante la fosforilación de sus componentes además de por su abundancia. Por otro lado, en localización intracelular se encontró disminuida la abundancia del represor BvgR, cuya función es reprimir la expresión de los genes que no se expresan en fase virulenta. No se encontraron modificaciones en la abundancia de las dos toxinas más importantes de *B. pertussis* reguladas por el sistema BvgAS, CyaA y PT. Tampoco se detectaron diferencias en los niveles de Vag8, TcfA, Dnt y BrkA, todos dependientes del BvgAS. Solamente la abundancia de FimB, Fim2, Prn, SphB1 se encontró disminuida a las 48 horas en localización intracelular, además del ya mencionado BvgR.

Además de esto, se realizó un análisis de las proteínas reguladas por BvgAS expresadas en fase avirulenta. Para este análisis se utilizaron datos experimentales de proteómica comparativa de *B. pertussis* en fase virulenta y avirulenta disponibles en el laboratorio y aún no publicados (Debandi y col. en revisión). Además de los factores conocidos y mencionados en el párrafo anterior, se identificaron tres proteínas con abundancia aumentada en virulencia, cuya abundancia se encontró disminuida en bacterias intracelulares respecto al control extracelular. Se trata de BP2233 (BtrA), BP0178, BP1360. Estas dos últimas proteínas son, respectivamente, una lipoproteína putativa y una reductasa putativa que estaría involucrada en la síntesis de pantotenato (vitamina B5). BtrA es un factor anti-sigma involucrado en la regulación del sistema de secreción tipo 3 [145]. Aunque la disminución observada en algunos de estos factores podría sugerir una modulación de la virulencia en localización intracelular, la abundancia del resto de los factores de virulencia indica que el fenotipo intracelular en células epiteliales se mantiene virulento al menos hasta las 48 horas post infección. La Tabla 5 muestra las comparaciones de abundancia relativa de

los factores de virulencia de *B. pertussis* entre las tres condiciones analizadas. Se observa que la mayoría de los factores de virulencia no disminuyen su abundancia y que aquellos que la disminuyen lo hacen a tiempos largos. Esta disminución tardía sugiere que los factores de virulencia serían necesarios durante las etapas iniciales de la infección y que, según se observó también en estudios previos en macrófagos [379], [380], el entorno intracelular podría promover la modulación de la virulencia en *B. pertussis*.

Tabla 5. Proteínas reguladas por el sistema BvgAS.

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control	Intracelular 48h vs control	Intracelular 48h vs Intracelular 5h
BP1878	bvgA	virulence factors transcription regulator	NS	NS	NS
BP1877	bvgS	virulence sensor protein	NS	NS	NS
BP0760	cya	bifunctional hemolysin/adenylate cyclase	NS	NS	NS
BP3783	ptxA	pertussis toxin subunit 1 precursor	NS	NS	NS
BP3784	ptxB	pertussis toxin subunit 2 precursor	NS	NS	NS
BP2315	vag8	autotransporter	NS	NS	NS
BP1201	tcfA	tracheal colonization factor precursor	NS	NS	NS
BP3439	dnt	dermonecrotic toxin	NS	NS	NS
BP1879	fhaB	filamentous hemagglutinin/adhesin	NS	NS	NS
BP3494	brkA	serum resistance protein	NS	NS	NS
BP1882	fimC	outer membrane usher protein precursor	NS	NS	NS
BP1876	bvgR	regulatory protein BvgR	NS	Disminuida	NS
BP1119	fim2	serotype 2 fimbrial subunit precursor	NS	Disminuida	NS
BP1881	fimB	chaperone protein	NS	Disminuida	NS
BP1054	prn	pertactin precursor	NS	Disminuida	NS
BP0216	sphB1	autotransporter subtilisin-like protease	NS	Disminuida	NS
BP2233	BP2233	hypothetical protein	NS	Disminuida	NS
BP0178	BP0178	putative lipoprotein	NS	Disminuida	NS
BP1360	BP1360	putative ketopantoate reductase	NS	Disminuida	NS

NS indica que la abundancia no se modificó significativamente entre las dos condiciones analizadas.

Como se menciona previamente, en estudios previos del grupo se observó que la abundancia de CyaA y PT no se modifica en localización intracelular en macrófagos [87],

[274], pero son necesarias para modular la respuesta bactericida de la célula y que la ausencia de cualquiera de ellas disminuye la sobrevivencia intracelular bacteriana en macrófagos [87], [274]. Teniendo en cuenta que la abundancia de ambas toxinas tampoco se modifica dentro de las células epiteliales, se evaluó su importancia en la eventual respuesta bactericida de la célula epitelial. Para ello estudiamos el rol de cada una de estas toxinas en el tráfico intracelular y la sobrevivencia de *B. pertussis* en células epiteliales polarizadas empleando cepas mutantes defectivas en cada toxina. Para llevar a cabo estos estudios se realizaron ensayos de tráfico intracelular y de protección a antibiótico según se describe en el Capítulo 3. Brevemente, células epiteliales polarizadas con uniones estrechas formadas se incubaron con la cepa salvaje de *B. pertussis* o con cada una de las cepas mutante defectivas en la expresión de PT (Δ PT) o CyaA (Δ CyaA). Se lavaron las células para eliminar las bacterias no adheridas y se agregó polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares. A las 5 y 48 horas post infección se tomaron muestras para evaluar el tráfico intracelular por microscopía confocal y la sobrevivencia intracelular a través de ensayos de protección a Polimixina B. Los resultados de la Figura 9 muestran que el porcentaje de colocación de las cepas mutantes defectivas en cada factor con marcadores de endosoma tardío, LAMP-2, y de lisosomas degradativos, catepsina D (CTSD), no difiere significativamente con el de la cepa salvaje a ninguno de los tiempos ensayados. Esto sugiere ninguna de estas toxinas tiene un rol relevante en el tráfico intracelular de *B. pertussis* en células epiteliales.

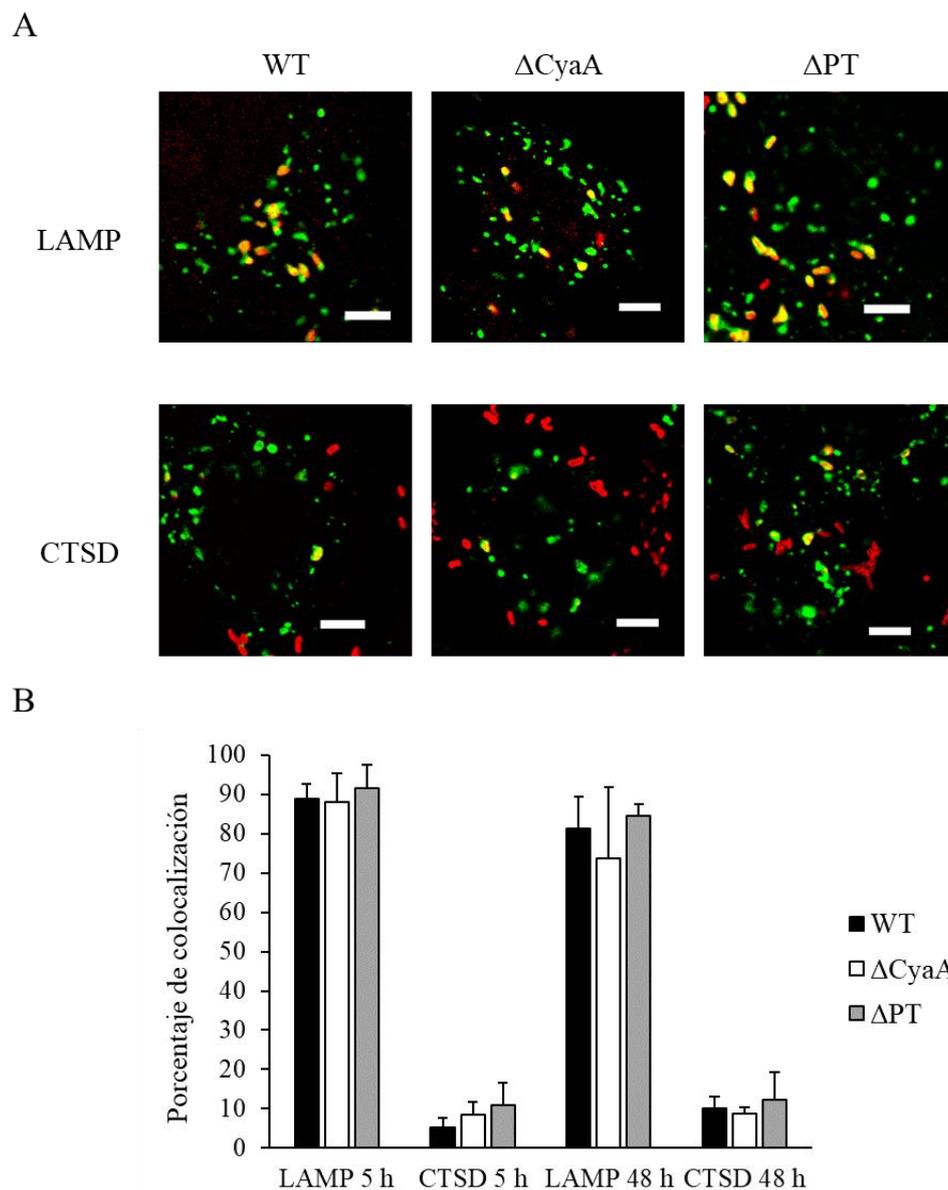


Figura 9. Tráfico intracelular de *B. pertussis* defectiva en CyaA y PT en células epiteliales. Células bronquiales 16HBE14o- polarizadas durante siete días en forma de islas fueron incubadas con la cepa salvaje de *B. pertussis* (WT) o las cepas isogénicas defectivas en CyaA y PT (Δ CyaA y Δ PT, respectivamente) a una multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula durante 4 horas a 37°C, lavadas e incubadas con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares. A las 5 y 48 horas post infección las muestras fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y permeabilizadas. Las bacterias se detectaron utilizando sueros policlonales de conejo dirigidos contra *B. pertussis* seguido de fracciones F(ab')₂ de anticuerpos de cabra contra conejo conjugados con el fluoróforo Cy3 (rojo). LAMP-2 (CD107b) se detectó utilizando anticuerpos monoclonales de ratón seguido de fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra contra ratón conjugados con el fluoróforo Alexa-647 (verde).

Catepsina D fue detectada con anticuerpos monoclonales de ratón seguido de fragmentos F(ab')₂ de anticuerpo de cabra contra ratón conjugado con el fluoróforo Alexa-647 (verde). **A)** Imágenes representativas de bacterias de cada cepa colocalizando con LAMP-2 y catepsina D. **B)** Porcentaje de las bacterias internalizadas que colocalizan con cada marcador a las 5 y 48 horas post infección. La figura muestra la media ± DE de dos experimentos independientes.

En la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos con las cepas mutantes en los estudios de sobrevivencia intracelular determinada en ensayos de protección a polimixina B. Los niveles de adhesión e internalización fueron analizados por microscopía de fluorescencia a las 5 horas post infección en células sin tratar con antibiótico, como control. En las Figuras 10A y 10B muestran que no hay diferencias significativas en la adhesión e internalización para las tres cepas y la Figura 10C muestra que, a diferencia de lo reportado para macrófagos [87], y de acuerdo con los resultados de tráfico intracelular observados en la Figura 9, la sobrevivencia de las cepas mutantes no muestra diferencias significativas con la cepa salvaje, confirmando que ninguna de estas toxinas interviene en la capacidad de *B. pertussis* de sobrevivir dentro de las células epiteliales.

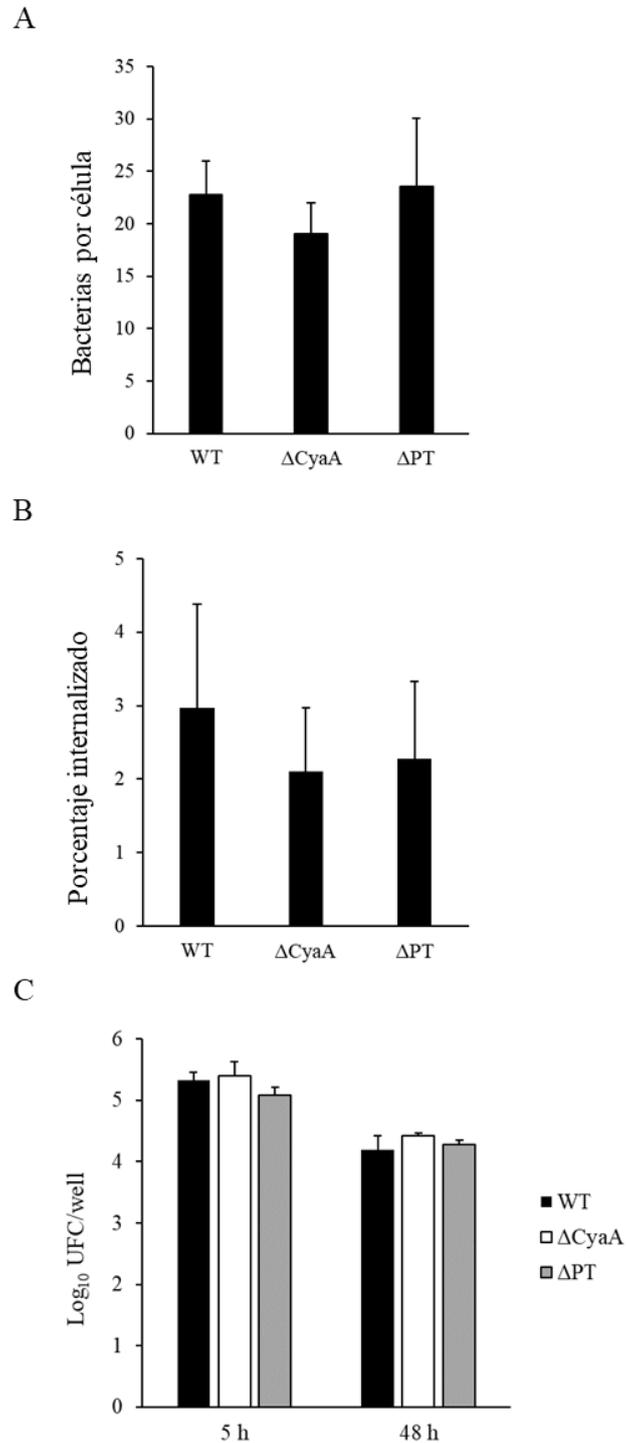


Figura 10. Sobrevida intracelular de *B. pertussis* defectiva en CyaA y PT en células epiteliales. Células 16HBE14o- polarizadas durante siete días fueron incubadas con la cepa salvaje de *B. pertussis* (WT) o las cepas isogénicas defectivas en CyaA y PT (Δ CyaA y Δ PT, respectivamente) a una multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula durante 4 horas a 37°C, lavadas e incubadas con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares. El número de bacterias extracelulares e intracelulares en células infectadas durante 5 horas sin tratamiento con antibiótico fue discriminado con doble marcación

fluorescente y cuantificado mediante microscopía de fluorescencia para determinar los niveles de adhesión e internalización. A las 5 y 48 horas post infección se determinó el número de unidades formadoras de colonias por pocillo. **A)** Número de bacterias totales por célula. **B)** Porcentaje de las bacterias totales que se encuentra en localización intracelular. **C)** Nivel de sobrevivencia intracelular expresado como el logaritmo en base 10 del número de UFC por pocillo a cada tiempo evaluado. En todos los casos las figuras muestran la media \pm DE de dos experimentos independientes realizados cada uno por triplicado.

4.2.2.7. Análisis de transportadores de hierro en la adaptación al entorno intracelular epitelial

La inmunidad nutricional es un mecanismo de defensa del hospedador que consiste en secuestrar minerales esenciales, como hierro, zinc y manganeso entre otros, disminuyendo su disponibilidad a valores incompatibles con el desarrollo bacteriano [468]. Como contrapartida, los patógenos expresan sistemas de captura de alta afinidad para adquirir estos minerales. En particular el hierro es uno de los nutrientes más importantes y los patógenos expresan sistemas de captura que les permiten obtenerlo en distintos estados de oxidación y a partir de distintas fuentes. Existe un número importante de sistemas de captura de hierro de alta afinidad descritos en *Bordetella*. Entre ellos se encuentran la producción del sideróforo alcaligina [469], el sistema de captura de xenosideróforos Bfe [470], el sistema de captura de grupos hemo Bhu [471], los receptores de catecolaminas BfrD y BfrE [472] y el sistema Ftr de captura de ion ferroso en el cual se incluye el transportador IRP1-3 (también denominado FtrA) [236], [473].

En estudios previos de nuestro grupo observamos que los receptores de catecolaminas BfrD (BP0856) y BfrE (BP0857) tienen abundancia aumentada en bacterias intracelulares en macrófagos desde el inicio de la infección, y que el receptor periplásmico de ion ferroso IRP1-3 (BP1152) se expresa a tiempos largos post infección [274], sugiriendo la eventual importancia de estos receptores en la sobrevivencia de la bacteria dentro del fagosoma. El rol de BfrD y BfrE, en la sobrevivencia intracelular, y de las catecolaminas como posible fuente de hierro dentro del fagosoma fue confirmado a través de la construcción de mutantes defectivos para estos receptores y la determinación de la sobrevivencia intracelular de los mismos [274].

En el análisis proteómico de bacterias aisladas de células epiteliales no se encontraron modificaciones en la abundancia de ninguno de estos tres factores, observándose que están expresados en todas las condiciones de trabajo estudiadas con una abundancia relativa

similar. Para evaluar el eventual rol de estos transportadores de hierro en el tráfico y en la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en células epiteliales se decidió realizar un primer ensayo empleando una cepa defectiva que no expresa ninguno de los tres factores mencionados para evitar falsos negativos por compensación, y avanzar luego en el estudio individual de los factores en caso de resultados positivos. Para ello, células 16HBE14o-polarizadas durante siete días fueron incubadas con la cepa salvaje de *B. pertussis* (WT) o la cepa isogénica defectiva en BfrD, BfrE e IRP1-3 (Δ BfrDE Δ IRP1-3). Luego de esto se lavaron las bacterias no adheridas y se incubaron las células con antibiótico polimixina B. A las 5 y 48 horas post infección las células fueron lisadas y se realizaron recuentos de UFC. Los niveles de adhesión e internalización a las 5 horas fueron analizados por microscopía de fluorescencia. Las Figuras 11A y 11B muestran que no hay diferencias significativas en la adhesión e internalización de las distintas cepas. La Figura 11C muestra que tampoco hay diferencia significativa entre las UFC que se recuperan de la cepa salvaje y de la triple mutante, indicando que, a diferencia de lo que ocurre en las infecciones intracelulares de macrófagos, ninguno de estos factores es relevante para la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en células del epitelio respiratorio.

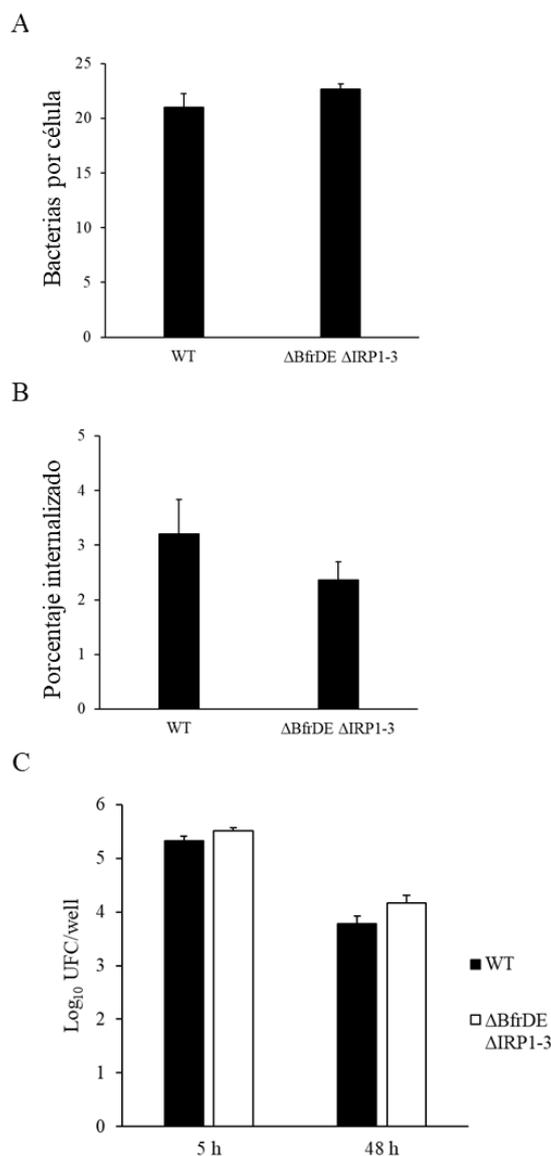


Figura 11. Sobrevida intracelular de *B. pertussis* defectiva en BfrD, BfrE, e IRP1-3 en células epiteliales. Células 16HBE14o- polarizadas durante siete días fueron incubadas con la cepa salvaje de *B. pertussis* (WT) o la cepa isogénica defectiva en BfrD, BfrE e IRP1-3 (Δ BfrDE Δ IRP1-3 a una multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula durante 4 horas a 37°C, lavadas e incubadas con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares. El número de bacterias extracelulares e intracelulares en células infectadas durante 5 horas sin tratamiento con antibiótico fue discriminado con doble marcación fluorescente y cuantificado mediante microscopía de fluorescencia para determinar los niveles de adhesión e internalización. A las 5 y 48 horas post infección se determinó el número de unidades formadoras de colonias por pocillo. **A)** Número de bacterias totales por célula. **B)** Porcentaje de las bacterias totales que se encuentra en localización intracelular. **C)** Nivel de sobrevida intracelular expresado como el logaritmo en base 10 del número de UFC

por pocillo a cada tiempo evaluado. En todos los casos las figuras muestran la media \pm DE de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado.

En paralelo se evaluó el tráfico intracelular de la cepa salvaje de *B. pertussis* y la cepa mutante deficiente en BfrD, BfrE e IRP1-3 por microscopía confocal según se describió en la sección previa. Se incubaron células con la cepa salvaje y la cepa mutante, se lavaron las bacterias no adheridas y se incubaron las células con el antibiótico polimixina B para eliminar las bacterias extracelulares. A las 5 y 48 horas post infección se fijaron las muestras para su posterior tinción y análisis. Los resultados de la Figura 12 muestran que el porcentaje de colocación con los marcadores LAMP-2 y catepsina D (CTSD) de las cepas mutantes no difiere significativamente del de la cepa salvaje, indicando que estos factores no afectan el tráfico, y por lo tanto la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis*, confirmando los resultados obtenidos en los ensayos de protección a polimixina B.

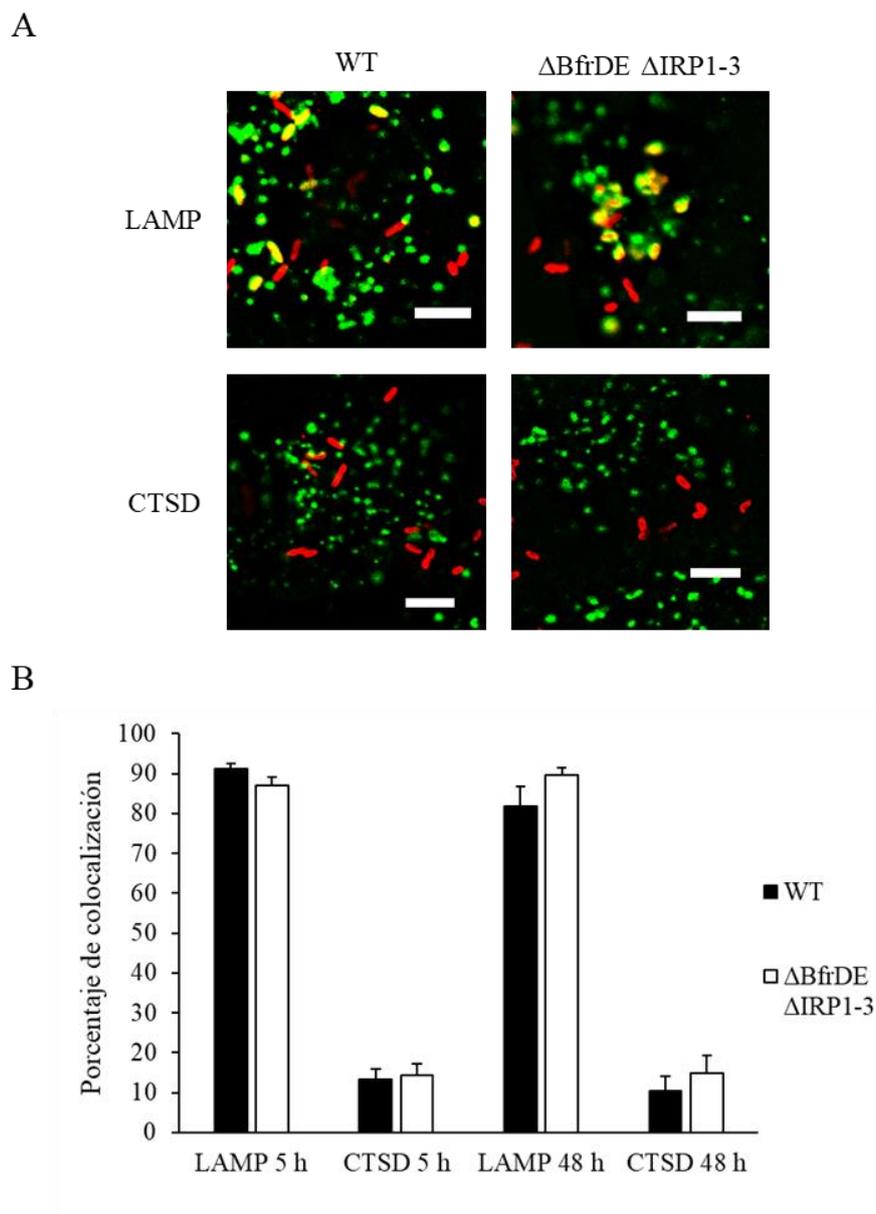


Figura 12. Tráfico intracelular de *B. pertussis* defectiva en BfrD, BfrE, e IRP1-3 en células epiteliales. Células 16HBE14o- polarizadas durante siete días fueron incubadas con la cepa salvaje de *B. pertussis* (WT) o la cepa isogénica defectiva en BfrD, BfrE e IRP1-3 (Δ BfrDE y Δ IRP1-3, respectivamente) a una multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula durante 4 horas a 37°C, lavadas e incubadas con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares. A las 5 y 48 horas post infección las muestras fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y permeabilizadas. Las bacterias se detectaron utilizando sueros policlonales de conejo dirigidos contra *B. pertussis* seguido de fracciones F(ab')₂ de anticuerpos de cabra contra conejo conjugados con el fluoróforo Cy3 (rojo). LAMP-2 (CD107b) se detectó utilizando anticuerpos monoclonales de ratón seguido de fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra contra ratón conjugados con el fluoróforo Alexa-647 (verde).

Catepsina D fue detectada con anticuerpos monoclonales de ratón seguido de fragmentos F(ab')₂ de anticuerpo de cabra contra ratón conjugado con el fluoróforo Alexa-647 (verde). **A)** Imágenes representativas de bacterias de las dos cepas colocalizando con LAMP-2 y catepsina D. **B)** Porcentaje de las bacterias internalizadas que colocalizan con cada marcador a las 5 y 48 horas post infección. La figura muestra la media ± DE de tres experimentos independientes.

4.2.2.8. Análisis del factor MgtC en la adaptación al entorno intracelular epitelial

A partir del estudio de la evolución del proteoma de *B. pertussis* durante la infección intracelular en macrófagos se identificó una proteína, MgtC (BP0414), con un rol relevante en la sobrevivencia intracelular [274], [381]. Esta proteína es una enzima con actividad ATP sintasa, potencialmente involucrada en la homeostasis del magnesio y el mantenimiento de gradientes de pH, que evita la producción de niveles supra-fisiológicos de ATP y permite la adaptación a entornos moderadamente ácidos [381]. La expresión intracelular de este factor se detectó en la adaptación tardía (48 horas) de *B. pertussis* en macrófagos. En este estudio de evolución del proteoma de *B. pertussis* dentro de células epiteliales no se detectó la presencia de este factor en localización intracelular ya sea por no estar presente o porque algún problema de sensibilidad de la técnica sumado al efecto de dilución de proteínas bacterianas por la presencia de proteínas eucariotas en la muestra haya imposibilitado su detección. Ya que este factor demostró tener un efecto en el tráfico intracelular y en la sobrevivencia de *B. pertussis* en células inmunes se evaluó su rol en la evolución de estas dos variables a lo largo de la infección intracelular epitelial empleando una cepa mutante de *B. pertussis* defectiva en MgtC.

La sobrevivencia intracelular de la cepa salvaje y de la cepa mutante defectiva en MgtC fue analizada por ensayos de protección a polimixina B con su respectivo control de adhesión e internalización según se describió en las secciones previas. La Figura 13 muestra que no hay diferencias significativas en la adhesión e internalización (Figuras 11A y 11B) ni en la sobrevivencia intracelular (Figura 11C) de la cepa mutante y la cepa salvaje indicando que MgtC no tiene un rol relevante en la supervivencia de *B. pertussis* en este tipo celular.

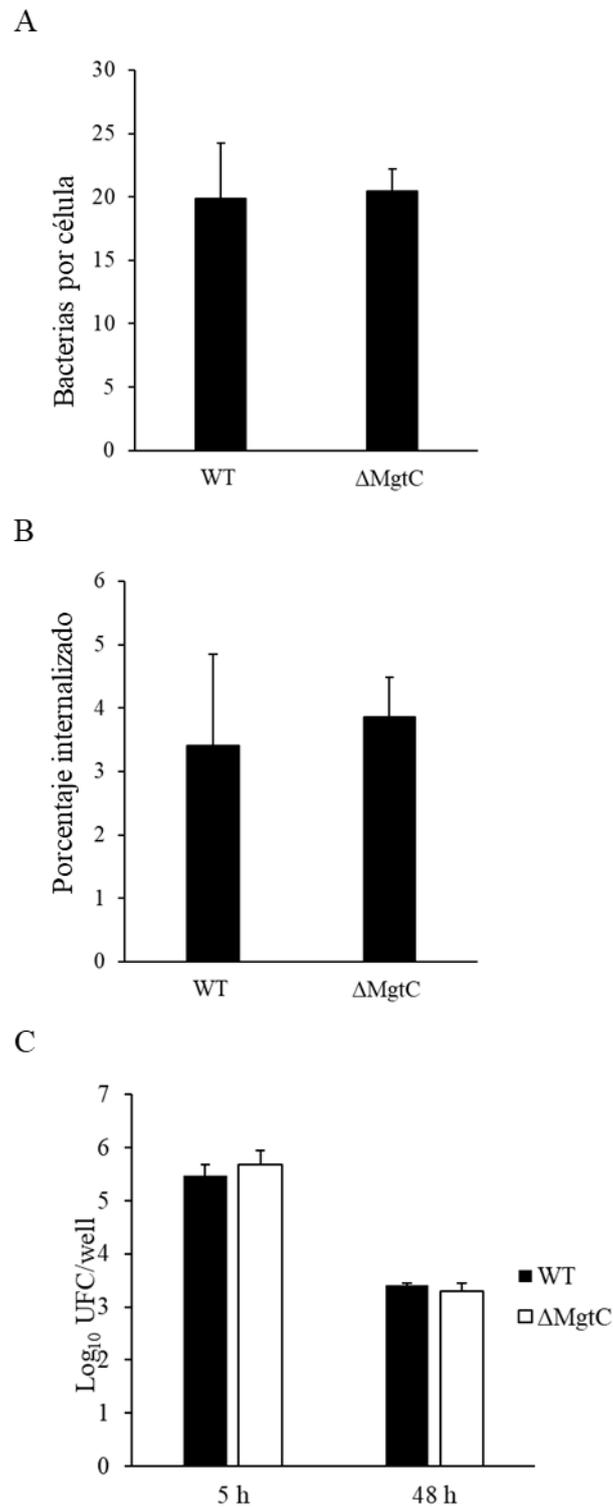


Figura 13. Sobrevida intracelular de *B. pertussis* defectiva en MgtC en células epiteliales. Células 16HBE14o- polarizadas durante siete días fueron incubadas con la cepa salvaje de *B. pertussis* (WT) o la cepa isogénica defectiva en MgtC (Δ MgtC) a una multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula durante 4 horas a 37°C, lavadas e incubadas con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares. El número de bacterias

extracelulares e intracelulares en células infectadas durante 5 horas sin tratamiento con antibiótico fue discriminado con doble marcación fluorescente y cuantificado mediante microscopía de fluorescencia para determinar los niveles de adhesión e internalización. A las 5 y 48 horas post infección se determinó el número de unidades formadoras de colonias por pocillo. **A)** Número de bacterias totales por célula. **B)** Porcentaje de las bacterias totales que se encuentra en localización intracelular. **C)** Nivel de sobrevida intracelular expresado como el logaritmo en base 10 del número de UFC por pocillo a cada tiempo evaluado. En cada caso las figuras muestran la media \pm DE de dos experimentos independientes realizados cada uno por triplicado.

El tráfico intracelular se analizó por microscopía confocal según se describió en las secciones anteriores. En los resultados que se muestran en la Figura 14 se observa que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de colocación con LAMP-2 y catepsina D de la cepa deficiente en MgtC y la cepa salvaje, lo cual es acorde a los resultados de sobrevida intracelular y confirma que esta proteína no está implicada en el destino intracelular de *B. pertussis* en células epiteliales.

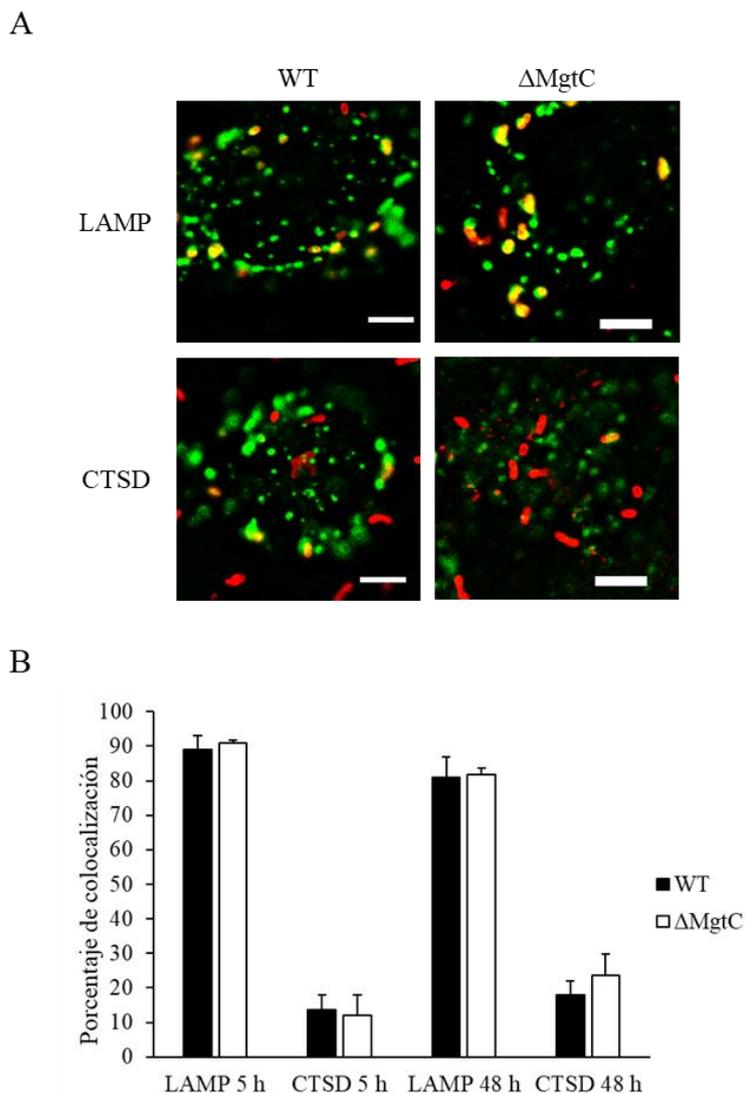


Figura 14. Tráfico intracelular de *B. pertussis* defectiva en MgtC en células epiteliales. Células 16HBE140- polarizadas durante siete días fueron incubadas con la cepa salvaje de *B. pertussis* (WT) o la cepa isogénica defectiva en MgtC (Δ MgtC) a una multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula durante 4 horas a 37°C, lavadas e incubadas con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares. A las 5 y 48 horas post infección las muestras fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y permeabilizadas. Las bacterias se detectaron utilizando sueros policlonales de conejo dirigidos contra *B. pertussis* seguido de fracciones F(ab')₂ de anticuerpos de cabra contra conejo conjugados con el fluoróforo Cy3 (verde). LAMP-2 (CD107b) se detectó utilizando anticuerpos monoclonales de ratón seguido de fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra contra ratón conjugados con el fluoróforo Alexa-647 (rojo). Catepsina D fue detectada con anticuerpos monoclonales de ratón seguido de fragmentos F(ab')₂ de anticuerpo de cabra contra ratón conjugado con el fluoróforo Alexa-647 (rojo). **A)** Imágenes representativas de bacterias colocalizando con

LAMP-2 y catepsina D. **B)** Porcentaje de las bacterias internalizadas que colocalizan con cada marcador a las 5 y 48 horas post infección. La figura muestra la media \pm DE de dos experimentos independientes.

4.3. Discusión

El establecimiento de un nicho implica para un microorganismo la adaptación de su fenotipo a las condiciones impuestas por el mismo. En el caso de un patógeno esta adaptación tiene que permitirle sobrevivir a condiciones que suelen ser particularmente exigentes ya que debe lidiar con varios mecanismos del hospedador destinados a su eliminación. La persistencia de *B. pertussis* y su circulación en poblaciones con alta tasa de vacunación es uno de varios ejemplos en que los patógenos logran llevar a cabo esta adaptación exitosamente. Estudios previos han demostrado que *B. pertussis* es capaz de adaptarse al tracto respiratorio del hospedador e incluso de sobrevivir en el interior de algunos tipos celulares presentes en el sitio de infección [120], [371], [378]. En particular, nuestro grupo y otros describieron la capacidad de este patógeno de sobrevivir en el interior de células inmunes y, combinando abordajes proteómicos con estudios funcionales, se logró avanzar en la caracterización de varios factores relevantes para esta adaptación [83], [87], [273], [274], [379], [380], [381]. En el Capítulo 3 de este trabajo de Tesis se demostró que *B. pertussis* tiene, además, la capacidad de abrir las uniones estrechas del epitelio respiratorio, acceder al interior de las células y de sobrevivir en esa localización. En un intento de profundizar el estudio de la interacción de *B. pertussis* con células del epitelio respiratorio, en este capítulo se estudió la evolución del proteoma bacteriano durante 48 horas de infección intracelular buscando comprender el proceso de adaptación bacteriana al entorno intracelular del epitelio. Este estudio permitió identificar características de lo que podría ser el fenotipo persistente de este patógeno y comparar la adaptación de *B. pertussis* al nicho intracelular epitelial y al nicho intracelular en células inmunes, así como la relevancia de determinados factores particulares en ambos procesos.

En estudios previos del proteoma de *B. pertussis* aislada de localización intracelular de macrófagos se identificaron 762 proteínas y se observaron cambios en la abundancia de, aproximadamente, el 30% de las mismas [274]. Al evaluar las proteínas diferenciales entre lo que sería una adaptación temprana y una adaptación tardía (3 y 48 horas post infección) se observaron variaciones únicamente en el 8% de las proteínas identificadas, sugiriendo que la adaptación ocurre mayoritariamente a tiempos cortos luego de la infección [274]. En este estudio la cantidad de proteínas identificadas fue mayor, 1048 proteínas identificadas en total y se observaron cambios en la abundancia de, aproximadamente, el 15% de las de las mismas. No se identificaron diferencias significativas en la abundancia de proteínas entre los tiempos cortos y largos en localización intracelular. Sin embargo, sí se identificaron proteínas

cuya abundancia es significativamente diferente al de las bacterias infectantes recién en muestras de 48 horas, sugiriendo que el fenotipo de la bacteria se modifica a lo largo de todo de tiempo de infección intracelular evaluado en estos ensayos.

En función de los resultados de los estudios de la adaptación del proteoma de *B. pertussis* al entorno intracelular epitelial y de macrófagos se pueden identificar algunas similitudes y diferencias entre ambos procesos. La única proteína cuya abundancia aumentó en localización intracelular en ambos tipos celulares fue la subunidad B del complejo NADH ubiquinona oxidorreductasa NuoB, involucrada en la obtención de ATP. Por otro lado, se encontraron un total de 30 proteínas cuya abundancia disminuyó en localización intracelular tanto en macrófagos como en células epiteliales. Estas proteínas son en su mayoría enzimas metabólicas y muchas de ellas están involucradas en el metabolismo de compuestos relacionados con bases nitrogenadas y nucleósidos. Esto sugiere que *B. pertussis* en localización intracelular disminuye o detiene la duplicación celular, algo que podría esperarse debido al estrés que implica un cambio entre medio de cultivo y la localización intracelular. Cabe destacar que, si bien una desaceleración del metabolismo podría ser indicativa también de una cinética de muerte, los resultados de las UFC que se recuperan a medida que progresa la infección mostrados en el Capítulo 3 y el aumento de proteínas relacionados con la adquisición de un nutriente esencial como el hierro y con la síntesis de ATP contradicen esta hipótesis y evidencian que *B. pertussis* se mantiene viable en esta localización. También en macrófagos se observaron altos niveles de UFC en localización intracelular en conjunto con la disminución de estas proteínas relacionadas con el metabolismo [274]. Se ha descrito que la desaceleración metabólica y el fenotipo de dormancia se relacionan con la persistencia bacteriana asociada a la tolerancia a antibióticos y factores de estrés [464], [474]. Las bacterias que adquieren este fenotipo se denominan persistoras y se encuentran en un estado de no-crecimiento y con muerte lenta ya que no llevan a cabo actividades celulares que puedan ser corrompidas por efecto de compuestos antimicrobianos, volviéndose insensibles a los mismos [464], [474]. Esta descripción es extensiva a los microorganismos patógenos y también para el caso particular de patógenos intracelulares [474]. Según se describió, este fenotipo se ve inducido en condiciones de estrés como podrían ser las encontradas en infecciones intracelulares.

Los resultados de este estudio proteómico indican que la adaptación de *B. pertussis* al entorno intracelular epitelial conlleva principalmente una disminución del metabolismo y de rutas asociadas a la producción de biomasa, con disminución en la abundancia de proteínas involucradas en varias rutas biosintéticas y en la síntesis proteica en los ribosomas. Estos

resultados coinciden con los obtenidos analizando la respuesta transcripcional de *B. pertussis* al entorno intracelular de macrófagos en los que se observa la disminución de genes relacionados con la transcripción y con el metabolismo de determinados aminoácidos [379], [380]. Estudios transcriptómicos demostraron que *B. bronchiseptica* también responde al entorno intracelular de macrófagos disminuyendo la expresión de varios genes relacionados con la biogénesis de la estructura celular y la proliferación entre los que se encuentra *ftsZ*, relacionado con la división celular [475] y cuyo producto proteico se identificó con abundancia disminuida en este estudio también. Tomados en conjunto, los resultados de nuestro estudio y los reportados en bibliografía sugieren que *Bordetella* podría adoptar un fenotipo persistor en localización intracelular tanto en células epiteliales como en células inmunes. Este tipo de fenotipo está asociado a infecciones crónicas difíciles de erradicar [474] y que *B. pertussis* sea capaz de sobrevivir en localización intracelular adoptando este fenotipo podría ser determinante en el ciclo infeccioso de este patógeno, contribuyendo a explicar la persistencia del mismo en la población.

Los sistemas de dos componentes constituyen un mecanismo de regulación génica muy común en los microorganismos, y les permite adaptarse rápidamente a las condiciones ambientales a través de la inducción de la expresión de genes en respuesta a estímulos específicos [476]. *B. pertussis* tiene varios sistemas de dos componentes relevantes para su patogénesis y, además, varios sistemas putativos cuya función y relevancia no han sido esclarecidos aún. De los pertenecientes a este último grupo, en este estudio sólo fueron identificados dos, BP0160 y BP2934, pertenecientes a sistemas que responden a fosfato inorgánico y a condiciones redox respectivamente. Ninguno de estos factores fue identificado en el proteoma de *B. pertussis* aislada de macrófagos, aunque en el transcriptoma de bacterias en macrófagos fueron identificaron sin cambios en su expresión [379]. Estos resultados parecen sugerir que estos reguladores podrían intervenir en la adaptación al entorno intracelular, pero más estudios son necesarios para determinar si poseen alguna función durante el proceso infeccioso o si son sólo un vestigio evolutivo conservado de los ancestros de vida ambiental a partir de los cuales evolucionó este patógeno. En este estudio tampoco se detectaron modificaciones en la abundancia del sistema PlrSR ni del sensor histidina quinasa BP1092 recientemente caracterizado por nuestro grupo de investigación (Debandi y col. en revisión). A diferencia de lo observado en este estudio, la abundancia de BP1092 en macrófagos está incrementada con respecto al control [274]. En estudios preliminares destinados a evaluar la importancia de BP1092 llevados a cabo con una cepa mutante construida en nuestro laboratorio se observó que efectivamente este factor es importante para

la sobrevida de *B. pertussis* en macrófagos pero no es relevante para la sobrevida de esta bacteria en células epiteliales (Debandi, datos no publicados). En estos estudios preliminares se observó que BP1092 está involucrada en la regulación de la expresión de BvgA, BvgS y BvgR así como también de varios factores de virulencia, entre los que se encuentran CyaA, PT y FHA. Se requieren más estudios para determinar si la regulación de BP1092 sobre los factores de virulencia ocurre en forma directa o a través del sistema BvgAS, pero la regulación de CyaA y PT por BP1092 podría explicar las diferencias observadas en el rol de este factor en la infección intracelular en células epiteliales y en macrófagos. El aumento de la abundancia de BP1092 observado en bacterias aisladas de macrófagos podría influir en los niveles de expresión de CyaA y PT, ambas necesarias para modular los mecanismos bactericidas del macrófago y promover la sobrevida intracelular bacteriana. En cambio, en las células epiteliales donde no se requiere la actividad de las toxinas para la sobrevida, BP1092 no influye en el nivel de sobrevida intracelular.

Por otro lado, nuestros estudios mostraron que la abundancia de otro regulador de respuesta, BP3222, disminuye en el interior de las células epiteliales. En bacterias residiendo dentro de macrófagos la abundancia de este factor aumentó a tiempos largos post infección [274], aunque no se observaron diferencias a nivel transcripcional [379]. BP3222 está codificado junto a la quinasa RisK, sugiriendo que podría regular la expresión de sus genes blanco al ser fosforilado por la misma. RisK es la quinasa que fosforila al regulador de respuesta RisA, cuyo regulón ha sido caracterizado a nivel transcriptómico e incluye una gran cantidad de *vrgs* (genes reprimidos en virulencia) [180], [477]. Nuestro grupo está actualmente estudiando el factor BP3222 y los resultados preliminares de estudios de proteómica comparativa utilizando una cepa mutante defectiva en este factor construida en nuestro laboratorio indican que regula la expresión de *vrgs* y *vags* (genes activados en virulencia), sugiriendo que podría estar involucrado en el ajuste fino de la modulación de la virulencia (Carrica, datos no publicados). La distinta relevancia de los factores de virulencia durante el proceso de adaptación al entorno intracelular en macrófagos y en células epiteliales podría explicar la tendencia opuesta en la expresión de este factor en cada caso. Además, estos estudios sugieren que tanto RisA como BP3222, a través de su fosforilación por RisK, estarían involucrados en la modulación fina de la virulencia de *B. pertussis*, lo cual representa un nuevo nivel de regulación para el fenotipo de *B. pertussis* en respuesta al entorno. De cualquier forma, estos resultados justifican que se estudie en profundidad la interrelación de los sistemas BvgAS, RisK-RisA y RisK-BP3222, y su importancia relativa en la regulación de la expresión de *vags* y *vrgs* en respuesta al entorno y su relevancia durante la infección.

El sistema de dos componentes mejor caracterizado y actualmente considerado como el más relevante para la patogénesis de *B. pertussis* es el sistema de dos componentes BvgAS, involucrado en la modulación de la expresión de los principales factores de virulencia de la bacteria. Según los resultados de este estudio, el entorno intracelular epitelial no induce cambios en la abundancia de ninguno de los componentes (BvgA o BvgS). Tampoco se habían registrado cambios en la abundancia de este sistema en respuesta al entorno intracelular de macrófagos, ni se modificó significativamente la abundancia de los principales factores de virulencia en bacterias aisladas de macrófagos o de células epiteliales comparadas con el control (bacterias infectantes). Teniendo en cuenta que en ambos casos la bacteria infectante está en fase virulenta, estos resultados sugerirían que esta es la fase en la que persiste *B. pertussis* en localización intracelular. Por otro lado, en este estudio se detectó disminuida la abundancia del factor BvgR, cuya función es reprimir la expresión de los *vrgs* durante la fase virulenta. Sin embargo, no se detectaron *vrgs* conocidos con abundancia aumentada, sugiriendo que la disminución de BvgR no es suficiente para reflejarse en modificaciones en los niveles de expresión de los *vrgs* o que el efecto del mismo no se alcanzó a detectar en el tiempo evaluado en este estudio. Aunque estos resultados a nivel proteómico parecen indicar que el entorno intracelular no afecta considerablemente el estado de virulencia de la bacteria al menos hasta las 48 horas ([274] y este estudio), estudios transcriptómicos parecen indicar lo contrario. Estudios previos de la respuesta transcripcional de *B. pertussis* al entorno intracelular en macrófagos detectaron la disminución de la expresión de varios factores de virulencia como pertactina, fimbrias, PT y componentes del sistema de secreción de tipo 3 entre otros [379], [380]. La misma tendencia se observó en estudios transcriptómicos de *B. bronchiseptica* aislada de macrófagos murinos RAW 264.7 en los que se observó una disminución en la expresión de transcritos de factores de virulencia tales como CyaA, toxina dermonecrótica y componentes del sistema de secreción de tipo 3 [475]. Mientras que las aparentes diferencias entre el transcriptoma y el proteoma de *B. pertussis* aislada de macrófagos podrían explicarse por las diferencias de sensibilidad y de diseño en tiempos de muestreo para cada caso, estudios realizados infectando macrófagos con cepas deficientes en PT o CyaA demostraron claramente que ambas toxinas poseen un rol inmunomodulador y que son relevantes para evitar el tráfico bactericida y promover la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* [87]. Esto podría deberse a que el entorno intracelular induzca una disminución de la expresión de factores de virulencia que no se alcanza a observar a nivel de proteoma a las 48 horas por la vida media de las proteínas. Si este fuera el caso, la actividad inmunomoduladora de ambas toxinas que mantiene la sobrevivencia de la

bacteria dentro del macrófago podría desaparecer a tiempos más largos debido a esta modulación de fase. La actividad bactericida del macrófago podría tornarse más eficiente a medida que desaparecen las toxinas y su efecto inmunomodulador, disminuyendo las posibilidades de *B. pertussis* de sobrevivir en esta localización intracelular a largo plazo. De ocurrir esto, los macrófagos podrían ser un nicho intracelular transitorio para la bacteria. En este sentido, las células del epitelio respiratorio podrían constituir un nicho más permisivo a largo plazo ya que, según los resultados mostrados en este capítulo, ninguna de estas toxinas características de la fase virulenta es necesaria para la supervivencia de *B. pertussis* dentro de este tipo celular. Esta diferencia es esperable ya que las células epiteliales no son fagocitos profesionales y sus mecanismos bactericidas son menos agresivos que los de los macrófagos cuya función principal es eliminar patógenos. Además, en este contexto es posible especular que las diferencias entre estos nichos podrían implicar distintos roles para cada uno a lo largo del ciclo infeccioso.

En el proteoma de *B. pertussis* aislada de macrófagos se observó un incremento significativo en la abundancia de proteínas implicadas en la reparación del ADN y asociadas con la respuesta SOS como son BP2506 y BP2081 (UvrC), sugiriendo una respuesta de *B. pertussis* ante un daño generalizado del ADN inducido por el ambiente [274]. Algo similar se observó en *B. bronchiseptica* persistiendo en localización intracelular en macrófagos [475]. Por el contrario, en bacterias que sobreviven en el interior de células epiteliales no se observaron aumentos en la abundancia de factores asociados a la respuesta SOS, sugiriendo que *B. pertussis* no está sometida a un daño generalizado de su material genético en el entorno intracelular epitelial, reforzando la hipótesis de que se trata de un entorno menos hostil. En apoyo de esta hipótesis, tanto en *B. pertussis* [274], [380] como en *B. bronchiseptica* [475] sobreviviendo dentro de macrófagos se observó la inducción de diversos factores asociados a la respuesta bacteriana a condiciones de estrés, cuya abundancia no se modificó en el proteoma de *B. pertussis* aisladas de células epiteliales en este estudio.

Los microorganismos aeróbicos deben lidiar con especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés *reactive oxygen species*) que se generan como subproductos de su metabolismo y son nocivas para sí mismos. Debido a esto es que han adquirido, a lo largo de su evolución, mecanismos que les permiten neutralizarlas. Incluso hay microorganismos que, por tener mecanismos de resistencia a ROS, producen grandes cantidades de las mismas, lo que les permite competir con otros por un determinado nicho. Uno de los mecanismos bactericidas de la inmunidad innata es justamente la producción de estas especies reactivas de oxígeno en el denominado estallido respiratorio asociado a la activación de la célula inmune. Los patógenos

exitosos poseen mecanismos que los protegen de este estallido respiratorio de las células en el entorno de la infección. *B. pertussis* es considerado un microorganismo microaerófilo que, si bien posee enzimas que permiten neutralizar las especies reactivas de oxígeno como la catalasa BP3852 y las superóxido dismutasas SodA y SodB (BP0913 y BP2761 respectivamente), se intoxica y no puede crecer en presencia de cantidades elevadas de oxígeno. Durante la infección, la actividad de CyaA, que inhibe la activación de las células inmunes y la producción de ROS, es crucial para la supervivencia de *B. pertussis* a la interacción con neutrófilos y macrófagos y su eventual supervivencia en localización intracelular en ambas células inmunes [83], [85], [87], [268]. El efecto inhibitorio de esta toxina podría explicar que *B. pertussis* no exprese SodA ni induzca las expresiones de SodB ni KatA incluso residiendo dentro de macrófagos [274]. La producción de especies reactivas de oxígeno como mecanismo inmune no se ha estudiado en profundidad en células epiteliales, aunque se documentaron aumentos en la producción de las mismas como respuesta a patógenos [478]. En este trabajo observamos que dentro de células epiteliales *B. pertussis* no expresa SodA, no induce la expresión de KatA y disminuye la expresión de SodB. Además, si también en este caso la toxina adenilato ciclasa ejerce una inhibición en la producción de especies reactivas de oxígeno, el efecto de la misma no parece ser relevante ya que la ausencia de esta toxina no afecta la supervivencia bacteriana.

Al ingresar al hospedador los patógenos se enfrentan a condiciones de escasez de minerales debido a que los vertebrados suelen secuestrarlos como parte de una estrategia que limita el crecimiento bacteriano [468]. Esto determina que los mecanismos de adaptación de los microorganismos a la baja disponibilidad de nutrientes resulten un factor relevante en la patogénesis de los mismos. En el caso particular de *B. pertussis*, la limitación nutricional que más se estudió es la limitación en la disponibilidad de hierro. El estudio de la misma permitió identificar varios de los mecanismos que posee este patógeno para adquirir hierro en diferentes estados de oxidación y a partir de diferentes sustratos [236], [469], [470], [471], [472], [473]. En lo que concierne a la adquisición de hierro en localización intracelular, estudios previos demostraron que BfrD y BfrE, involucrados en la adquisición de este metal a través de catecolaminas, promueven supervivencia intracelular en la infección intracelular en macrófagos [274]. En ese tipo celular se detectó un aumento significativo en la abundancia de ambos receptores en bacterias sobrevivientes en localización intracelular. En paralelo, se observó una disminución de la supervivencia intracelular en la cepa mutante defectiva en la expresión de los mismos a las 24 horas, que se recuperó a las 48 horas, sugiriendo que a tiempos largos post infección *B. pertussis* podría inducir la expresión de otros sistemas de

adquisición de hierro que compensen la ausencia de BfrD y BfrE. También se observó en macrófagos un aumento de la abundancia del transportador periplásmico IRP1-3 a tiempos largos post infección sugiriendo que podría estar involucrado en este eventual efecto compensatorio [274]. Para evaluar esta hipótesis se construyó una cepa defectiva en la expresión de los tres factores y se evaluó la sobrevida intracelular de la misma en macrófagos. Los resultados mostraron que la cepa mutante defectiva en los tres receptores sobrevive significativamente menos que la doble mutante defectiva en BfrD y BfrE a las 24 horas pero que, al igual que la doble mutante, el nivel de sobrevida intracelular se restablecía a nivel del de la cepa salvaje a las 48 horas (Cafiero, datos no publicados). Esto sugiere que *B. pertussis* utilizaría IRP1-3 para asimilar hierro a las 24 horas en ausencia de BfrD y BfrE, pero a largo plazo, en ausencia de BfrD, BfrE e IRP1-3, existe, o se induce, un mecanismo compensatorio mediado por algún otro factor distinto de estos tres descriptos. Si bien en este estudio del proteoma de *B. pertussis* en células epiteliales no se observó abundancia aumentada de ninguno de estos factores, se evaluó de todas formas la eventual importancia de los mismos en la sobrevida intracelular de *B. pertussis* en células epiteliales mediante mutantes. Los resultados del tráfico y la sobrevida intracelular demostraron que ninguno de estos receptores es particularmente relevante para el desarrollo de la infección en células del epitelio respiratorio. Por otro lado, se detectó un aumento significativo en la abundancia de un transportador putativo de sideróforos BP2016 (BrfB) en bacterias aisladas de las células epiteliales, indicando que la adquisición de hierro en este entorno intracelular podría estar mediada por este factor. También se identificó al receptor periplásmico BP1205 (AfuA) sin modificaciones en su abundancia entre las bacterias extracelulares e intracelulares. Este receptor es un transportador de tipo ABC involucrado en el transporte del hierro en complejo con sideróforos o alcaligina desde el periplasma hacia el citoplasma [129], [236] y podría actuar en conjunto con BrfB en el proceso de adquisición de hierro en localización intracelular epitelial. En resumen, aunque los factores involucrados en la adquisición de hierro de las bacterias que sobreviven en células epiteliales no fueron completamente identificados en este estudio, los resultados permiten concluir que no son los mismos que intervienen en la adquisición de hierro en macrófagos según resultados de nuestros estudios previos [274], sumando otra diferencia al entorno fagosomal en el que persiste *B. pertussis* en estos dos tipos celulares.

Otro factor con demostrada relevancia en la infección intracelular en otros patógenos [479] y de particular importancia para la sobrevida intracelular de *B. pertussis* en macrófagos es el transportador MgtC [381]. Este factor tiene la capacidad de inhibir la enzima ATP

sintasa anclada en la membrana bacteriana interna y evitar de esta forma la sobreproducción de ATP a partir del gradiente de protones generado entre el periplasma y el citoplasma. *B. pertussis* habita en compartimentos intracelulares con características de endosoma temprano [273], de pH moderadamente ácido [480], y dado que la membrana externa es permeable a los protones, la actividad de MgtC previene la producción de niveles suprafisiológicos de ATP y por lo tanto facilita la sobrevida de *B. pertussis* en macrófagos. Algo similar se observó en *P. aeruginosas*, cuando una cepa defectiva en este factor mostró un defecto en la infección de ratones que se revirtió por depleción de los macrófagos del modelo de infección [479]. Los resultados del presente estudio, en cambio, indican que en células epiteliales la ausencia de MgtC no es necesaria para la sobrevida intracelular de *B. pertussis*. Esto podría sugerir que en este tipo celular el fagosoma es menos ácido que en macrófagos y concuerda con el hecho de que en el proteoma de bacterias intracelulares tampoco se haya observado un aumento en la expresión de proteínas relacionadas con la adaptación al estrés por bajo pH.

En resumen, los resultados presentados en este capítulo constituyen una primera aproximación al proceso de adaptación de *B. pertussis* al entorno intracelular epitelial y permiten vislumbrar diferencias y similitudes con la adaptación al nicho intracelular en macrófagos. Los mismos fueron obtenidos utilizando un modelo de infección que retiene características importantes del epitelio respiratorio como uniones estrechas funcionales. Tomados en conjunto sugieren que el entorno intracelular epitelial es menos agresivo para el patógeno ya que no se observa inducción de respuesta a estrés a diferencia de lo que ocurre en macrófagos. Esto es coherente con la mayor tasa de sobrevida en este modelo epitelial (Capítulo 3) en comparación con la tasa de sobrevida en macrófagos [274]. También en este sentido, se observó que la actividad inmunomoduladora de las toxinas CyaA y PT, promotora de la sobrevida intracelular en macrófagos no es necesaria en este tipo celular. La disminución en la abundancia de proteínas relacionadas con el metabolismo sugiere que este patógeno podría inducir un fenotipo persistor en localización intracelular, lo que lo tornaría menos susceptible a los posibles mecanismos bactericidas presentes en las células epiteliales. Además de esto y según se discutió previamente en esta sección, este tipo de fenotipo está asociado a infecciones crónicas y patógenos de difícil erradicación y contribuiría a explicar la dificultad para controlar las infecciones por *B. pertussis*.

Este estudio, aunque nos permitió avanzar en la comprensión de la interacción entre la bacteria y la célula epitelial respiratoria, y es concluyente en algunos aspectos, aún es preliminar en otros y debe ser confirmado con abordajes complementarios. Esto se debe, por un lado, a la contaminación de las muestras con proteínas eucariotas provenientes de las

células hospedadoras que, aunque no afectan la identificación, implica una menor concentración de proteínas bacterianas y disminuye la sensibilidad de las determinaciones. Por otro lado, también es necesario estudiar la evolución de la infección a plazos más largos. Al momento de la redacción de este manuscrito estamos trabajando en ambos aspectos. Para mejorar la calidad de las muestras se planea realizar un paso de separación por citometría de flujo (*cell sorting*) de las células infectadas y las no infectadas presentes en el sistema. Esta muestra de células infectadas tendrá una mayor proporción de proteína bacteriana sobre proteína total y sería utilizada como material de partida para el proceso de aislamiento de *B. pertussis* intracelular. En paralelo se prevé completar el estudio presentado en este trabajo de Tesis evaluando la respuesta de las células hospedadoras a la infección. Para llevar a cabo este análisis, que complementa el estudio que se está llevando a cabo sobre la respuesta a la infección en macrófagos en nuestro laboratorio, también se empleará el paso de separación por citometría de flujo ya que nos permitirá estudiar por separado células infectadas y células que están presentes en el entorno de infección pero no tienen bacterias internalizadas. Con un apropiado control de células no incubadas con bacterias, este diseño permitirá evaluar en simultáneo y de manera discriminada la respuesta de la célula al entorno de infección y la respuesta de la célula con una infección activa. Hasta el momento no hay estudios que evalúen las infecciones intracelulares de *B. pertussis* de esta forma. La respuesta celular a este patógeno se ha estudiado de forma global sólo a nivel transcriptómico y abarcando una mezcla de poblaciones de células infectadas y no infectadas que probablemente estén respondiendo de manera distinta. Creemos que esta nueva estrategia de estudio que proponemos permitirá obtener resultados más concluyentes y completará el conocimiento ya obtenido de la respuesta epitelial general a la infección por *B. pertussis*.

4.4. Tabla Anexa

Comparación de abundancia de las proteínas de *B. pertussis* identificadas en las muestras de bacterias infectantes en localización extracelular (control), y aisladas de localización intracelular a 5 horas y 48 horas post infección (Intracelular 5h e Intracelular 48h respectivamente). Las proteínas con niveles de abundancia significativamente modificados se encuentran sombreadas. La comparación entre las condiciones Intracelular 48h vs Intracelular 5h no se muestra debido a que no se identificaron proteínas con diferencias significativas al compararlas.

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP3690	BP3690	conserved hypothetical protein	4,13	0,01	0,09	4,18	0,01	0,03
BP2664	BP2664	putative MarR-family transcriptional regulator	3,56	0,02	0,23	3,23	0,26	0,76
BP3573	BP3573	putative branched-chain amino acid transport permease	2,82	0,01	0,04	2,73	0,06	0,30
BP1059	BP1059	hypothetical protein	2,24	0,13	0,65	1,22	0,51	1,00
BP3755	BP3755	putative outer membrane protein	2,16	0,01	0,02	0,37	0,86	1,00
BP3522	BP3522	putative membrane protein	2,16	0,64	1,00	-0,38	0,98	1,00
BP2016	brfB	putative ferric siderophore receptor	2,16	0,01	0,02	1,99	0,01	0,04
BP1412	folC	FolC bifunctional protein [includes: folylpolyglutamate synthase and dihydrofolate synthase]	2,08	0,01	0,07	2,41	0,01	0,01
BP0854	nuoN	NADH-ubiquinone oxidoreductase, chain N	1,98	0,08	0,47	0,03	1,00	1,00
BP1707	BP1707	putative ABC-transport protein, ATP-binding component	1,86	0,02	0,23	1,85	0,15	0,54
BP0903	BP0903	putative membrane protein	1,77	0,01	0,12	3,45	0,01	0,01
BP1355	BP1355	probable LacI-family transcriptional regulator	1,71	0,72	1,00	0,61	1,00	1,00
BP3759	BP3759	mce related protein	1,64	0,37	1,00	1,22	0,46	1,00
BP3532	exbB	MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein	1,61	0,42	1,00	0,60	0,89	1,00
BP2224	bapA	putative autotransporter	1,53	0,01	0,13	2,20	0,01	0,04
BP2997	fabE	biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase	1,53	0,94	1,00	1,12	0,55	1,00
BP0962	etfA	electron transfer flavoprotein alpha-subunit	1,36	0,61	1,00	1,04	0,79	1,00
BP0556	hmgcL	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	1,33	0,81	1,00	0,93	0,54	1,00
BP3766	murA	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	1,30	0,54	1,00	2,24	0,06	0,28
BP2507	fur	ferric ion uptake regulator	1,27	0,99	1,00	0,10	1,00	1,00
BP2906	BP2906	putative oxidoreductase	1,27	0,49	1,00	0,95	0,44	1,00
BP2927	BP2927	putative integral membrane protein	1,20	0,44	1,00	0,42	0,90	1,00

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP3533	exbD	biopolymer transport protein ExbD/TolR	1,19	0,87	1,00	-0,30	0,96	1,00
BP2764	BP2764	putative biopolymer transport protein	1,15	0,42	1,00	-0,20	1,00	1,00
BP0324	apaH	diadenosine-tetraphosphatase	1,15	0,22	0,85	0,88	0,92	1,00
BP0665	BP0665	thymidine diphosphoglucose 4,6-dehydratase	1,12	0,89	1,00	2,67	0,01	0,01
BP3417	ruvC	crossover junction endodeoxyribonuclease	1,10	0,54	1,00	1,45	0,17	0,58
BP1175	BP1175	putative exported protein	1,06	0,73	1,00	2,62	0,08	0,37
BP0840	BP0840	outer membrane porin protein precursor	1,10	0,06	0,43	0,15	1,00	1,00
BP1706	BP1706	probable ATP-binding ABC transporter protein	1,05	0,18	0,75	0,01	1,00	1,00
BP1756	BP1756	conserved hypothetical protein	1,04	0,29	0,98	0,66	0,99	1,00
BP2368	prpC	2-methylcitrate synthase	1,04	0,65	1,00	1,19	0,95	1,00
BP0491	dnaA	chromosomal replication initiator protein	1,03	0,97	1,00	1,29	0,93	1,00
BP1962	bfrI	putative ferrisiderophore receptor	1,03	0,59	1,00	-0,39	1,00	1,00
BP1435	BP1435	conserved hypothetical protein	1,02	0,88	1,00	0,13	1,00	1,00
BP0380	BP0380	putative Sodium:sulfate symportert	1,00	0,63	1,00	-0,26	0,99	1,00
BP2538	BP2538	integral membrane protein	0,97	0,71	1,00	-0,79	0,83	1,00
BP3809	BP3809	conserved hypothetical protein	0,96	0,87	1,00	1,52	0,29	0,79
BP3023	murG	UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-	0,96	0,88	1,00	1,77	0,87	1,00
BP1236	fkpB	FkbP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0,94	0,57	1,00	0,59	0,89	1,00
BP0761	cyaB	cyclolysin secretion ATP-binding protein	0,94	0,19	0,78	1,32	0,11	0,44
BP3636	secY	preprotein translocase SecY subunit	0,94	0,60	1,00	0,01	1,00	1,00
BP3485	ribH	putative 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	0,91	0,45	1,00	0,91	0,33	0,88
BP3349	rppH	RNA pyrophosphohydrolase	0,90	0,99	1,00	2,00	0,07	0,32
BP3618	rplV	50S ribosomal protein L22	0,90	0,89	1,00	0,33	1,00	1,00
BP3651	BP3651	putative membrane protein	0,89	0,90	1,00	0,16	1,00	1,00
BP2864	BP2864	putative alcohol dehydrogenase	0,88	0,56	1,00	1,18	0,05	0,26
BP0184	BP0184	putative exported protein	0,87	0,83	1,00	1,17	0,90	1,00
BP0259	cydA	cytochrome D ubiquinol oxidase subunit I	0,87	0,41	1,00	0,06	1,00	1,00
BP1107	lolC	lipoprotein releasing system transmembrane protein	0,85	0,16	0,71	1,42	0,82	1,00
BP0573	trkA	Trk system potassium uptake protein	0,85	0,90	1,00	0,80	0,83	1,00

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP1274	livG	high-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein	0,84	0,21	0,83	1,52	0,04	0,21
BP0842	nuoB	NADH-ubiquinone oxidoreductase, 20 kDa subunit	0,83	0,34	1,00	2,10	0,01	0,03
BP3028	ftsI	peptidoglycan synthetase precursor	0,82	1,00	1,00	-0,14	1,00	1,00
BP0848	nuoH	NADH-ubiquinone oxidoreductase, chain H	0,81	0,44	1,00	0,47	0,77	1,00
BP2493	BP2493	putative ATP-binding protein	0,80	0,86	1,00	0,39	1,00	1,00
BP3124	rplY	50S ribosomal protein L25	0,79	0,91	1,00	0,35	1,00	1,00
BP1796	uvrB	excinuclease ABC subunit B	0,78	0,36	1,00	1,33	0,05	0,28
BP1105	recJ	single-stranded-DNA-specific exonuclease	0,77	0,59	1,00	-1,47	0,32	0,84
BP2347	BP2347	putative polyamine transport ATP-binding protein	0,76	0,23	0,86	0,62	0,63	1,00
BP3284	atpF	ATP synthase B chain	0,76	0,98	1,00	0,20	1,00	1,00
BP2400	BP2400	putative coenzyme A transferase subunit	0,72	0,60	1,00	1,03	0,96	1,00
BP3029	ftsL	putative cell division protein	0,76	0,81	1,00	1,26	0,46	1,00
BP3121	ychF	ribosome-binding ATPase YchF	0,74	0,65	1,00	-0,84	0,85	1,00
BP3758	BP3758	putative membrane protein	0,72	0,75	1,00	0,04	1,00	1,00
BP3223	BP3223	two-component sensor kinase	0,72	1,00	1,00	1,06	0,04	0,24
BP3008	grp	glutamate uptake regulatory protein	0,72	0,76	1,00	1,69	0,44	0,99
BP0170	rhIE	putative ATP-dependent RNA helicase	0,71	0,89	1,00	0,05	1,00	1,00
BP0749	rplU	50S ribosomal protein L21	0,71	0,87	1,00	0,58	0,81	1,00
BP3026	mraY	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	0,71	0,57	1,00	-1,47	0,79	1,00
BP0014	rplL	50S ribosomal protein L7/L12	0,69	1,00	1,00	1,55	0,67	1,00
BP3800	BP3800	putative membrane protein	0,68	0,73	1,00	0,57	1,00	1,00
BP3286	atpA	ATP synthase alpha chain	0,68	0,99	1,00	0,02	1,00	1,00
BP3760	BP3760	putative lipoprotein	0,68	0,60	1,00	-0,71	1,00	1,00
BP1425	dxr	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	0,67	0,24	0,88	0,66	0,78	1,00
BP1014	pitA	probable phosphate transporter	0,67	0,47	1,00	0,11	1,00	1,00
BP2894	BP2894	putative LysR-family transcriptional regulator	0,67	0,68	1,00	0,06	1,00	1,00
BP3650	BP3650	putative cytochrome C precursor	0,66	0,85	1,00	0,69	0,90	1,00
BP0905	mrcA	penicillin-binding protein 1A	0,65	0,64	1,00	0,60	0,99	1,00
BP1037	Int	Putative apolipoprotein N-acyltransferase	0,64	0,96	1,00	0,82	0,83	1,00
BP2506	BP2506	DNA repair protein	0,64	1,00	1,00	0,71	0,77	1,00
BP2188	purA	adenylosuccinate synthetase	0,61	0,99	1,00	0,06	1,00	1,00
BP0276	petB	cytochrome B	0,60	0,89	1,00	-0,21	1,00	1,00

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP3857	BP3857	putative hydrolase	0,60	0,96	1,00	0,41	1,00	1,00
BP0533	BP0533	probable transcriptional regulator	0,58	0,99	1,00	0,56	0,86	1,00
BP2178	BP2178	putative ABC transporter, ATP-binding subunit	0,58	1,00	1,00	1,71	0,53	1,00
BP1211	BP1211	putative exported protein	0,57	0,97	1,00	-0,21	1,00	1,00
BP2745	BP2745	putative ABC transport protein, ATP-binding component	0,57	0,75	1,00	0,33	1,00	1,00
BP0258	BP0258	conserved hypothetical protein	0,55	0,61	1,00	-0,28	1,00	1,00
BP1815	BP1815	conserved hypothetical protein	0,54	0,82	1,00	-0,12	1,00	1,00
BP1758	BP1758	probable fatty acid desaturase	0,54	0,80	1,00	1,71	0,01	0,08
BP1466	mobA	molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein A	0,54	0,64	1,00	0,01	1,00	1,00
BP2806	BP2806	putative cation transport protein	0,54	0,91	1,00	1,40	0,35	0,89
BP1701	ldcA1	putative muramoyltetrapeptide carboxypeptidase	0,54	0,99	1,00	0,71	0,60	1,00
BP0800	BP0800	probable zinc-binding dehydrogenase	0,53	1,00	1,00	0,78	1,00	1,00
BP1227	radA	DNA repair protein	0,51	0,45	1,00	0,84	0,85	1,00
BP2430	era	GTPase Era	0,50	0,96	1,00	-1,04	0,72	1,00
BP0945	serC	phosphoserine aminotransferase	0,50	0,81	1,00	-0,48	0,97	1,00
BP1125	odhB	dihydroliipoamide succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	0,49	1,00	1,00	0,08	1,00	1,00
BP2388	kdsA	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	0,50	0,95	1,00	-0,39	0,98	1,00
BP3254	purU	putative formyltetrahydrofolate deformylase	0,48	0,90	1,00	-0,03	1,00	1,00
BP3420	BP3420	putative serine/threonine dehydratase	0,48	0,98	1,00	-1,74	0,94	1,00
BP2574	pheS	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit alpha (RefSeq)	0,47	0,98	1,00	0,18	1,00	1,00
BP3646	dsbD	thiol:disulfide interchange protein DsbD	0,46	1,00	1,00	0,74	0,93	1,00
BP1819	ugpB1	glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein precursor	0,46	1,00	1,00	0,97	0,37	0,91
BP3770	hisB	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	0,45	1,00	1,00	0,27	1,00	1,00
BP0169	BP0169	putative exported protein	0,45	0,93	1,00	-1,04	0,36	0,90
BP2586	BP2586	integral membrane protein	0,44	0,81	1,00	0,01	1,00	1,00
BP3491	ndh	putative NADH dehydrogenase	0,44	0,91	1,00	0,09	1,00	1,00
BP3740	coIII	putative cytochrome c oxidase, subunit III	0,43	0,82	1,00	-0,25	0,91	1,00
BP3747	cpdA1	3',5'-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase CpdA	0,43	0,83	1,00	0,13	1,00	1,00

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP3419	BP3419	conserved hypothetical protein	0,43	0,95	1,00	-0,01	1,00	1,00
BP2543	metE	5-methyltetrahydropteroyltryglutamate-homocysteine methyltransferase	0,42	1,00	1,00	-0,35	1,00	1,00
BP1046	secD	protein-export membrane protein	0,42	1,00	1,00	-0,67	1,00	1,00
BP3057	BP3057	putative ATP-dependent RNA helicase	0,42	0,90	1,00	0,15	1,00	1,00
BP0003	parA	ParA family protein	0,41	1,00	1,00	-1,19	0,97	1,00
BP1549	dnaX	DNA polymerase III subunit Tau	0,41	1,00	1,00	-0,60	0,99	1,00
BP2886	BP2886	putative lipoprotein	0,41	0,99	1,00	-0,44	0,96	1,00
BP3155	folA	dihydrofolate reductase	0,40	0,85	1,00	-1,35	0,09	0,38
BP3214	BP3214	putative membrane-bound lytic murein transglycosylase D precursor	0,40	1,00	1,00	0,59	1,00	1,00
BP0214	queC	7-cyano-7-deazaguanine synthase	0,40	0,94	1,00	0,46	0,98	1,00
BP1817	ascD	CDP-6-deoxy-L-threo-D-glycero-4-hexulose-3-dehydrogenase reductase	0,39	1,00	1,00	-0,93	0,87	1,00
BP0849	nuoI	NADH-ubiquinone oxidoreductase, chain I	0,39	0,89	1,00	0,52	0,76	1,00
BP2816	metN	methionine import ATP-binding protein MetN	0,38	1,00	1,00	0,30	1,00	1,00
BP0197	gcvP	glycine cleavage system P protein	0,38	0,99	1,00	0,45	1,00	1,00
BP3072	BP3072	putative acyltransferase	0,37	0,96	1,00	0,96	0,96	1,00
BP2533	ppa	inorganic pyrophosphatase	0,36	1,00	1,00	1,15	0,62	1,00
BP2440	acpP	acyl carrier protein	0,36	0,95	1,00	0,71	0,82	1,00
BP3828	BP3828	putative amino acid ABC transporter ATP-binding protein	0,34	1,00	1,00	-0,12	1,00	1,00
BP2196	bamB	outer membrane protein assembly factor BamB	0,34	0,90	1,00	-0,70	0,61	1,00
BP3413	BP3413	putative monooxygenase	0,34	0,96	1,00	-1,42	0,15	0,54
BP0845	nuoE	respiratory-chain NADH dehydrogenase I, 24 kDa subunit	0,33	1,00	1,00	0,56	0,97	1,00
BP2744	BP2744	putative ABC transport protein, ATP-binding component	0,32	1,00	1,00	-0,28	1,00	1,00
BP0275	petC	cytochrome C1 precursor	0,32	1,00	1,00	-0,98	0,77	1,00
BP0034	glyS	glycyl-tRNA synthetase beta chain	0,32	1,00	1,00	-0,60	0,99	1,00
BP3285	atpH	ATP synthase delta chain	0,31	1,00	1,00	0,23	0,98	1,00
BP0036	BP0036	probable acyltransferase	0,31	0,96	1,00	-1,20	0,55	1,00
BP3176	BP3176	probable GntR-family transcriptional regulator	0,31	1,00	1,00	-3,10	0,27	0,77
BP2433	lepA	GTP-binding protein	0,30	1,00	1,00	0,93	0,62	1,00
BP1818	dadA	D-amino acid dehydrogenase small subunit	0,29	1,00	1,00	-1,47	0,18	0,59
BP2335	argA	amino-acid acetyltransferase	0,29	1,00	1,00	0,63	0,90	1,00

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP3575	BP3575	putative exported protein	0,29	1,00	1,00	0,35	1,00	1,00
BP0160	phoB	phosphate regulon transcriptional regulatory protein	0,28	1,00	1,00	0,59	0,73	1,00
BP1108	lolD	lipoprotein releasing system ATP-binding protein	0,28	0,97	1,00	-1,28	0,09	0,38
BP2688	BP2688	putative integral membrane zinc-metalloprotease	0,28	0,96	1,00	-0,52	0,84	1,00
BP2932	cyoB	ubiquinol oxidase polypeptide I	0,28	0,99	1,00	1,05	0,51	1,00
BP0794	rpsO	30S ribosomal protein S15	0,28	1,00	1,00	-1,21	0,62	1,00
BP0852	nuoL	NADH-ubiquinone oxidoreductase, chain L	0,27	0,98	1,00	-0,09	0,98	1,00
BP2699	glnB	nitrogen regulatory protein	0,27	0,99	1,00	1,48	0,67	1,00
BP1427	bamA	outer membrane protein assembly factor BamA	0,25	1,00	1,00	0,26	1,00	1,00
BP1894	BP1894	conserved hypothetical protein	0,24	0,99	1,00	-2,71	0,25	0,73
BP0048	BP0048	conserved hypothetical protein	0,24	1,00	1,00	1,20	0,90	1,00
BP2197	BP2197	putative membrane protein	0,23	1,00	1,00	0,39	0,98	1,00
BP3303	nnrD	ADP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase	0,23	0,99	1,00	-0,12	1,00	1,00
BP2195	der	GTPase Der	0,23	1,00	1,00	-0,58	1,00	1,00
BP3136	BP3136	putative sulfatase	0,22	1,00	1,00	-1,29	0,56	1,00
BP3732	BP3732	putative exported protein	0,21	1,00	1,00	1,41	0,37	0,92
BP2225	BP2225	putative phospholipase	0,21	1,00	1,00	0,52	0,97	1,00
BP0198	BP0198	putative GntR-family transcriptional regulator	0,21	1,00	1,00	0,24	1,00	1,00
BP3699	BP3699	GntR family transcriptional regulator	0,21	1,00	1,00	0,44	1,00	1,00
BP0529	BP0529	autotransporter	0,21	1,00	1,00	-0,41	1,00	1,00
BP0708	BP0708	putative membrane protein	0,20	0,96	1,00	-1,16	0,25	0,74
BP2173	BP2173	putative ferredoxin	0,20	1,00	1,00	0,07	1,00	1,00
BP3075	BP3075	conserved hypothetical protein	0,20	0,97	1,00	-0,40	0,96	1,00
BP2936	BP2936	putative exported protein	0,20	1,00	1,00	-1,45	0,01	0,11
BP2535	BP2535	putative exported protein	0,20	1,00	1,00	-0,61	0,94	1,00
BP0325	BP0325	putative membrane protein	0,20	1,00	1,00	1,02	0,97	1,00
BP1725	rlmD	23S rRNA (uracil(1939)-C(5))-methyltransferase RlmD	0,19	1,00	1,00	-0,62	0,94	1,00
BP0994	aceF	dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	0,19	1,00	1,00	-0,72	1,00	1,00
BP2386	eno	enolase	0,19	1,00	1,00	-0,71	1,00	1,00
BP3524	BP3524	putative acetyltransferase	0,18	1,00	1,00	-0,09	1,00	1,00
BP3289	atpC	ATP synthase epsilon chain	0,18	1,00	1,00	-0,36	0,93	1,00
BP0747	obg	GTPase Obg	0,18	1,00	1,00	1,52	0,27	0,77

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP2304	BP2304	putative 2-hydroxyacid dehydrogenase	0,18	1,00	1,00	0,65	0,97	1,00
BP1798	BP1798	putative DNA-binding protein	0,17	0,99	1,00	0,25	0,99	1,00
BP1047	BP1047	putative secreted protein	0,17	0,99	1,00	-1,40	0,36	0,90
BP2329	BP2329	putative transferase	0,17	1,00	1,00	0,74	1,00	1,00
BP3253	BP3253	putative conserved exported protein	0,16	1,00	1,00	-0,43	0,87	1,00
BP2360	sdhB	succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	0,16	1,00	1,00	-0,59	0,96	1,00
BP0162	BP0162	putative membrane protein	0,16	1,00	1,00	-0,61	1,00	1,00
BP0991	BP0991	two-component response regulator	0,15	1,00	1,00	-0,65	0,91	1,00
BP0185	dcd	deoxycytidine triphosphate deaminase	0,14	0,97	1,00	-0,47	0,99	1,00
BP2194	hisC1	histidinol-phosphate aminotransferase 1	0,14	0,99	1,00	-0,45	0,96	1,00
BP2012	BP2012	conserved hypothetical protein	0,14	1,00	1,00	0,01	1,00	1,00
BP0008	secE	preprotein translocase SecE subunit	0,14	1,00	1,00	-1,07	0,13	0,49
BP2711	moaC	molybdenum cofactor biosynthesis protein	0,13	1,00	1,00	0,63	0,62	1,00
BP0617	BP0617	TetR-family transcriptional regulator	0,13	1,00	1,00	-0,51	0,96	1,00
BP3308	BP3308	putative acyl-CoA dehydrogenase	0,13	1,00	1,00	-0,31	1,00	1,00
BP3608	rpsL	30S ribosomal protein S12	0,13	1,00	1,00	-0,33	0,99	1,00
BP3778	tatB	Sec-independent protein translocase protein	0,13	1,00	1,00	-0,36	1,00	1,00
BP3631	rplF	50S ribosomal protein L6	0,12	1,00	1,00	-0,82	0,34	0,88
BP1092	BP1092	probable two-component histidine kinase	0,12	1,00	1,00	0,26	1,00	1,00
BP1197	btr	transcriptional regulatory protein	0,12	1,00	1,00	0,04	1,00	1,00
BP2021	acnB	putative aconitate hydratase	0,12	1,00	1,00	-0,63	1,00	1,00
BP0195	gcvT	glycine cleavage system T protein	0,11	1,00	1,00	-1,03	0,08	0,37
BP1440	BP1440	putative membrane protein	0,10	1,00	1,00	-0,12	1,00	1,00
BP2581	BP2581	hypothetical protein	0,10	1,00	1,00	-1,34	0,58	1,00
BP1576	spoT	guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase	0,10	1,00	1,00	0,51	1,00	1,00
BP2198	hisS	histidyl-tRNA synthetase	0,09	1,00	1,00	0,12	1,00	1,00
BP0222	catJ	3-oxoadipate CoA-transferase subunit B	0,09	1,00	1,00	1,48	0,13	0,49
BP0943	ompA	outer membrane protein A precursor	0,09	1,00	1,00	-0,97	0,64	1,00
BP2636	BP2636	putative exported protein	0,09	1,00	1,00	-0,05	1,00	1,00
BP0442	BP0442	metallo-beta-lactamase family protein	0,09	1,00	1,00	-1,14	0,73	1,00
BP3401	BP3401	conserved hypothetical protein	0,08	1,00	1,00	0,62	0,90	1,00
BP2715	BP2715	AhpC/TSA-family protein	0,08	1,00	1,00	0,13	1,00	1,00
BP2332	dnaE	DNA polymerase III alpha subunit	0,08	1,00	1,00	-0,40	1,00	1,00

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP2471	BP2471	conserved hypothetical protein	0,08	1,00	1,00	-1,26	0,78	1,00
BP0190	BP0190	probable orn/arg/lys decarboxylase	0,07	1,00	1,00	-0,93	0,99	1,00
BP3073	BP3073	putative acyltransferase	0,07	1,00	1,00	-0,32	0,97	1,00
BP1907	BP1907	putative exported protein	0,07	1,00	1,00	-1,13	0,64	1,00
BP3832	ftsE	cell division ATP-binding protein	0,07	1,00	1,00	-0,27	0,99	1,00
BP2333	BP2333	putative dioxygenase	0,07	1,00	1,00	0,17	1,00	1,00
BP0572	BP0572	putative two-component response regulator	0,07	1,00	1,00	-1,11	0,34	0,88
BP2282	htpX	protease HtpX homolog	0,06	1,00	1,00	-1,00	0,72	1,00
BP2796	rpsF	30s ribosomal protein s6	0,06	1,00	1,00	-0,52	0,94	1,00
BP0982	BP0982	putative RNA pseudouridylate synthase	0,06	1,00	1,00	0,37	0,99	1,00
BP2199	ispG	1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate synthase	0,05	1,00	1,00	-1,35	0,25	0,73
BP3824	BP3824	putative membrane protein	0,05	1,00	1,00	1,08	0,42	0,97
BP2791	dnaB	DNA helicase	0,05	1,00	1,00	0,41	0,99	1,00
BP0182	BP0182	putative iron sulfur binding protein	0,04	1,00	1,00	0,56	0,96	1,00
BP0490	dnaN	DNA polymerase iii, beta chain	0,04	1,00	1,00	-1,07	0,66	1,00
BP1219	BP1219	putative phytoene synthase	0,04	1,00	1,00	-1,25	0,87	1,00
BP2643	glpR	glycerol-3-phosphate regulon repressor protein	0,03	1,00	1,00	2,09	0,07	0,34
BP3439	dnt	dermonecrotic toxin	0,03	1,00	1,00	-0,25	1,00	1,00
BP3649	engB	probable GTP-binding protein EngB	0,03	1,00	1,00	-0,15	1,00	1,00
BP3830	BP3830	putative amino acid ABC transporter permease protein	0,03	1,00	1,00	-0,38	0,97	1,00
BP0853	nuoM	NADH-ubiquinone oxidoreductase, chain M	0,02	1,00	1,00	-0,85	0,84	1,00
BP3288	atpD	ATP synthase beta chain	0,02	1,00	1,00	-0,85	0,39	0,93
BP3287	atpG	ATP synthase gamma chain	0,02	1,00	1,00	-0,70	0,87	1,00
BP1045	secF	protein-export membrane protein	0,02	1,00	1,00	-0,80	0,12	0,46
BP3795	ptlG	type IV secretion system protein PtlG	0,02	1,00	1,00	-0,12	1,00	1,00
BP0844	nuoD	respiratory-chain NADH dehydrogenase, 49 kDa subunit	0,01	1,00	1,00	-0,77	0,87	1,00
BP3022	murC	UDP-N-acetylmuramate--alanine ligase	0,01	1,00	1,00	-0,17	1,00	1,00
BP1462	aroC	chorismate synthase	0,01	1,00	1,00	0,59	1,00	1,00
BP0795	pnp	polyribonucleotide nucleotidyltransferase	0,00	1,00	1,00	-0,75	0,99	1,00
BP1250	typA	GTP-binding elongation factor	0,00	1,00	1,00	-0,95	0,17	0,58
BP1878	bvgA	virulence factors transcription regulator	0,00	1,00	1,00	-0,93	0,79	1,00
BP3432	cysI	putative sulfite reductase	0,00	1,00	1,00	0,42	1,00	1,00
BP0206	thiC	thiamine biosynthesis protein	-0,01	1,00	1,00	-0,82	1,00	1,00

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP2043	lptE	LPS-assembly lipoprotein LptE	-0,01	1,00	1,00	-0,78	0,89	1,00
BP1566	mutS	mismatch repair protein	-0,01	1,00	1,00	0,41	1,00	1,00
BP2283	qor	quinone oxidoreductase	-0,01	1,00	1,00	-0,17	1,00	1,00
BP0659	BP0659	probable zinc-binding dehydrogenase	-0,01	1,00	1,00	-0,04	1,00	1,00
BP0248	fumC	fumarate hydratase class II	-0,01	1,00	1,00	-0,61	0,94	1,00
BP3655	BP3655	penicillin-binding protein 1A	-0,01	1,00	1,00	-1,56	0,24	0,71
BP0086	bplH	putative glycosyl transferase	-0,02	1,00	1,00	0,25	1,00	1,00
BP3395	BP3395	putative ATP-dependent RNA helicase	-0,02	1,00	1,00	-0,62	0,99	1,00
BP3473	ftsY	cell division protein	-0,02	1,00	1,00	-0,51	0,98	1,00
BP1144	tex	transcription accessory protein	-0,02	1,00	1,00	-0,89	0,71	1,00
BP3710	BP3710	TetR-family transcriptional regulator	-0,02	1,00	1,00	1,07	0,02	0,14
BP0368	gdhA	NADP-specific glutamate dehydrogenase	-0,02	1,00	1,00	-0,81	0,68	1,00
BP0174	bfr	bacterioferritin	-0,02	1,00	1,00	-2,92	0,01	0,11
BP3060	BP3060	putative transglycosylase	-0,03	1,00	1,00	-0,55	1,00	1,00
BP0001	mmmG	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme MmmG	-0,03	1,00	1,00	-1,08	0,27	0,77
BP2325	BP2325	putative transferase	-0,03	1,00	1,00	-0,71	0,28	0,78
BP0792	pssA	putative CDP-diacylglycerol--serine O-phosphatidyltransferase protein	-0,03	1,00	1,00	-1,62	0,03	0,19
BP0094	rfaC	probable heptosyltransferase	-0,03	1,00	1,00	0,11	1,00	1,00
BP3092	BP3092	putative phospholipase D protein	-0,03	1,00	1,00	-0,67	0,84	1,00
BP1728	BP1728	putative glutaredoxin	-0,03	1,00	1,00	0,82	0,98	1,00
BP0208	BP0208	putative oxidoreductase	-0,03	1,00	1,00	-0,92	0,89	1,00
BP1537	gcdH	glutaryl-CoA dehydrogenase	-0,03	1,00	1,00	-0,81	0,91	1,00
BP3775	hisE	phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase	-0,03	0,98	1,00	0,47	0,83	1,00
BP3555	BP3555	putative acetyltransferase	-0,04	1,00	1,00	-0,64	0,97	1,00
BP1794	lexA	LexA repressor	-0,04	1,00	1,00	-1,11	0,74	1,00
BP3630	rpsH	30S ribosomal protein S8	-0,04	1,00	1,00	0,56	0,99	1,00
BP3127	lolB	outer-membrane lipoprotein LolB	-0,04	1,00	1,00	-1,34	0,22	0,69
BP0847	nuoG	NADH-ubiquinone oxidoreductase, 75 kDa subunit	-0,05	1,00	1,00	-0,49	1,00	1,00
BP0377	mrda	penicillin-binding protein 2	-0,05	1,00	1,00	-0,81	1,00	1,00
BP3626	rplN	50S ribosomal protein L14	-0,05	1,00	1,00	-0,29	1,00	1,00
BP1443	BP1443	conserved hypothetical protein	-0,05	0,87	1,00	-0,54	0,75	1,00
BP3405	ompQ	outer membrane porin protein OmpQ	-0,05	1,00	1,00	-1,25	0,11	0,44
BP1152	BP1152	putative exported protein	-0,05	1,00	1,00	-2,55	0,56	1,00
BP1246	nusA	N utilization substance protein A	-0,05	1,00	1,00	-0,17	1,00	1,00

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP1702	BP1702	probable enoyl-CoA hydratase/isomerase	-0,05	1,00	1,00	-1,33	0,63	1,00
BP0545	rimO	ribosomal protein S12 methylthiotransferase RimO	-0,05	1,00	1,00	-0,03	1,00	1,00
BP0441	BP0441	MerR-family transcriptional regulator	-0,05	1,00	1,00	-3,14	0,28	0,78
BP1467	BP1467	putative iron sulfur binding protein	-0,06	1,00	1,00	-1,77	0,11	0,44
BP3609	rpsG	30S ribosomal protein S7	-0,06	1,00	1,00	-0,71	0,86	1,00
BP0016	rpoC	DNA-directed RNA polymerase beta' chain	-0,07	1,00	1,00	-0,79	0,99	1,00
BP3594	metH	5-methyltetrahydrofolate--homocysteine methyltransferase	-0,07	1,00	1,00	0,08	1,00	1,00
BP3597	thiG	thiazole biosynthesis protein	-0,07	1,00	1,00	-0,93	0,96	1,00
BP1711, BP2221	BP1711	transposase	-0,07	1,00	1,00	-0,55	0,95	1,00
BP1884	fhaC	hemolysin activator-like protein	-0,08	1,00	1,00	-0,95	1,00	1,00
BP3648	hemB	putative delta-aminolevulinic acid dehydratase	-0,09	1,00	1,00	-1,74	0,72	1,00
BP3641	rpsD	30S ribosomal protein S4	-0,09	1,00	1,00	-0,88	0,02	0,16
BP1068	pstB	phosphate transport ATP-binding protein	-0,09	1,00	1,00	-0,83	0,95	1,00
BP2387	BP2387	conserved hypothetical protein	-0,09	1,00	1,00	-0,08	1,00	1,00
BP0398	BP0398	putative membrane protein	-0,09	1,00	1,00	-0,47	0,94	1,00
BP3467	BP3467	putative exported protein	-0,09	1,00	1,00	-0,33	1,00	1,00
BP2403	BP2403	putative electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	-0,09	1,00	1,00	-0,85	0,35	0,89
BP0141	BP0141	probable iron-sulfur binding oxidase	-0,10	1,00	1,00	0,01	1,00	1,00
BP0007, BP3611	tuf1	elongation factor Tu	-0,10	1,00	1,00	-0,73	1,00	1,00
BP0606	BP0606	conserved hypothetical protein	-0,10	1,00	1,00	-0,76	0,08	0,35
BP3657	aroB	3-dehydroquinate synthase	-0,10	1,00	1,00	-1,07	0,28	0,77
BP2726	BP2726	putative oxidoreductase	-0,10	1,00	1,00	-1,06	0,20	0,63
BP0941	BP0941	putative phosphoglycolate phosphatase	-0,10	1,00	1,00	-0,57	0,77	1,00
BP1499	gshB	glutathione synthetase	-0,10	1,00	1,00	-1,24	0,19	0,63
BP3751	adhI	alcohol dehydrogenase class III	-0,10	1,00	1,00	-1,22	0,97	1,00
BP1419	rpsB	30S ribosomal protein S2	-0,10	1,00	1,00	-1,12	0,57	1,00
BP0122	BP0122	sugar ABC transporter, ATP-binding protein	-0,10	1,00	1,00	1,58	0,01	0,08
BP1722	BP1722	conserved hypothetical protein	-0,10	1,00	1,00	0,07	1,00	1,00
BP3833	BP3833	putative permease protein	-0,11	1,00	1,00	0,21	0,99	1,00
BP1062	BP1062	probable aminotransferase	-0,11	1,00	1,00	-0,14	1,00	1,00
BP3321	BP3321	putative amidase	-0,11	1,00	1,00	-0,23	1,00	1,00

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP1426	BP1426	putative membrane protein	-0,12	1,00	1,00	-1,34	0,31	0,84
BP0180	metG	methionyl-tRNA synthetase	-0,12	1,00	1,00	-0,05	1,00	1,00
BP2561	rdgC	recombination-associated protein RdgC	-0,12	1,00	1,00	-1,07	0,95	1,00
BP2675	paaK	phenylacetate-coenzyme A ligase	-0,12	1,00	1,00	0,47	0,97	1,00
BP3619	rpsC	30S ribosomal protein S3	-0,13	1,00	1,00	-0,86	0,89	1,00
BP0495	yidC	membrane protein insertase YidC	-0,14	1,00	1,00	-0,40	1,00	1,00
BP0857	bfrE	probable TonB-dependent receptor for iron transport	-0,13	1,00	1,00	0,05	1,00	1,00
BP1732	ppiD	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	-0,14	1,00	1,00	-1,05	0,48	1,00
BP0947	tyrA	prephenate dehydrogenase	-0,14	1,00	1,00	-1,04	0,49	1,00
BP2041	proA	putative gamma-glutamyl phosphate reductase	-0,14	1,00	1,00	-0,98	0,21	0,66
BP2983	nrdA	ribonucleoside-diphosphate reductase alpha chain	-0,15	1,00	1,00	-1,20	0,20	0,64
BP0278	mscL	large-conductance mechanosensitive channel	-0,15	0,99	1,00	-0,20	0,99	1,00
BP3442	pyrD	dihydroorotate dehydrogenase	-0,16	1,00	1,00	-0,46	0,76	1,00
BP2959	BP2959	putative integral membrane protein	-0,16	1,00	1,00	-0,19	1,00	1,00
BP2549	BP2549	putative sugar transport protein	-0,16	1,00	1,00	-0,33	1,00	1,00
BP1284	ugpC	sn-glycerol-3-phosphate transport ATP-binding protein	-0,16	1,00	1,00	-0,93	0,78	1,00
BP1163	BP1163	probable short-chain dehydrogenase	-0,16	1,00	1,00	-1,25	0,57	1,00
BP2437	sigE	RNA polymerase sigma factor	-0,17	1,00	1,00	1,03	0,44	1,00
BP2075	BP2075	putative efflux system inner membrane protein	-0,17	1,00	1,00	-2,21	0,01	0,01
BP0949	cmk	cytidylate kinase	-0,17	1,00	1,00	-0,12	1,00	1,00
BP2014	acnA	putative aconitate hydratase	-0,17	1,00	1,00	-1,43	0,01	0,11
BP0789	ilvI	acetolactate synthase large subunit	-0,17	1,00	1,00	-0,49	1,00	1,00
BP3341	BP3341	putative periplasmic protein	-0,17	1,00	1,00	0,37	0,99	1,00
BP0666	glmS	glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing]	-0,17	1,00	1,00	-0,64	1,00	1,00
BP0475	rne	ribonuclease E	-0,18	1,00	1,00	-0,64	0,99	1,00
BP0374	mreB	rod shape-determining protein	-0,18	1,00	1,00	-1,42	0,02	0,12
BP3530	hupB	DNA-binding protein Hu-beta	-0,18	0,97	1,00	-1,31	0,01	0,02
BP1984	BP1984	putative oligopeptide transport system permease protein	-0,19	0,99	1,00	-0,68	0,60	1,00
BP0386	BP0386	putative thioredoxin	-0,19	0,99	1,00	0,22	1,00	1,00
BP3589	trpB	tryptophan synthase beta chain	-0,19	1,00	1,00	-0,83	0,90	1,00
BP3870	BP3870	probable aminotransferase	-0,19	0,97	1,00	-0,29	1,00	1,00
BP2341	BP2341	conserved hypothetical lipoprotein	-0,20	1,00	1,00	-0,29	0,99	1,00
BP2317	BP2317	putative ribonuclease	-0,20	1,00	1,00	0,02	1,00	1,00

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP3785	ptxD	pertussis toxin subunit 4 precursor	-0,20	1,00	1,00	-0,83	0,80	1,00
BP0252	ggt	gamma-glutamyltranspeptidase	-0,20	1,00	1,00	-0,93	0,72	1,00
BP3068	ahcY	adenosylhomocysteinase	-0,20	1,00	1,00	-1,17	0,64	1,00
BP2934	BP2934	putative two component system response regulator	-0,20	0,97	1,00	-1,75	0,02	0,14
BP2546	recA	RecA protein	-0,21	1,00	1,00	-1,53	0,07	0,32
BP1569	BP1569	putative lipoprotein	-0,21	1,00	1,00	-1,31	0,27	0,77
BP0289	ilvD1	hihydroxy-acid dehydratase 1	-0,21	1,00	1,00	-0,92	0,77	1,00
BP3047	BP3047	conserved hypothetical protein	-0,21	1,00	1,00	0,32	1,00	1,00
BP1000	gap	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-0,21	1,00	1,00	-2,11	0,01	0,11
BP0964	BP0964	probable acyl-CoA dehydrogenase	-0,22	1,00	1,00	0,25	1,00	1,00
BP1257	BP1257	putative membrane protein	-0,22	0,99	1,00	0,84	0,84	1,00
BP3116	BP3116	putative modification methylase	-0,22	1,00	1,00	-0,47	1,00	1,00
BP3653	lysA	diaminopimelate decarboxylase	-0,23	1,00	1,00	-0,85	0,65	1,00
BP1836	alaS	alanyl-tRNA synthetase	-0,23	1,00	1,00	-0,84	1,00	1,00
BP3628	rplE	50S ribosomal protein L5	-0,23	1,00	1,00	-1,26	0,58	1,00
BP1481	leuC	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	-0,24	1,00	1,00	-0,43	0,99	1,00
BP0240	BP0240	conserved hypothetical protein	-0,24	1,00	1,00	0,38	0,98	1,00
BP3418	ruvA	holliday junction DNA helicase	-0,24	0,91	1,00	-0,61	0,88	1,00
BP2010	efp	putative elongation factor P	-0,24	0,99	1,00	-0,46	0,95	1,00
BP2395	BP2395	putative binding-protein-dependent transport permease	-0,24	0,99	1,00	-0,83	0,43	0,99
BP0975	rplS	50S ribosomal protein L19	-0,24	0,97	1,00	-0,99	0,28	0,78
BP1072	ppk	polyphosphate kinase	-0,24	1,00	1,00	0,43	1,00	1,00
BP3090	BP3090	conserved hypothetical protein	-0,24	0,99	1,00	-0,51	0,88	1,00
BP0035	BP0035	putative haloacid dehalogenase-like hydrolase	-0,25	0,95	1,00	-0,03	1,00	1,00
BP1218	BP1218	putative exported protein	-0,25	1,00	1,00	-0,98	0,31	0,83
BP3796	ptlH	type IV secretion system protein PtlH	-0,25	1,00	1,00	0,60	0,99	1,00
BP0888	BP0888	GntR-family transcriptional regulator	-0,25	0,93	1,00	-1,90	0,04	0,25
BP1746	BP1746	putative peptidoglycan-binding protein	-0,25	1,00	1,00	0,15	1,00	1,00
BP2504	hrcA	heat-inducible transcription repressor HrcA	-0,25	0,99	1,00	-1,11	0,78	1,00
BP2571	BP2571	putative transcriptional regulatory protein	-0,25	0,98	1,00	-1,11	0,23	0,70
BP0598	BP0598	conserved hypothetical protein	-0,26	0,98	1,00	-0,37	1,00	1,00
BP3048	BP3048	hypothetical protein	-0,26	1,00	1,00	-1,75	0,42	0,97
BP2432	lep	signal peptidase I	-0,26	1,00	1,00	-0,07	1,00	1,00
BP2203	valS	valyl-tRNA synthetase	-0,27	1,00	1,00	-0,37	1,00	1,00
BP0207	BP0207	putative aldehyde dehydrogenase	-0,27	1,00	1,00	0,66	1,00	1,00

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP3744	BP3744	putative bifunctional protein	-0,27	0,98	1,00	-0,81	0,93	1,00
BP2973	dbpA	probable ATP-dependent RNA helicase	-0,27	0,99	1,00	-0,03	1,00	1,00
BP0484	lldD	L-lactate dehydrogenase	-0,27	1,00	1,00	-0,56	0,95	1,00
BP3087	hslU	ATP-dependent Hsl protease ATP-binding subunit	-0,27	1,00	1,00	-0,56	1,00	1,00
BP2909	BP2909	conserved hypothetical protein	-0,27	1,00	1,00	-0,38	0,97	1,00
BP1005	BP1005	conserved hypothetical protein	-0,28	1,00	1,00	-0,03	1,00	1,00
BP3014	secA	preprotein translocase secA subunit	-0,28	1,00	1,00	-0,74	0,96	1,00
BP1596	glnA	glutamine synthetase	-0,28	1,00	1,00	-0,22	1,00	1,00
BP0693	hprK	HPr kinase/phosphorylase	-0,28	1,00	1,00	1,40	0,04	0,24
BP1146	comL	competence lipoprotein precursor	-0,29	1,00	1,00	-0,53	0,99	1,00
BP0375	mreC	rod shape-determining protein	-0,29	1,00	1,00	-1,68	0,15	0,54
BP2396	BP2396	putative binding-protein-dependent transport periplasmic protein	-0,29	1,00	1,00	-0,37	1,00	1,00
BP1761	BP1761	probable ABC transporter ATP-binding protein	-0,30	1,00	1,00	0,32	1,00	1,00
BP2234	brpL	putative RNA polymerase sigma factor	-0,30	0,95	1,00	-0,75	0,65	1,00
BP3642	rpoA	DNA-directed RNA polymerase alpha chain	-0,30	1,00	1,00	-1,26	0,07	0,34
BP0460	topB	DNA topoisomerase iii	-0,31	1,00	1,00	-1,07	0,99	1,00
BP2308	BP2308	conserved hypothetical protein	-0,31	1,00	1,00	0,29	0,99	1,00
BP0954	rfaE	ADP-heptose synthase	-0,31	1,00	1,00	0,06	1,00	1,00
BP2420	BP2420	putative integral membrane protein	-0,31	0,94	1,00	-0,13	1,00	1,00
BP3238	BP3238	putative glycosyl transferase	-0,31	0,99	1,00	-1,37	0,14	0,50
BP3331	rsmA	ribosomal RNA small subunit methyltransferase A	-0,31	1,00	1,00	-0,31	1,00	1,00
BP0082	bpIL	lipopolysaccharide biosynthesis protein	-0,31	1,00	1,00	-0,88	0,81	1,00
BP0217	BP0217	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	-0,32	1,00	1,00	0,01	1,00	1,00
BP3689	BP3689	putative membrane protein	-0,32	0,99	1,00	-1,78	0,07	0,32
BP0953	lapB	lipopolysaccharide assembly protein B	-0,32	0,99	1,00	-0,35	1,00	1,00
BP0131	leuA	2-isopropylmalate synthase	-0,33	1,00	1,00	-0,73	0,97	1,00
BP3526	rnr	putative ribonuclease R	-0,33	1,00	1,00	-1,02	0,97	1,00
BP1983	BP1983	putative extracellular solute-binding protein	-0,33	1,00	1,00	0,40	1,00	1,00
BP0372	gatA	glutamyl-tRNA(GLN) amidotransferase subunit A	-0,34	1,00	1,00	-1,12	0,71	1,00
BP1085	BP1085	conserved hypothetical protein	-0,34	0,91	1,00	-1,74	0,01	0,09

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP0784	ilvB	putative acetolactate synthase large subunit	-0,34	1,00	1,00	1,09	0,97	1,00
BP2076	BP2076	putative efflux system transmembrane protein	-0,34	1,00	1,00	-0,93	0,43	0,99
BP0697	BP0697	ABC transporter	-0,34	0,99	1,00	-0,80	0,45	1,00
BP0379	ldh	putative L-lactate dehydrogenase	-0,35	0,99	1,00	-1,16	0,01	0,09
BP0779	BP0779	conserved hypothetical protein	-0,35	0,96	1,00	-1,68	0,68	1,00
BP2389	pyrG	CTP synthase	-0,35	1,00	1,00	-0,62	0,97	1,00
BP0609	ctpA	putative carboxy-terminal processing protease precursor	-0,35	1,00	1,00	-1,19	0,96	1,00
BP3640	rpsK	30S ribosomal protein S11	-0,35	0,86	1,00	-1,89	0,01	0,01
BP1076	folP	dihydropteroate synthase	-0,35	1,00	1,00	0,15	1,00	1,00
BP1470	BP1470	putative iron-sulfur binding protein	-0,35	0,98	1,00	0,79	0,94	1,00
BP1506	BP1506	putative exported protein	-0,36	1,00	1,00	-0,39	1,00	1,00
BP3643	rplQ	50S ribosomal protein L17	-0,36	0,97	1,00	-1,75	0,08	0,35
BP2431	rnc	ribonuclease III	-0,36	0,93	1,00	-1,38	0,09	0,39
BP3146	BP3146	putative asparagine synthase	-0,36	1,00	1,00	-0,52	1,00	1,00
BP2473	ftsK	putative cell division protein	-0,36	1,00	1,00	-0,63	0,94	1,00
BP1563	BP1563	putative chromate reductase	-0,36	0,82	1,00	0,74	0,44	1,00
BP3333	pykA	pyruvate kinase	-0,37	1,00	1,00	-0,74	0,94	1,00
BP2992	pcp	putative lipoprotein	-0,37	0,96	1,00	-1,19	0,02	0,14
BP3793	ptlE	type IV secretion system protein PtlE	-0,37	0,92	1,00	0,20	0,98	1,00
BP1759	uvrD	DNA helicase II	-0,37	1,00	1,00	-1,01	0,34	0,88
BP0005	parB	probable chromosome partitioning protein ParB	-0,37	0,98	1,00	-0,63	0,90	1,00
BP2933	cyoA	putative ubiquinol oxidase polypeptide II	-0,37	0,90	1,00	-0,74	0,22	0,69
BP1423	uppS	undecaprenyl pyrophosphate synthetase	-0,38	0,96	1,00	0,41	0,74	1,00
BP3821	panC	pantoate--beta-alanine ligase	-0,38	0,96	1,00	-0,66	0,99	1,00
BP2661	BP2661	putative exported protein	-0,38	0,89	1,00	0,11	1,00	1,00
BP3328	BP3328	conserved hypothetical protein	-0,39	0,93	1,00	-0,62	1,00	1,00
BP1432	lpxB	lipid-A-disaccharide synthase	-0,39	0,90	1,00	-2,59	0,05	0,25
BP3063	BP3063	putative aminohydrolase	-0,39	1,00	1,00	0,18	1,00	1,00
BP3552	ahpC	alkyl hydroperoxide reductase	-0,39	1,00	1,00	-0,99	0,70	1,00
BP0790	ilvH	acetolactate synthase small subunit	-0,39	0,98	1,00	-0,03	1,00	1,00
BP2361	sdhA	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	-0,39	1,00	1,00	-0,44	1,00	1,00
BP3757	BP3757	putative ABC transporter, ATP-binding protein	-0,39	0,97	1,00	-0,58	0,67	1,00
BP3816	zapD	cell division protein ZapD	-0,40	1,00	1,00	-0,68	0,95	1,00
BP0161	ubiE	ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase	-0,40	0,96	1,00	-1,81	0,00	0,05

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP0106	lipA	lipoic acid synthetase	-0,40	0,92	1,00	-1,54	0,79	1,00
BP3560	ligA	DNA ligase	-0,40	1,00	1,00	-0,37	1,00	1,00
BP1763	dapE	succinyl-diaminopimelate desuccinylase	-0,40	0,42	1,00	-1,33	0,01	0,01
BP3276	BP3276	conserved hypothetical protein	-0,41	1,00	1,00	-0,32	1,00	1,00
BP2235	bscC	putative type III secretion protein	-0,42	0,81	1,00	-0,74	0,89	1,00
BP3583	pncB	putative nicotinate phosphoribosyltransferase	-0,42	1,00	1,00	1,67	0,03	0,18
BP0942	ubiG	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	-0,42	0,80	1,00	-0,62	0,72	1,00
BP2702	argH	argininosuccinate lyase	-0,42	0,99	1,00	-0,23	1,00	1,00
BP2862	BP2862	conserved hypothetical protein	-0,42	1,00	1,00	1,40	0,03	0,19
BP2743	BP2743	putative ABC transport protein, ATP-binding component	-0,42	0,95	1,00	-1,82	0,01	0,01
BP1753	ileS	isoleucyl-tRNA synthetase	-0,42	1,00	1,00	-0,71	0,96	1,00
BP3240	uvrA2	putative excinuclease ABC subunit	-0,42	1,00	1,00	-0,50	1,00	1,00
BP1050	queA	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase	-0,42	0,99	1,00	0,38	1,00	1,00
BP1004	BP1004	phosphate acetyl/butaryl transferase	-0,42	0,99	1,00	-0,73	0,95	1,00
BP1972	srpH	serine acetyltransferase	-0,44	0,83	1,00	-1,33	0,62	1,00
BP2534	BP2534	putative exported protein	-0,44	1,00	1,00	-1,01	0,94	1,00
BP2397	BP2397	putative ABC transporter ATP-binding subunit	-0,44	1,00	1,00	-0,36	1,00	1,00
BP0752	BP0752	LysR-family transcriptional regulator	-0,44	0,69	1,00	1,28	0,08	0,35
BP2253	bopD	putative outer protein D	-0,44	0,99	1,00	0,25	1,00	1,00
BP3226	glnS	putative glutamyl-tRNA synthetase	-0,44	1,00	1,00	-0,73	1,00	1,00
BP2141	BP2141	putative exported protein	-0,44	0,87	1,00	-2,52	0,25	0,73
BP0502	BP0502	integrase	-0,44	0,97	1,00	-1,02	0,80	1,00
BP3621	rpmC	50S ribosomal protein L29	-0,45	0,90	1,00	-2,06	0,44	1,00
BP3471	coaD	phosphopantetheine adenylyltransferase	-0,45	0,98	1,00	-0,64	0,60	1,00
BP1415	purF	amidophosphoribosyltransferase	-0,45	1,00	1,00	-0,90	0,38	0,92
BP0383	argB	acetylglutamate kinase	-0,45	0,92	1,00	-0,12	1,00	1,00
BP3452	BP3452	GntR family transcriptional regulator	-0,45	0,98	1,00	0,41	1,00	1,00
BP2057	BP2057	putative ABC-transporter ATP-binding protein	-0,45	0,93	1,00	-1,43	0,14	0,51
BP3767	hisG	putative ATP phosphoribosyltransferase	-0,45	0,80	1,00	-1,65	0,30	0,82
BP3326	BP3326	putative inner membrane protein	-0,45	0,77	1,00	-1,18	0,06	0,31
BP0015	rpoB	DNA-directed RNA polymerase beta chain	-0,46	1,00	1,00	-1,13	0,01	0,04
BP2952	glyA	serine hydroxymethyltransferase	-0,46	1,00	1,00	-1,29	0,13	0,48

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP1882	fimC	outer membrane usher protein precursor	-0,46	1,00	1,00	-0,62	1,00	1,00
BP3143	BP3143	putative glycosyltransferase	-0,46	0,91	1,00	0,01	1,00	1,00
BP1264	parE	topoisomerase IV subunit B	-0,46	1,00	1,00	-0,85	0,99	1,00
BP2193	hfq	putative RNA-binding regulatory protein	-0,46	0,75	1,00	-1,48	0,03	0,19
BP1777	lon	ATP-dependent protease La	-0,47	1,00	1,00	-0,98	0,82	1,00
BP2338	BP2338	putative transport protein	-0,47	1,00	1,00	-1,65	0,38	0,92
BP1126	odhL	2-oxoglutarate dehydrogenase complex, E3 component	-0,47	1,00	1,00	-1,20	0,36	0,90
BP2323	BP2323	conserved hypothetical membrane protein	-0,47	0,65	1,00	-0,17	1,00	1,00
BP0559	BP0559	probable aminotransferase	-0,47	0,81	1,00	-0,86	0,77	1,00
BP2185	dnaG	DNA primase	-0,48	0,86	1,00	-0,16	1,00	1,00
BP3251	pdxH	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	-0,48	0,95	1,00	-1,04	0,17	0,57
BP3494	brkA	serum resistance protein	-0,48	1,00	1,00	-0,81	0,93	1,00
BP0856	bfrD	probable TonB-dependent receptor for iron transport	-0,48	1,00	1,00	-1,36	0,01	0,10
BP3559	BP3559	putative membrane protein	-0,48	0,71	1,00	-1,64	0,01	0,07
BP0132	BP0132	putative membrane protein	-0,48	0,74	1,00	-1,55	0,58	1,00
BP1262	rho	transcription termination factor Rho	-0,48	1,00	1,00	-1,33	0,01	0,06
BP0680	BP0680	conserved hypothetical protein	-0,48	0,72	1,00	-1,47	0,22	0,69
BP1883	fhaE	protein FhaE	-0,48	0,96	1,00	0,64	0,90	1,00
BP2508	omlA	outer membrane lipoprotein	-0,48	0,78	1,00	-1,40	0,04	0,24
BP2498	dnaJ	molecular chaperone	-0,49	0,92	1,00	-0,30	1,00	1,00
BP0608	BP0608	putative peptidase	-0,49	0,96	1,00	0,00	1,00	1,00
BP0489	gyrB	DNA gyrase subunit B	-0,49	1,00	1,00	-1,45	0,01	0,06
BP3030	rsmH	ribosomal RNA small subunit methyltransferase H	-0,49	0,72	1,00	-0,81	0,75	1,00
BP3344	BP3344	proline-rich inner membrane protein	-0,49	0,96	1,00	-1,17	0,56	1,00
BP3017	lpxC	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] N-acetylglucosamine deacetylase	-0,49	0,98	1,00	-0,63	1,00	1,00
BP1040	BP1040	PhoH-like protein	-0,49	0,95	1,00	-0,66	0,99	1,00
BP3777	tatA	Sec-independent protein translocase protein TatA	-0,49	0,76	1,00	-0,88	0,40	0,94
BP2416	BP2416	putative LysR-family transcriptional regulator	-0,50	0,76	1,00	-1,06	0,22	0,68
BP1898	BP1898	putative membrane protein	-0,50	0,79	1,00	-0,30	0,99	1,00
BP2191	hflK	putative membrane protein	-0,50	0,99	1,00	-1,04	0,10	0,42
BP1879	fhaB	filamentous hemagglutinin/adhesin	-0,51	1,00	1,00	-1,09	0,97	1,00
BP2326	BP2326	putative polysaccharide deacetylase	-0,51	0,83	1,00	-0,52	0,81	1,00
BP2309	purD	phosphoribosylamine--glycine ligase	-0,51	0,99	1,00	-0,45	1,00	1,00
BP2331	BP2331	putative transferase	-0,51	0,54	1,00	-0,01	1,00	1,00

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP0629	pdhA	putative pyruvate dehydrogenase E1 component, alpha subunit	-0,51	0,98	1,00	-0,51	0,82	1,00
BP3002	BP3002	conserved hypothetical protein	-0,52	0,95	1,00	-1,00	0,97	1,00
BP2798	dxs	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase	-0,52	0,50	1,00	-0,57	0,93	1,00
BP0013	rplJ	50S ribosomal protein L10	-0,52	0,90	1,00	-1,66	0,02	0,01
BP3128	BP3128	conserved hypothetical protein	-0,52	0,70	1,00	-1,30	0,12	0,46
BP3783	ptxA	pertussis toxin subunit 1 precursor	-0,52	0,97	1,00	-1,19	0,50	1,00
BP2190	hflC	putative inner membrane-anchored protein	-0,52	0,99	1,00	-0,94	0,19	0,61
BP2421	pepA	cytosol aminopeptidase	-0,53	0,99	1,00	-0,79	0,97	1,00
BP2358	gltA	citrate synthase	-0,53	0,76	1,00	-1,17	0,07	0,34
BP3615	rplW	50S ribosomal protein L23	-0,53	0,71	1,00	-1,32	0,05	0,27
BP0098	birA	putative biotin protein ligase	-0,53	0,95	1,00	-0,43	1,00	1,00
BP2874	ribE	riboflavin synthase alpha chain	-0,53	0,71	1,00	-1,66	0,25	0,73
BP3606	BP3606	putative potassium channel protein	-0,54	0,99	1,00	-1,17	0,68	1,00
BP1120	maeB2	NADP-dependent malic enzyme	-0,54	1,00	1,00	-1,64	0,01	0,08
BP1452	carA	carbamoyl-phosphate synthase small chain	-0,54	0,63	1,00	-0,30	0,99	1,00
BP1010	BP1010	putative acetyltransferase	-0,54	0,88	1,00	-1,49	0,63	1,00
BP2891	BP2891	conserved hypothetical protein	-0,54	1,00	1,00	-0,40	0,89	1,00
BP3527	rlmB	23S rRNA (guanosine-2'-O-)-methyltransferase RlmB	-0,55	0,70	1,00	1,09	0,88	1,00
BP3822	BP3822	conserved hypothetical protein	-0,55	0,94	1,00	-0,58	0,75	1,00
BP0951	ihfB	integration host factor beta-subunit	-0,55	0,75	1,00	-0,03	1,00	1,00
BP3036	BP3036	putative hydrolase	-0,55	0,44	1,00	-0,65	0,29	0,79
BP2573	pheT	phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	-0,55	0,97	1,00	-1,92	0,01	0,02
BP2315	vag8	autotransporter	-0,56	0,91	1,00	-1,02	0,60	1,00
BP3790	ptlC	type IV secretion system protein PtlC	-0,56	0,75	1,00	-1,99	0,12	0,47
BP1751	dfp	DNA/pantothenate metabolism flavoprotein	-0,56	0,88	1,00	0,04	1,00	1,00
BP3269	BP3269	putative monooxygenase	-0,56	0,98	1,00	-0,43	1,00	1,00
BP2334	BP2334	putative ATP-dependent helicase	-0,56	0,63	1,00	-0,44	1,00	1,00
BP1630, BP3149	wbpP	capsular polysaccharide biosynthesis protein	-0,56	0,89	1,00	-1,44	0,71	1,00
BP2434	mucD	serine protease	-0,56	1,00	1,00	-1,09	0,46	1,00
BP3066	BP3066	putative methylenetetrahydrofolate reductase	-0,56	0,76	1,00	-1,29	0,40	0,94
BP2509	dapB	dihydrodipicolinate reductase	-0,57	0,86	1,00	-1,59	0,32	0,85
BP2307	BP2307	conserved ATP-binding protein	-0,57	0,99	1,00	-0,83	1,00	1,00
BP2810	BP2810	putative hydrolase	-0,57	0,93	1,00	-0,74	0,95	1,00

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP3000	mpl	UDP-N-acetylmuramate:L-alanyl-gamma-D-glutamyl- meso-diaminopimelate ligase	-0,57	0,93	1,00	-0,98	0,33	0,88
BP0244	mutL	DNA mismatch repair protein	-0,57	0,80	1,00	-0,57	0,53	1,00
BP2184	rpoD	RNA polymerase sigma factor 70	-0,57	1,00	1,00	-1,27	0,09	0,39
BP0139	ilvA	threonine dehydratase biosynthetic	-0,57	0,41	1,00	-0,85	0,95	1,00
BP0990	foldI	bifunctional protein Fold I	-0,57	0,78	1,00	-0,73	0,32	0,86
BP0091	bplC	lipopolysaccharide biosynthesis protein	-0,57	0,83	1,00	-0,89	0,25	0,75
BP0506	BP0506	phage-related hypothetical protein	-0,57	0,88	1,00	-0,40	0,99	1,00
BP1073	ppx	exopolyphosphatase	-0,58	0,96	1,00	-0,77	0,99	1,00
BP1910	accA	biotin carboxylase subunit of acetyl-CoA carboxylase	-0,58	0,96	1,00	-0,75	0,72	1,00
BP3624	BP3624	putative aldehyde dehydrogenase	-0,58	0,66	1,00	-1,50	0,08	0,34
BP1535	BP1535	putative thiamine-pyrophosphate-requiring enzyme	-0,58	0,98	1,00	0,43	0,99	1,00
BP1465	moeA	molybdopterin biosynthesis protein	-0,58	0,90	1,00	-1,48	0,28	0,78
BP1797	ptpA	low molecular weight protein-tyrosine-phosphatase	-0,59	0,49	1,00	-2,43	0,12	0,46
BP0371	gatB	glutamyl-tRNA(GLN) amidotransferase subunit B	-0,59	0,98	1,00	-0,90	0,67	1,00
BP1775	clpP	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	-0,59	0,97	1,00	-2,10	0,05	0,27
BP2470	serS	serine--tRNA ligase	-0,59	0,91	1,00	-1,29	0,55	1,00
BP0802	secG	protein-export membrane protein	-0,60	0,43	1,00	-0,38	0,80	1,00
BP3727	BP3727	putative glycosyl transferases	-0,60	0,72	1,00	-1,12	0,98	1,00
BP1084	thrB	homoserine kinase	-0,60	0,95	1,00	-0,05	1,00	1,00
BP2572	ihfA	integration host factor alpha-subunit	-0,60	0,65	1,00	-1,07	0,27	0,77
BP0958	cysM	cysteine synthase B	-0,60	0,92	1,00	-1,09	0,86	1,00
BP2187	BP2187	putative transferase	-0,60	0,54	1,00	-1,69	0,02	0,15
BP3632	rplR	50S ribosomal protein L18	-0,61	0,84	1,00	-0,27	0,98	1,00
BP3227	minC	putative cell division inhibitor	-0,61	0,94	1,00	-2,34	0,11	0,43
BP0988	BP0988	putative exported protein	-0,61	0,95	1,00	0,07	1,00	1,00
BP0205	BP0205	putative exported protein	-0,61	0,95	1,00	-1,88	0,01	0,01
BP3152	coq7	2-nonaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol hydroxylase	-0,61	0,59	1,00	-1,59	0,01	0,09
BP3150	wbpO	capsular polysaccharide biosynthesis protein	-0,61	0,92	1,00	-1,41	0,31	0,84
BP0011	rplA	50S ribosomal protein L1	-0,61	1,00	1,00	-1,85	0,02	0,15
BP2439	fabF	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II	-0,61	0,94	1,00	-1,48	0,69	1,00
BP2964	BP2964	conserved hypothetical protein	-0,62	0,97	1,00	-0,55	0,99	1,00

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP2078	pdxJ	pyridoxal phosphate biosynthetic protein	-0,62	0,78	1,00	-2,42	0,04	0,22
BP2575	rplT	50s ribosomal protein	-0,62	0,66	1,00	-2,12	0,08	0,37
BP1254	polA	DNA polymerase I	-0,62	0,97	1,00	-0,08	1,00	1,00
BP2788	BP2788	hypothetical protein	-0,63	0,95	1,00	-0,99	0,99	1,00
BP1362	BP1362	putative amino-acid ABC transporter, ATP-binding protein	-0,63	0,78	1,00	-1,08	0,87	1,00
BP1455	gpmB	probable phosphoglycerate mutase 2	-0,63	0,67	1,00	-0,75	0,67	1,00
BP3577	BP3577	ABC transporter ATP-binding protein	-0,63	0,80	1,00	-0,88	0,39	0,94
BP1075	glmM	phosphoglucosamine mutase	-0,63	0,59	1,00	-1,38	0,01	0,06
BP1986	BP1986	putative ABC transporter, ATP-binding protein	-0,64	0,89	1,00	-0,18	1,00	1,00
BP0387	BP0387	putative exported protein	-0,64	0,53	1,00	-2,08	0,04	0,24
BP1909	BP1909	DNA-3-methyladenine glycosylase	-0,64	0,42	1,00	-1,67	0,06	0,29
BP1436	ppsA	phosphoenolpyruvate synthase	-0,65	1,00	1,00	-1,14	0,69	1,00
BP0721	BP0721	probable aminotransferase	-0,65	1,00	1,00	0,50	0,99	1,00
BP0995	lpdA	dihydrolipoamide dehydrogenase	-0,65	1,00	1,00	-1,31	0,69	1,00
BP1266	parC	topoisomerase IV subunit A	-0,65	0,53	1,00	-1,03	0,94	1,00
BP1252	BP1252	putative exported protein	-0,65	0,46	1,00	-1,83	0,04	0,24
BP1526	purE	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit	-0,65	0,80	1,00	0,17	1,00	1,00
BP2562	pyrB1	aspartate carbamoyltransferase	-0,66	0,94	1,00	-0,97	0,27	0,77
BP0033	glyQ	glycyl-tRNA synthetase alpha chain	-0,66	0,99	1,00	0,01	1,00	1,00
BP1244	BP1244	conserved hypothetical protein	-0,66	0,81	1,00	-1,30	0,01	0,08
BP1038	corC	magnesium and cobalt efflux protein	-0,67	0,76	1,00	-1,54	0,05	0,28
BP0977	BP0977	probable oxidoreductase	-0,67	0,74	1,00	-0,51	1,00	1,00
BP0428	BP0428	putative GntR-family transcriptional regulator	-0,67	0,93	1,00	1,36	0,36	0,90
BP2749	putA	bifunctional proline oxidoreductase/transcriptional repressor	-0,67	1,00	1,00	-0,95	0,24	0,72
BP1429	lpxD	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] glucosamine N-acyltransferase	-0,67	0,72	1,00	-2,19	0,03	0,04
BP0625	BP0625	probable acyl-CoA dehydrogenase	-0,67	0,75	1,00	-0,31	1,00	1,00
BP1485	BP1485	putative membrane protein	-0,67	0,72	1,00	-0,62	0,93	1,00
BP0709	aspS	aspartyl-tRNA synthetase	-0,67	0,96	1,00	-1,08	0,82	1,00
BP0172	prfC	peptide chain release factor 3	-0,68	0,97	1,00	-0,75	0,89	1,00
BP2966	BP2966	probable carboxylesterase	-0,68	0,79	1,00	-0,47	1,00	1,00
BP3495	groL	60 kDa chaperonin	-0,68	1,00	1,00	-1,66	0,01	0,01
BP0239	pcnB	poly(A) polymerase	-0,68	0,76	1,00	-1,12	0,88	1,00
BP3787	ptxC	pertussis toxin subunit 3 precursor	-0,68	0,87	1,00	-1,44	0,87	1,00
BP3620	rplP	50S ribosomal protein L16	-0,68	0,46	1,00	-0,98	0,71	1,00

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP3558	smc	chromosome partition protein Smc	-0,69	0,78	1,00	-0,75	1,00	1,00
BP2373	BP2373	conserved hypothetical protein	-0,69	0,33	1,00	-1,90	0,01	0,07
BP1876	bvgR	regulatory protein BvgR	-0,69	0,84	1,00	-1,41	0,02	0,03
BP3304	BP3304	putative enoyl-CoA hydratase	-0,69	1,00	1,00	1,37	0,65	1,00
BP0216	sphB1	autotransporter subtilisin-like protease	-0,69	0,56	1,00	-1,48	0,01	0,01
BP1497	thrS	threonyl-tRNA synthetase	-0,69	0,99	1,00	-0,50	1,00	1,00
BP0864	mfd	transcription-repair coupling factor	-0,69	0,95	1,00	0,15	1,00	1,00
BP1430	fabZ	(3R)-hydroxymyristol-[acyl carrier protein] dehydratase	-0,70	0,72	1,00	-0,89	0,82	1,00
BP1845	BP1845	conserved hypothetical protein	-0,70	0,90	1,00	-2,84	0,03	0,19
BP2755	BP2755	putative exported protein	-0,70	1,00	1,00	-0,27	1,00	1,00
BP1484	asd	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	-0,70	0,90	1,00	-0,72	0,91	1,00
BP2488	icd	isocitrate dehydrogenase [NADP]	-0,70	0,88	1,00	-1,59	0,11	0,44
BP2189	hisZ	ATP phosphoribosyltransferase regulatory subunit	-0,71	0,70	1,00	-0,97	0,54	1,00
BP0114	BP0114	putative exported protein	-0,71	0,65	1,00	-2,57	0,25	0,74
BP2441	fabG	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	-0,71	0,03	0,28	-2,29	0,01	0,01
BP0624	BP0624	putative substrate-CoA ligase	-0,71	0,62	1,00	-1,76	0,01	0,02
BP0999	tktA	transketolase 1	-0,71	0,99	1,00	-1,53	0,02	0,03
BP1143	trpS	tryptophanyl-tRNA synthetase	-0,71	0,97	1,00	-2,00	0,46	1,00
BP1124	odhA	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	-0,71	0,62	1,00	-1,38	0,01	0,01
BP3852	katA	catalase	-0,72	0,92	1,00	-0,96	0,98	1,00
BP3020	ftsQ	putative cell division protein FtsQ	-0,72	0,71	1,00	-2,19	0,58	1,00
BP3614	rplD	50S ribosomal protein L4	-0,72	0,15	0,71	-1,61	0,01	0,02
BP3468	BP3468	hypothetical protein	-0,72	0,67	1,00	-0,71	0,96	1,00
BP2753	clpA	ATP-dependent clp protease ATP-binding	-0,72	0,77	1,00	-0,92	1,00	1,00
BP1420	tsf	elongation factor Ts	-0,72	0,89	1,00	-0,93	0,23	0,70
BP0478	BP0478	probable hydrolase	-0,72	0,43	1,00	-2,08	0,07	0,33
BP2783	thrC	threonine synthase	-0,72	0,86	1,00	-1,33	0,09	0,39
BP1877	bvgS	virulence sensor protein	-0,73	0,62	1,00	-0,97	0,22	0,68
BP3754	BP3754	glutamate synthase [NADPH] small chain	-0,73	0,73	1,00	-1,35	0,03	0,04
BP1795	tyrB	aromatic-amino-acid aminotransferase	-0,73	0,53	1,00	-0,73	0,76	1,00
BP0274	sspA	stringent starvation protein A	-0,73	0,82	1,00	-1,22	0,24	0,71
BP2200	BP2200	putative membrane protein	-0,73	0,40	1,00	-1,20	0,16	0,56
BP3123	pth	peptidyl-tRNA hydrolase	-0,73	0,24	0,89	0,44	0,99	1,00
BP1578	gmk	guanylate kinase	-0,73	0,64	1,00	-1,28	0,47	1,00

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP2424	BP2424	putative integral membrane protein	-0,74	0,51	1,00	-1,06	0,41	0,96
BP1123	BP1123	putative membrane protein	-0,74	0,78	1,00	0,17	1,00	1,00
BP2072	BP2072	putative lipoprotein	-0,74	0,27	0,95	-1,78	0,02	0,12
BP3329	lptD	LPS-assembly protein LptD	-0,74	1,00	1,00	-1,50	0,17	0,58
BP3346	BP3346	putative TolQ-like translocation protein	-0,74	0,27	0,95	-1,13	0,71	1,00
BP1498	infC	translation initiation factor IF-3	-0,74	0,88	1,00	-0,57	1,00	1,00
BP0498	BP0498	LysR-family transcriptional regulator	-0,75	0,78	1,00	-0,61	0,70	1,00
BP0993	aceE	pyruvate dehydrogenase E1 component	-0,75	0,99	1,00	-0,96	0,67	1,00
BP0751	ispB	octaprenyl-diphosphate synthase	-0,75	0,95	1,00	-1,46	0,97	1,00
BP3125	prs	ribose-phosphate pyrophosphokinase	-0,75	0,73	1,00	-1,06	0,10	0,41
BP1848	holB	DNA polymerase III, delta' subunit	-0,76	0,47	1,00	-0,90	0,17	0,57
BP0403	BP0403	putative exported protein	-0,76	0,35	1,00	-0,76	0,72	1,00
BP2624	guaA	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	-0,76	1,00	1,00	-1,28	0,88	1,00
BP1071	pstS	phosphate-binding periplasmic protein precursor	-0,76	0,96	1,00	-0,04	1,00	1,00
BP0465	BP0465	probable aldehyde dehydrogenase	-0,76	0,42	1,00	-0,97	0,93	1,00
BP3734	BP3734	SCO1/SenC family protein	-0,76	0,71	1,00	-3,20	0,02	0,15
BP2668	purL	phosphoribosylformylglycinamide synthase	-0,76	0,40	1,00	-0,91	0,48	1,00
BP1453	carB	carbamoyl-phosphate synthase large chain	-0,77	0,85	1,00	-1,27	0,02	0,14
BP3493	brkB	serum resistance protein	-0,77	0,98	1,00	1,56	0,06	0,29
BP2751	BP2751	putative membrane protein	-0,77	0,93	1,00	-1,39	0,07	0,32
BP1041	miaB	tRNA-2-methylthio-N(6)-dimethylallyl adenosine synthase	-0,77	0,57	1,00	-0,31	0,99	1,00
BP0561	BP0561	putative exported protein	-0,77	0,53	1,00	-1,38	0,93	1,00
BP3534	basR	response regulator protein	-0,77	0,80	1,00	-0,13	1,00	1,00
BP1651	BP1651	putative TetR-family transcriptional regulator	-0,78	0,69	1,00	-2,32	0,34	0,88
BP2858	tyrB1	aromatic-amino-acid aminotransferase	-0,78	0,89	1,00	-0,31	1,00	1,00
BP1801	iscA	[Fe-S] cluster formation/repair protein	-0,78	0,68	1,00	-2,63	0,27	0,77
BP2722	BP2722	putative membrane transport ATPase	-0,78	0,99	1,00	-0,38	1,00	1,00
BP2047	bph2	DNA-binding protein Bph2	-0,79	0,90	1,00	-1,24	0,02	0,16
BP1150	phbB	acetoacetyl-CoA reductase	-0,79	0,27	0,95	-2,11	0,01	0,01
BP1077	ftsH	cell division protein	-0,79	0,63	1,00	-1,22	1,00	1,00
BP2212	hmp	flavo-hemoprotein	-0,79	0,31	1,00	-1,86	0,04	0,05
BP2454	BP2454	putative oxidoreductase	-0,79	0,25	0,90	-1,08	0,17	0,57
BP2059	BP2059	putative thiolase	-0,79	0,86	1,00	-1,91	0,04	0,05

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP1570	dapA	dihydrodipicolinate synthase	-0,79	0,87	1,00	-1,12	0,36	0,90
BP1521	purC	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamidesynthase	-0,79	0,95	1,00	-0,20	1,00	1,00
BP2080	nagZ	putative beta-hexosaminidase	-0,79	0,22	0,85	-0,46	0,98	1,00
BP3019	ftsA	cell division protein FtsA	-0,79	0,74	1,00	-0,74	1,00	1,00
BP0760	cya	bifunctional hemolysin/adenylate cyclase	-0,80	0,73	1,00	-1,14	0,63	1,00
BP1612	recG	ATP-dependent DNA helicase	-0,80	0,93	1,00	0,87	0,92	1,00
BP0571	BP0571	putative two-component sensor kinase	-0,80	0,51	1,00	-0,82	0,97	1,00
BP1776	clpX	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	-0,80	0,98	1,00	-0,68	0,62	1,00
BP1315	BP1315	universal stress family protein	-0,80	0,60	1,00	-1,27	0,16	0,56
BP3753	gltB	glutamate synthase [NADPH] large chain precursor	-0,80	0,93	1,00	-1,38	0,23	0,69
BP0985	acrB	acriflavine resistance protein B	-0,81	0,92	1,00	-0,01	1,00	1,00
BP3348	proS	prolyl-tRNA synthetase	-0,81	0,87	1,00	-1,23	0,03	0,19
BP1176	astE	putative succinylglutamate desuccinylase	-0,81	0,80	1,00	-0,29	0,95	1,00
BP3142	pgi	putative glucose-6-phosphate isomerase	-0,81	0,90	1,00	-0,47	1,00	1,00
BP1482	leuD2	3-isopropylmalate dehydratase small subunit 2	-0,81	0,63	1,00	-0,48	0,97	1,00
BP1112	bipA	putative outer membrane ligand binding protein	-0,82	0,93	1,00	-1,23	0,00	0,05
BP1847	tmk	thymidylate kinase	-0,82	0,53	1,00	0,00	1,00	1,00
BP1198	clpB	ATP-dependent protease, ATPase subunit	-0,82	0,87	1,00	-1,44	0,78	1,00
BP2564	BP2564	putative lipoprotein	-0,82	0,51	1,00	-1,22	0,70	1,00
BP1895	oplaH	5-oxoprolinase	-0,82	0,51	1,00	-0,46	1,00	1,00
BP0246	amiC	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	-0,82	0,94	1,00	-0,44	1,00	1,00
BP2110	BP2110	putative exodeoxyribonuclease III	-0,83	0,31	1,00	-1,32	0,39	0,93
BP0843	nuoC	respiratory-chain NADH dehydrogenase, 30 kDa subunit	-0,83	0,29	0,98	-0,81	0,97	1,00
BP0315	hemL	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	-0,83	0,42	1,00	-1,73	0,13	0,49
BP1247	infB	translation initiation factor IF-2	-0,83	0,73	1,00	-0,82	1,00	1,00
BP3768	hisD	putative histidinol dehydrogenase	-0,83	0,91	1,00	-1,64	0,16	0,55
BP2055	BP2055	putative periplasmic substrate-binding protein	-0,84	0,85	1,00	-0,24	1,00	1,00
BP1857	gdhA1	NADP-specific glutamate dehydrogenase	-0,84	0,51	1,00	-1,33	0,16	0,54

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP1577	rpoZ	DNA-directed RNA polymerase omega chain	-0,84	0,76	1,00	-1,26	0,10	0,42
BP3034	BP3034	putative ABC transporter ATP-binding protein	-0,84	0,34	1,00	-0,19	1,00	1,00
BP0369	BP0369	putative endonuclease	-0,85	0,51	1,00	-0,72	0,88	1,00
BP1472	fdhA	formate dehydrogenase large subunit precursor	-0,85	0,30	1,00	0,36	0,93	1,00
BP3268	BP3268	putative membrane-bound transglycolase	-0,85	0,42	1,00	-1,17	0,70	1,00
BP1613	BP1613	probable LysR-family transcriptional regulator	-0,85	0,01	0,15	-2,22	0,04	0,24
BP2321	msbA	lipid A export ATP-binding/permease protein MsbA	-0,86	0,24	0,88	-1,75	0,02	0,12
BP0233	BP0233	GntR family transcriptional regulator	-0,86	0,22	0,85	-3,47	0,03	0,19
BP0731	nspC	carboxynorspermidine decarboxylase	-0,86	0,77	1,00	-0,91	0,60	1,00
BP3483	BP3483	haloacid dehalogenase-like hydrolase	-0,87	0,76	1,00	-0,08	1,00	1,00
BP1102	lysS	lysyl-tRNA synthetase	-0,87	0,97	1,00	-1,18	0,39	0,94
1BP1060	ubiD	3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase	-0,87	0,49	1,00	0,46	0,97	1,00
BP1527	purK	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit	-0,87	0,78	1,00	-0,91	0,71	1,00
BP3084	BP3084	conserved hypothetical protein	-0,88	0,53	1,00	-1,23	0,76	1,00
BP0748	rpmA	50S ribosomal protein L27	-0,88	0,71	1,00	-2,54	0,05	0,26
BP1721	BP1721	putative peptidase	-0,89	0,27	0,95	-1,96	0,01	0,01
BP2540	sucD	succinyl-CoA synthetase, alpha chain	-0,89	0,18	0,75	-1,35	0,01	0,08
BP0878	BP0878	putative phospholipase	-0,89	0,10	0,55	-0,47	1,00	1,00
BP1119	fim2	serotype 2 fimbrial subunit precursor	-0,89	0,51	1,00	-1,98	0,01	0,01
BP2589	BP2589	putative DNA-binding protein	-0,89	0,36	1,00	1,06	0,47	1,00
BP1575	glnQ2	amino acids ABC transporter, ATP-binding protein	-0,89	0,44	1,00	0,63	0,92	1,00
BP2890	purB	adenylosuccinate lyase	-0,90	0,47	1,00	-1,84	0,01	0,03
BP3421	ruvB	holliday junction DNA helicase	-0,90	0,30	1,00	-1,00	0,28	0,77
BP3440	BP3440	putative exported protein	-0,91	0,98	1,00	-0,78	1,00	1,00
BP2785	BP2785	putative aminotransferase	-0,92	0,65	1,00	-0,80	0,44	1,00
BP1913	ask	aspartokinase	-0,92	0,04	0,31	-0,92	0,97	1,00
BP1803	hscA	chaperone protein	-0,92	0,93	1,00	-0,38	0,99	1,00
BP2958	erpA	putative iron-sulfur cluster insertion protein ErpA	-0,92	0,29	0,98	-1,41	0,27	0,77
BP3027	murE	Possible murein precursor biosynthesis bifunctional protein	-0,92	0,43	1,00	-1,36	0,06	0,31
BP0117	BP0117	hypothetical protein	-0,92	0,99	1,00	-0,61	1,00	1,00
BP2497	BP2497	putative zinc protease	-0,92	0,84	1,00	-0,91	0,97	1,00

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP2784	BP2784	homoserine dehydrogenase	-0,93	0,18	0,75	-1,21	0,13	0,48
BP1201	tcfA	tracheal colonization factor precursor	-0,93	0,87	1,00	-1,25	0,09	0,39
BP3390	BP3390	putative phage repressor protein	-0,93	0,24	0,89	0,26	0,98	1,00
BP0090	bplD	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase	-0,93	0,90	1,00	1,29	0,76	1,00
BP1064	maeB	NADP-dependent malic enzyme	-0,93	0,91	1,00	-0,67	0,81	1,00
BP3025	murD	putative peptidoglycan synthesis protein	-0,93	0,85	1,00	-0,48	1,00	1,00
BP0047	metX	homoserine O-acetyltransferase	-0,94	0,11	0,59	-1,09	0,26	0,75
BP0946	pheA	p-protein [includes: chorismate mutase and prephenate dehydratase]	-0,94	0,01	0,11	-1,64	0,02	0,15
BP3807	argJ	arginine biosynthesis bifunctional protein	-0,94	0,18	0,75	-1,09	0,05	0,28
BP3610	fusA	elongation factor G	-0,94	0,40	1,00	-0,90	0,77	1,00
BP0791	ilvC	ketol-acid reductoisomerase	-0,94	0,12	0,61	-1,17	0,03	0,05
BP1296	BP1296	putative lipoprotein	-0,94	0,31	1,00	-1,36	0,09	0,39
BP2996	fabG1	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	-0,94	0,52	1,00	-0,99	0,01	0,11
BP3262	trpD	anthranilate phosphoribosyltransferase	-0,94	0,77	1,00	-1,17	0,91	1,00
BP2865	BP2865	conserved hypothetical protein	-0,94	0,19	0,78	-1,90	0,02	0,05
BP1561	BP1561	putative exported protein	-0,94	0,10	0,54	-1,59	0,26	0,76
BP3131	BP3131	putative oxygenase	-0,95	0,05	0,36	1,37	0,50	1,00
BP2499	dnaK	molecular chaperone	-0,95	0,65	1,00	-1,02	0,38	0,92
BP0088	bplF	lipopolysaccharide biosynthesis protein	-0,95	0,39	1,00	-2,20	0,47	1,00
BP1477	BP1477	conserved hypothetical protein	-0,95	0,72	1,00	-0,46	0,93	1,00
BP2815	BP2815	hypothetical protein	-0,95	0,70	1,00	-1,68	0,01	0,01
BP1360	BP1360	putative ketopantoate reductase	-0,95	0,66	1,00	-1,47	0,02	0,03
BP1838	BP1838	putative exported protein	-0,95	0,08	0,50	-1,44	0,58	1,00
BP3130	BP3130	putative cyclase	-0,96	0,13	0,64	-1,87	0,24	0,72
BP0950	rpsA	30S ribosomal protein S1 (RefSeq)	-0,96	0,14	0,67	-1,50	0,01	0,01
BP3616	rplB	50S ribosomal protein L2	-0,96	0,25	0,89	-1,47	0,02	0,16
BP2532	BP2532	conserved hypothetical protein	-0,96	0,39	1,00	-1,95	0,02	0,03
BP2693	BP2693	putative gamma-glutamyltranspeptidase	-0,96	0,17	0,72	-0,33	1,00	1,00
BP3591	accD	acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta	-0,97	0,01	0,15	-1,96	0,01	0,02
BP2644	BP2644	putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-0,97	0,13	0,64	-1,63	0,07	0,34
BP2961	rpsI	30s ribosomal protein S9	-0,97	0,36	1,00	-1,88	0,01	0,02
BP3730	glmU	UDP-N-acetylglucosamine synthesis bifunctional protein	-0,97	0,01	0,13	-2,04	0,01	0,01

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP1976	gabD	succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+]	-0,98	0,87	1,00	-2,82	0,01	0,01
BP3819	BP3819	hypothetical protein	-0,98	0,19	0,77	-1,99	0,01	0,01
BP0279	BP0279	conserved hypothetical protein	-0,98	0,20	0,80	-2,42	0,02	0,12
BP3445	BP3445	putative NUDIX hydrolase	-0,98	0,07	0,45	-1,59	0,01	0,11
BP1977	goaG	4-aminobutyrate aminotransferase	-0,99	0,58	1,00	-0,77	0,55	1,00
BP0390	rsmI	ribosomal RNA small subunit methyltransferase I	-0,99	0,46	1,00	0,75	0,80	1,00
BP0732	BP0732	putative exported protein	-0,99	0,87	1,00	0,32	1,00	1,00
BP2399	BP2399	putative transcriptional regulator	-0,99	0,81	1,00	-1,03	0,55	1,00
BP3484	ribB	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	-0,99	0,65	1,00	-1,83	0,01	0,02
BP1581	BP1581	putative oxidoreductase	-0,99	0,57	1,00	-1,60	0,34	0,88
BP3117	BP3117	putative restriction endonuclease	-0,99	0,86	1,00	-1,34	0,37	0,91
BP1587	BP1587	conserved hypothetical protein	-1,00	0,74	1,00	-0,54	0,92	1,00
BP0948	aroA	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	-1,00	0,99	1,00	-0,86	0,47	1,00
BP0010	rplK	50S ribosomal protein L11	-1,00	0,66	1,00	-1,65	0,09	0,39
BP0690	BP0690	conserved hypothetical protein	-1,00	0,01	0,10	-1,03	0,68	1,00
BP3794	ptlF	type IV secretion system protein PtlF	-1,01	0,12	0,61	-0,59	0,59	1,00
BP0683	BP0683	4,5-dihydroxyphthalate decarboxylase	-1,01	0,95	1,00	-1,28	0,80	1,00
BP2793	rplI	50s ribosomal protein I9	-1,01	0,27	0,94	-2,45	0,01	0,01
BP2044	leuS	leucyl-tRNA synthetase	-1,01	0,16	0,71	-1,04	0,50	1,00
BP2312	rsfS	ribosomal silencing factor RsfS	-1,01	0,93	1,00	-1,01	0,46	1,00
BP3539	argD1	acetylornithine aminotransferase 1	-1,02	0,42	1,00	-0,52	1,00	1,00
BP1012	BP1012	conserved hypothetical protein	-1,02	0,17	0,74	0,80	0,50	1,00
BP2328	BP2328	putative transferase	-1,02	1,00	1,00	-1,14	0,05	0,25
BP3345	BP3345	putative TolR-like translocation protein	-1,02	0,85	1,00	-0,54	1,00	1,00
BP3222	ompR	two component response regulator	-1,02	0,00	0,04	-2,26	0,01	0,06
BP1713	trxC	thioredoxin 2	-1,02	0,35	1,00	0,23	1,00	1,00
BP3537	argG	argininosuccinate synthase	-1,03	0,09	0,54	-1,64	0,01	0,04
BP1078	rlmE	ribosomal RNA large subunit methyltransferase E	-1,03	0,02	0,17	-0,92	0,19	0,61
BP0277	petA	ubiquinol-cytochrome C reductase iron-sulfur subunit	-1,03	0,06	0,41	-1,26	0,05	0,26
BP1816	panD	aspartate 1-decarboxylase precursor	-1,03	0,13	0,65	-0,48	0,73	1,00
BP2863	BP2863	conserved hypothetical protein	-1,04	0,06	0,43	-1,33	0,11	0,45
BP0667	BP0667	AsnC-family transcriptional regulator	-1,04	0,06	0,39	-1,75	0,03	0,19
BP2960	argC	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	-1,05	0,40	1,00	-1,49	0,01	0,01
BP2537	hemC1	putative heme receptor	-1,05	0,07	0,45	0,01	1,00	1,00

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP3264	trpE	anthranilate synthase component I	-1,05	0,01	0,01	-0,83	0,30	0,81
BP1418	map	methionine aminopeptidase	-1,06	0,08	0,47	-0,53	1,00	1,00
BP2978	gltX	glutamyl-tRNA synthetase	-1,06	0,40	1,00	-0,81	0,61	1,00
BP3660	uvrA	excinuclease ABC subunit A	-1,06	0,63	1,00	-0,90	0,96	1,00
BP3228	minD	putative septum site-determining protein	-1,06	0,18	0,75	-1,22	0,52	1,00
BP1611	BP1611	putative translational inhibitor	-1,06	0,54	1,00	-1,54	0,29	0,80
BP3322	BP3322	putative binding-protein-dependent transport protein	-1,07	0,95	1,00	-0,32	1,00	1,00
BP2156	BP2156	conserved hypothetical protein	-1,07	0,63	1,00	-1,68	0,45	1,00
BP0955	hldD	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase	-1,07	0,08	0,48	-1,80	0,01	0,01
BP3215	fabI1	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]	-1,07	0,26	0,93	-1,91	0,01	0,01
BP2911	bph3	putative DNA-binding protein (histone)	-1,07	0,95	1,00	-2,05	0,02	0,16
BP3612	rpsJ	30S ribosomal protein S10	-1,08	0,06	0,43	-2,26	0,11	0,44
BP1294	psd	phosphatidylserine decarboxylase proenzyme	-1,08	0,16	0,71	-1,47	0,31	0,83
BP2062	BP2062	putative malonyl-CoA decarboxylase	-1,08	0,78	1,00	-0,60	1,00	1,00
BP3441	BP3441	conserved hypothetical protein	-1,08	0,30	1,00	-1,92	0,69	1,00
BP3415	fis	DNA-binding protein	-1,08	0,39	1,00	-1,43	0,33	0,88
BP0075	BP0075	probable glutathione S-transferase	-1,08	0,88	1,00	-0,77	0,65	1,00
BP0868	fbp	fructose-1,6-bisphosphatase	-1,09	0,06	0,39	-1,95	0,01	0,01
BP2735	BP2735	conserved hypothetical protein	-1,09	0,82	1,00	-1,11	0,89	1,00
BP1588	rph	ribonuclease PH	-1,09	0,10	0,56	-1,81	0,04	0,22
BP0718	BP0718	carboxyvinyl-carboxyphosphonatephosphorylmutase	-1,10	0,01	0,01	-1,16	0,01	0,03
BP2435	mucB	putative sigma factor regulatory protein	-1,11	0,93	1,00	-1,65	0,13	0,48
BP1531	BP1531	putative arginase	-1,11	0,90	1,00	-1,28	0,65	1,00
BP1445	BP1445	probable acyl-CoA dehydrogenase	-1,11	0,08	0,46	-0,45	0,97	1,00
BP3018	ftsZ	cell division protein FtsZ	-1,11	0,24	0,88	-1,77	0,01	0,02
BP3277	BP3277	putative enoyl-CoA hydratase	-1,11	0,37	1,00	-0,63	0,98	1,00
BP2797	foIE2	GTP cyclohydrolase FoIE2	-1,12	0,37	1,00	-1,41	0,40	0,95
BP3692	trmB	tRNA (guanine-N(7))-methyltransferase	-1,12	0,03	0,27	-1,06	0,34	0,88
BP2443	fabH	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III	-1,12	0,09	0,53	-1,21	0,41	0,96
BP0551	fmt	methionyl-tRNA formyltransferase	-1,12	0,50	1,00	-0,45	0,97	1,00
BP0944	gyrA	DNA gyrase subunit A	-1,12	0,70	1,00	-1,23	0,42	0,97
BP3639	rpsM	30S ribosomal protein S13	-1,12	0,86	1,00	-1,55	0,74	1,00

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP2625	guaB	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	-1,12	0,08	0,50	-2,08	0,01	0,01
BP0777	BP0777	probable Zinc-binding dehydrogenase	-1,13	0,16	0,71	-1,58	0,05	0,27
BP0727	BP0727	probable transcriptional regulator	-1,13	0,08	0,48	-1,60	0,29	0,80
BP2727	BP2727	exported Surf1-family protein	-1,13	0,43	1,00	-1,40	0,42	0,97
BP0102	BP0102	putative penicillin-binding protein precursor	-1,13	0,01	0,14	-2,26	0,01	0,01
BP3403	BP3403	putative UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	-1,14	0,02	0,03	-1,76	0,01	0,04
BP2233	BP2233	hypothetical protein	-1,14	0,09	0,50	-1,49	0,02	0,03
BP3576	BP3576	ABC transporter ATP-binding protein	-1,14	0,23	0,86	-1,39	0,20	0,65
BP1583	amn	putative nucleosidase	-1,14	0,75	1,00	1,20	0,72	1,00
BP3490	pyrF	putative orotidine 5'-phosphate decarboxylase	-1,15	0,80	1,00	0,08	1,00	1,00
BP0079	ffh	signal recognition particle protein	-1,16	0,00	0,09	-1,48	0,16	0,56
BP2120	gor	glutathione reductase	-1,16	0,10	0,56	-1,53	0,09	0,38
BP3141	pgm	phosphoglucomutase	-1,16	0,03	0,09	-2,59	0,01	0,01
BP3622	rpsQ	30S ribosomal protein S17	-1,17	0,27	0,94	-1,51	0,95	1,00
BP1151	BP1151	conserved hypothetical protein	-1,17	0,01	0,11	-1,69	0,01	0,02
BP2377	BP2377	putative AMP-binding protein	-1,18	0,06	0,39	-1,36	0,10	0,42
BP3503	BP3503	LysR-family transcriptional regulator	-1,18	0,04	0,31	-0,96	0,12	0,46
BP3529	BP3529	conserved hypothetical protein	-1,19	0,03	0,27	-0,74	0,35	0,90
BP1764	dapD	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase	-1,19	0,13	0,64	-2,30	0,01	0,01
BP1305	BP1305	conserved hypothetical protein	-1,19	0,20	0,80	-0,75	0,98	1,00
BP3398	ilvE	branched-chain amino acid aminotransferase	-1,19	0,49	1,00	-1,29	0,27	0,77
BP0603	gpsA	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]	-1,20	0,05	0,35	-0,85	0,97	1,00
BP1243	BP1243	conserved hypothetical protein	-1,20	0,07	0,44	-1,37	0,36	0,90
BP0115	argS	arginyl-tRNA synthetase	-1,20	0,12	0,61	-1,88	0,01	0,01
BP3772	hisA	histidine biosynthesis protein	-1,21	0,09	0,51	-0,65	1,00	1,00
BP0009	nusG	transcription antitermination protein NusG	-1,21	0,09	0,50	-1,61	0,01	0,02
BP3808	BP3808	conserved hypothetical protein	-1,21	0,04	0,31	-1,84	0,02	0,12
BP3613	rplC	50S ribosomal protein L3 (RefSeq)	-1,21	0,81	1,00	-1,45	0,10	0,40
BP2794	rpsR	30s ribosomal protein s18	-1,22	0,12	0,62	-1,98	0,03	0,20
BP0074	htpG	heat shock protein	-1,22	0,03	0,24	-1,73	0,05	0,26
BP3035	pyrC1	dihydroorotase	-1,22	0,01	0,15	-1,52	0,02	0,13
BP0627	BP0627	probable enoyl-CoA hydratase/isomerase	-1,22	0,11	0,59	-1,43	0,01	0,01

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP3561	BP3561	putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	-1,22	0,84	1,00	-2,21	0,15	0,52
BP2984	nrdB	ribonucleoside-diphosphate reductase beta chain	-1,22	0,54	1,00	0,08	1,00	1,00
BP0499	BP0499	hypothetical protein	-1,23	0,15	0,69	-1,41	0,49	1,00
BP1840	rimM	16S rRNA processing protein	-1,23	0,29	0,98	-1,32	0,54	1,00
BP1799	iscS	cysteine desulfurase	-1,23	0,20	0,80	-1,39	0,59	1,00
BP2893	mnmA	tRNA-specific 2-thiouridylase MnmA	-1,24	0,01	0,08	-1,64	0,01	0,04
BP3031	mraZ	conserved hypothetical protein	-1,24	0,21	0,82	-1,54	0,16	0,55
BP2770	BP2770	probable short-chain dehydrogenase	-1,24	0,07	0,45	-1,98	0,03	0,04
BP0702	purT	phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2	-1,24	0,03	0,28	-1,77	0,01	0,01
BP0610	thiF	adenylyltransferase	-1,25	0,51	1,00	-1,64	0,48	1,00
BP3266	rpe	ribulose-phosphate 3-epimerase	-1,25	0,16	0,71	-2,57	0,01	0,10
BP1451	tal	transaldolase	-1,25	0,02	0,20	-0,99	0,38	0,92
BP1300	BP1300	putative glutathione transferase	-1,26	0,02	0,05	-2,09	0,01	0,01
BP2908	aroG	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	-1,26	0,22	0,84	-1,56	0,01	0,11
BP2201	rlmN	dual-specificity RNA methyltransferase RlmN	-1,27	0,11	0,59	-2,98	0,01	0,08
BP1904	uppP	undecaprenyl-diphosphatase	-1,27	0,79	1,00	0,09	1,00	1,00
BP2645	BP2645	putative IclR-family regulatory protein	-1,27	0,05	0,37	-2,32	0,01	0,02
BP0178	BP0178	putative lipoprotein	-1,27	0,08	0,47	-2,75	0,01	0,01
BP0873	tpm	thiopurine S-methyltransferase	-1,27	0,13	0,65	-1,49	0,12	0,45
BP1054	prn	pertactin precursor	-1,28	0,16	0,71	-1,82	0,02	0,03
BP0451	argD2	acetylmithine aminotransferase 2	-1,28	0,03	0,05	-1,41	0,06	0,31
BP1573	glnH	glutamine-binding periplasmic protein precursor	-1,28	0,04	0,32	-2,14	0,34	0,88
BP1280	proC	pyrroline-5-carboxylate reductase	-1,28	0,56	1,00	-1,49	0,13	0,48
BP3543	BP3543	putative D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase	-1,29	0,13	0,64	-0,81	0,69	1,00
BP3071	metK	S-adenosylmethionine synthetase	-1,30	0,66	1,00	-1,86	0,10	0,41
BP3815	BP3815	HlyD family secretion protein	-1,30	0,66	1,00	-0,31	1,00	1,00
BP3291	hemE	uroporphyrinogen decarboxylase	-1,31	0,27	0,95	-0,96	0,56	1,00
BP1754	ribF	riboflavin biosynthesis protein	-1,32	0,65	1,00	-0,19	1,00	1,00
BP1806	BP1806	hypothetical protein	-1,33	0,01	0,01	-1,47	0,02	0,03
BP3343	tolB	protein TolB	-1,33	0,01	0,01	-1,71	0,01	0,01
BP1231	BP1231	putative membrane protein	-1,33	0,79	1,00	-1,45	0,94	1,00
BP1778	BP1778	probable LysR-family transcriptional regulator	-1,33	0,49	1,00	1,05	0,68	1,00
BP3842	BP3842	hypothetical protein	-1,34	0,80	1,00	2,24	0,01	0,01

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP1813	pdxA	putative pyridoxal phosphate biosynthetic protein	-1,34	0,90	1,00	1,78	0,40	0,94
BP1940	nemA	N-ethylmaleimide reductase	-1,34	0,91	1,00	-0,95	0,94	1,00
BP0242	purM	phosphoribosylformylglycinamidine cyclo-ligase	-1,34	0,01	0,15	-1,55	0,05	0,25
BP2954	tyrS	tyrosyl-tRNA synthetase	-1,34	0,01	0,01	-1,72	0,01	0,10
BP2084	queF	NADPH-dependent 7-cyano-7-deazaguanine reductase	-1,35	0,04	0,33	-2,69	0,02	0,03
BP1052	upp	uracil phosphoribosyltransferase	-1,35	0,05	0,37	-1,52	0,39	0,93
BP0221	catI	3-oxoadipate CoA-transferase subunit A	-1,35	0,06	0,43	-1,66	0,23	0,70
BP2291	BP2291	tartrate dehydrogenase	-1,35	0,19	0,78	0,05	1,00	1,00
BP3416	purH	bifunctional purine biosynthesis protein	-1,36	0,61	1,00	-1,56	0,01	0,01
BP3599	BP3599	putative protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	-1,36	0,09	0,53	-1,05	0,11	0,43
BP1902	suhB	inositol-1-monophosphatase	-1,36	0,38	1,00	-1,05	0,96	1,00
BP1421	pyrH	uridylate kinase	-1,37	0,01	0,01	-1,79	0,01	0,01
BP2444	plsX	phosphate acyltransferase	-1,37	0,52	1,00	-1,05	0,40	0,95
BP2411	BP2411	conserved hypothetical protein	-1,37	0,88	1,00	-1,34	0,94	1,00
BP1839	rpsP	30S ribosomal protein S16	-1,37	0,34	1,00	-2,20	0,09	0,38
BP3581	BP3581	putative ferredoxin--NADP reductase	-1,37	0,05	0,36	-2,19	0,03	0,19
BP2977	BP2977	conserved hypothetical protein	-1,38	0,32	1,00	-0,26	0,99	1,00
BP2769	adk	adenylate kinase	-1,39	0,61	1,00	-0,58	0,96	1,00
BP3590	trpA	tryptophan synthase alpha chain	-1,39	0,03	0,28	-1,39	0,11	0,43
BP0965	BP0965	antioxidant protein	-1,40	0,07	0,43	-0,90	0,51	1,00
BP2541	sucC	Succinyl-CoA synthetase, beta chain	-1,40	0,02	0,21	-1,21	0,06	0,30
BP2409	acsA	acetyl-coenzyme A synthetase	-1,40	0,00	0,08	-1,25	0,79	1,00
BP3761	BP3761	putative exported protein	-1,40	0,06	0,43	-2,18	0,13	0,49
BP2773	rpsT	30s ribosomal protein s20	-1,40	0,29	0,99	-0,38	0,99	1,00
BP3635	rplO	50S ribosomal protein L15	-1,41	0,00	0,08	-1,34	0,21	0,68
BP1237	ispH	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	-1,41	0,03	0,26	-2,13	0,01	0,06
BP0701	BP0701	conserved hypothetical protein	-1,41	0,30	1,00	-1,55	0,01	0,03
BP0989	prlC	oligopeptidase A	-1,42	0,02	0,23	-0,96	0,11	0,44
BP3261	trpC	indole-3-glycerol phosphate synthase	-1,42	0,17	0,73	-2,02	0,01	0,03
BP0604	secB	protein-export protein	-1,43	0,01	0,13	-2,46	0,08	0,35
BP3551	ahpD	putative antioxidant protein	-1,43	0,04	0,29	-2,05	0,03	0,18
BP1220	BP1220	putative phytoene synthase	-1,44	0,01	0,16	-2,43	0,09	0,39
BP3438	BP3438	IclR family transcriptional regulator	-1,44	0,03	0,27	-0,81	0,72	1,00
BP3658	BP3658	putative phosphohydrolase	-1,44	0,10	0,58	-1,49	0,38	0,92
BP2841	BP2841	putative short-chain dehydrogenase	-1,45	0,48	1,00	-2,22	0,01	0,03

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP2378	BP2378	putative transferase	-1,45	0,07	0,45	-3,04	0,01	0,04
BP3867	BP3867	putative exported protein	-1,45	0,01	0,13	-2,10	0,01	0,02
BP3538	argF	ornithine carbamoyltransferase	-1,45	0,01	0,01	-2,72	0,01	0,02
BP0694	rpoP	nitrogen regulatory IIA protein	-1,45	0,09	0,53	-1,20	0,13	0,49
BP0103	BP0103	probable class IV aminotransferase	-1,46	0,01	0,01	-1,44	0,01	0,06
BP3342	BP3342	putative peptidoglycan-associated lipoprotein	-1,46	0,38	1,00	-1,48	0,16	0,56
BP3154	thyA	thymidylate synthase	-1,47	0,20	0,81	-2,15	0,01	0,11
BP2365	mdh	malate dehydrogenase	-1,47	0,05	0,37	-2,00	0,01	0,07
BP2750	BP2750	lipoprotein	-1,47	0,05	0,36	-2,48	0,01	0,03
BP1320	BP1320	conserved hypothetical protein	-1,48	0,13	0,65	-0,55	0,71	1,00
BP0831	betT	high-affinity choline transport protein	-1,48	0,11	0,59	-3,31	0,07	0,33
BP1245	rimP	ribosome maturation factor RimP	-1,49	0,30	1,00	-1,45	0,00	0,05
BP2707	moeA1	molybdopterin biosynthesis protein	-1,50	0,34	1,00	-1,07	0,54	1,00
BP1259	BP1259	conserved hypothetical protein	-1,50	0,51	1,00	-0,76	0,73	1,00
BP3115	BP3115	conserved hypothetical protein	-1,50	0,01	0,12	-0,81	0,96	1,00
BP0516	BP0516	hypothetical protein	-1,50	0,66	1,00	-1,01	0,91	1,00
BP1538	ilvG	putative acetolactate synthase large subunit	-1,50	0,01	0,01	-2,16	0,01	0,01
BP0870	BP0870	putative exported protein	-1,52	0,01	0,14	-3,16	0,01	0,02
BP0576	BP0576	conserved hypothetical protein	-1,52	0,44	1,00	-2,03	0,47	1,00
BP3021	ddl	D-alanine--D-alanine ligase	-1,52	0,15	0,71	-1,37	0,48	1,00
BP0155	serA	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	-1,53	0,07	0,45	-1,84	0,01	0,03
BP0906	BP0906	putative peptidase	-1,53	0,00	0,08	-1,33	0,04	0,23
BP2068	BP2068	putative exported protein	-1,54	0,77	1,00	0,10	1,00	1,00
BP2993	BP2993	putative carbohydrate kinase	-1,54	0,01	0,02	-1,59	0,17	0,58
BP2501	grpE	protein GrpE	-1,55	0,16	0,71	-2,92	0,01	0,01
BP2474	trxB	thioredoxin reductase	-1,55	0,01	0,11	-1,67	0,01	0,01
BP1843	BP1843	conserved hypothetical protein	-1,55	0,43	1,00	-2,27	0,01	0,10
BP1605	BP1605	putative iron binding protein	-1,58	0,71	1,00	-1,71	0,15	0,53
BP3086	hslV	ATP-dependent protease heat shock protein	-1,58	0,61	1,00	0,81	0,74	1,00
BP1263	trxA	thioredoxin 1	-1,58	0,37	1,00	-3,07	0,22	0,69
BP3838	BP3838	ubiE/COQ5 methyltransferase family protein	-1,59	0,00	0,06	-1,88	0,21	0,67
BP0628	BP0628	putative pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit	-1,60	0,03	0,26	-2,82	0,02	0,03
BP0664	BP0664	putative exported protein	-1,61	0,03	0,27	-1,93	0,01	0,01
BP1881	fimB	chaperone protein	-1,61	0,08	0,50	-2,42	0,01	0,01
BP0650	BP0650	LysR-family transcriptional regulator	-1,62	0,03	0,04	-1,44	0,04	0,24

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP1729	BP1729	putative pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	-1,61	0,06	0,41	-0,71	1,00	1,00
BP3845	BP3845	nitroreductase family protein	-1,62	0,05	0,36	-2,24	0,01	0,08
BP3680	glcB	malate synthase G	-1,64	0,01	0,01	-1,70	0,01	0,01
BP2452	BP2452	conserved hypothetical protein	-1,64	0,42	1,00	-2,22	0,15	0,52
BP3784	ptxB	pertussis toxin subunit 2 precursor	-1,65	0,42	1,00	-1,16	0,23	0,71
BP3528	BP3528	Cys/Met metabolism PLP-dependent enzyme	-1,66	0,03	0,27	-2,32	0,01	0,11
BP0113	dsbA	thiol:disulfide interchange protein DsbA precursor	-1,66	0,48	1,00	-1,96	0,23	0,70
BP3037	BP3037	conserved hypothetical protein	-1,67	0,17	0,73	-1,40	0,76	1,00
BP1306	arsC	putative arsenate reductase	-1,67	0,25	0,90	-0,46	0,99	1,00
BP1774	tig	trigger factor	-1,68	0,01	0,01	-1,94	0,01	0,01
BP1874	BP1874	putative amidase	-1,69	0,01	0,10	-1,04	0,67	1,00
BP3554	risA	tresponse regulator protein	-1,70	0,75	1,00	-1,61	0,16	0,55
BP0846	nuoF	respiratory-chain NADH dehydrogenase, 51 kDa subunit	-1,70	0,01	0,10	-2,65	0,00	0,05
BP0552	def2	peptide deformylase 2	-1,71	0,42	1,00	-2,26	0,01	0,09
BP1057	BP1057	putative membrane protein	-1,72	0,32	1,00	-1,75	0,62	1,00
BP1616	dps	putative DNA-binding protein	-1,74	0,10	0,55	-2,22	0,01	0,01
BP0116	BP0116	conserved hypothetical protein	-1,75	0,20	0,80	-2,39	0,02	0,12
BP2202	ndk	nucleoside diphosphate kinase	-1,76	0,01	0,02	-1,81	0,01	0,01
BP2761	sodB	superoxide dismutase	-1,76	0,01	0,14	-2,81	0,01	0,01
BP0961	etfB	electron transfer flavoprotein beta-subunit	-1,76	0,01	0,03	-1,55	0,02	0,16
BP1800	iscU	[Fe-S] cluster formation/repair protein	-1,77	0,01	0,04	-3,08	0,01	0,01
BP0558	BP0558	amino acid-binding periplasmic protein	-1,77	0,01	0,15	-0,71	0,82	1,00
BP2948	BP2948	putative riboflavin-specific deaminase	-1,79	0,01	0,01	-2,96	0,01	0,01
BP0900	BP0900	probable oxidoreductase	-1,81	0,60	1,00	-0,08	1,00	1,00
BP3634	rpmD	50S ribosomal protein L30	-1,81	0,02	0,21	-2,60	0,01	0,06
BP0634	BP0634	probable acyl-CoA dehydrogenase	-1,81	0,20	0,80	-1,56	0,34	0,88
BP1487	smoM	putative periplasmic solute-binding protein	-1,81	0,01	0,01	-2,29	0,01	0,01
BP0698	lptA	lipopolysaccharide export system protein LptA	-1,82	0,27	0,95	1,65	0,72	1,00
BP1849	BP1849	conserved hypothetical protein	-1,82	0,01	0,01	-3,24	0,01	0,01
BP1428	BP1428	putative outer membrane protein	-1,82	0,01	0,01	-3,42	0,01	0,01
BP1359	BP1359	putative mandelate racemase	-1,84	0,01	0,10	-1,72	0,74	1,00
BP0607	gpmA	phosphoglycerate mutase 1	-1,85	0,06	0,42	-0,99	0,12	0,46
BP2700	BP2700	putative NAD synthetase	-1,86	0,01	0,04	-0,99	0,51	1,00
BP1908	cysS	cysteinyl-tRNA synthetase	-1,89	0,01	0,01	-2,25	0,01	0,04

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP2578	dut	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	-1,89	0,03	0,25	-1,83	0,09	0,38
BP2215	ectA	L-2,4-diaminobutyric acid acetyltransferase	-1,90	0,07	0,45	-1,82	0,00	0,05
BP2962	rplM	50s ribosomal protein L13	-1,92	0,01	0,15	-2,80	0,02	0,14
BP1565	BP1565	conserved hypothetical protein	-1,93	0,00	0,06	-2,06	0,03	0,18
BP2818	BP2818	putative exported protein	-1,94	0,18	0,76	-0,49	1,00	1,00
BP1251	BP1251	putative toxin	-1,95	0,11	0,59	-2,69	0,06	0,28
BP1001	pgk	phosphoglycerate kinase	-1,97	0,01	0,03	-1,21	0,02	0,14
BP1519	fba	fructose-bisphosphate aldolase	-1,97	0,01	0,01	-2,19	0,01	0,01
BP1731	ugpQ	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	-1,98	0,13	0,64	-0,66	0,84	1,00
BP2799	BP2799	probable geranyltranstransferase	-1,99	0,01	0,06	-2,35	0,03	0,04
BP1103	BP1103	probable short chain dehydrogenase	-1,99	0,01	0,01	-2,02	0,02	0,03
BP2172	BP2172	putative cytochrome C oxidase subunit	-2,01	0,31	1,00	-1,20	0,11	0,45
BP2051	rpmB	50S ribosomal protein L28	-2,01	0,33	1,00	-2,12	0,04	0,22
BP3425	BP3425	putative carbonic anhydrase	-2,01	0,01	0,01	-1,69	0,01	0,03
BP3633	rpsE	30S ribosomal protein S5	-2,04	0,01	0,03	-3,06	0,01	0,01
BP2186	rpsU	30S ribosomal protein S21	-2,04	0,01	0,11	-3,70	0,01	0,01
BP3330	surA	chaperone SurA	-2,05	0,00	0,09	-1,56	0,01	0,06
BP1281	ugpB	glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein precursor	-2,06	0,01	0,01	-0,88	0,30	0,82
BP3617	rpsS	30S ribosomal protein S19	-2,07	0,01	0,10	-4,19	0,01	0,01
BP2125A	BP2125A	putative exported protein	-2,08	0,01	0,06	-3,72	0,01	0,01
BP3662	ssb	single-strand binding protein	-2,09	0,01	0,14	-1,68	0,01	0,06
BP2747	BP2747	putative ABC transport solute-binding protein	-2,11	0,02	0,03	-1,93	0,01	0,01
BP0373	gatC	glutamyl-tRNA(GLN) amidotransferase subunit C	-2,14	0,01	0,02	-3,52	0,02	0,05
BP1087	BP1087	conserved hypothetical protein	-2,16	0,02	0,22	-1,13	0,38	0,92
BP1364	BP1364	putative amino-acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein	-2,16	0,01	0,01	-1,54	0,01	0,12
BP3773	hisF	histidine biosynthesis protein	-2,19	0,03	0,23	-1,31	0,15	0,53
BP1446	BP1446	enoly-CoA hydratase	-2,20	0,01	0,01	-1,40	0,10	0,42
BP0562	BP0562	putative exported protein	-2,25	0,01	0,01	-2,12	0,01	0,02
BP3627	rplX	50S ribosomal protein L24	-2,26	0,01	0,01	-3,08	0,01	0,02
BP0381	BP0381	putative TetR-family transcriptional regulator	-2,28	0,01	0,13	-3,10	0,17	0,57
BP0876	BP0876	putative lipoprotein	-2,28	0,01	0,11	-3,65	0,09	0,39
BP2953	BP2953	conserved hypothetical protein	-2,28	0,00	0,08	-1,55	0,90	1,00
BP2889	BP2889	putative c'cytochrome	-2,30	0,02	0,22	-1,58	0,02	0,14

Locus	Gen	Proteína	Intracelular 5h vs control			Intracelular 48h vs control		
			Log2 FC	p-valor	q-valor	Log2 FC	p-valor	q-valor
BP0370	pyrE	orotate phosphoribosyltransferase	-2,38	0,01	0,01	-3,10	0,01	0,01
BP2398	BP2398	putative L-asparaginase	-2,39	0,07	0,46	-2,90	0,01	0,11
BP1906	ppiB	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	-2,41	0,01	0,15	-1,83	0,28	0,78
BP1189	BP1189	lipoprotein	-2,43	0,18	0,75	-1,61	0,07	0,34
BP2963	BP2963	putative exported solute binding protein	-2,44	0,01	0,01	-2,64	0,01	0,04
BP1483	leuB	3-isopropylmalate dehydrogenase	-2,48	0,01	0,01	-2,90	0,01	0,05
BP31013	BP3013	hypothetical protein	-2,51	0,01	0,01	-1,14	0,03	0,07
BP0801	tpiA	triosephosphate isomerase	-2,51	0,01	0,01	-2,95	0,01	0,02
BP3568	BP3568	putative exported protein	-2,52	0,01	0,01	-2,38	0,01	0,01
BP3831	BP3831	putative ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein	-2,55	0,01	0,01	-2,42	0,01	0,02
BP1422	fir	ribosome recycling factor	-2,66	0,01	0,02	-0,32	1,00	1,00
BP3496	groS	10 kDa chaperonin	-2,67	0,01	0,11	-3,57	0,01	0,02
BP2267	greA	transcription elongation factor	-2,68	0,01	0,15	-0,95	0,14	0,51
BP2994	BP2994	possible membrane protein	-2,73	0,03	0,28	-5,20	0,01	0,01
BP1285	livJ1	leu/ile/val-binding protein precursor	-2,75	0,01	0,15	-2,70	0,18	0,59
BP0793	BP0793	putative lipoprotein	-2,83	0,20	0,80	-1,97	0,35	0,89
BP0250	BP0250	putative exported protein	-2,86	0,01	0,01	-3,16	0,01	0,01
BP1723	BP1723	putative exported protein	-2,89	0,01	0,15	-2,88	0,05	0,25
BP3584	BP3584	conserved hypothetical protein	-3,26	0,03	0,26	-2,83	0,10	0,41
BP2985	bpH1	histone protein	-3,56	0,01	0,09	-0,94	0,63	1,00
BP2804	BP2804	putative iron-sulfur protein	-4,54	0,00	0,08	-3,16	0,04	0,23
BP3629	rpsN	30S ribosomal protein S14	-4,58	0,01	0,02	-2,19	0,13	0,49

Capítulo 5

Discusión general

5. Discusión general

La tos convulsa continúa siendo un importante problema de salud a nivel global, causando un gran número de muertes y constituyendo una de las enfermedades inmunoprevenibles peor controladas. La continua circulación de *B. pertussis* en la población, que explica la epidemiología de esta enfermedad, se debe principalmente a que las vacunas no previenen eficazmente la colonización del tracto respiratorio ni la transmisión de la bacteria entre individuos. El diseño de mejoras en las estrategias de prevención para disminuir la circulación y la persistencia de este patógeno requiere conocer el ciclo infeccioso y detectar blancos de estrategias inmunopreventivas y/o terapéuticas eficaces para el control de la enfermedad.

Bordetella pertussis ha sido históricamente considerada un patógeno extracelular y las vacunas contra la tos convulsa han sido diseñadas en base a esta premisa. Según se describió en la Introducción General de este trabajo de Tesis, la primera vacuna desarrollada estaba compuesta de bacterias enteras inactivadas y se le atribuyeron varios efectos adversos, motivando el desarrollo de una vacuna acelular más segura [481]. Al momento del diseño de la formulación de este segundo tipo de vacuna existía consenso en que la infección por *B. pertussis* iniciaba con la adhesión de la bacteria a células del tracto respiratorio, luego ocurría la proliferación bacteriana en localización extracelular con la producción y secreción de toxinas que desencadenaba la fase tóxica de la enfermedad. Basándose en esto, se asumió que la interferencia con el proceso de adhesión inicial y la neutralización de las toxinas sería suficiente para generar una inmunidad protectora y se seleccionaron antígenos que, además de ser seguros, cumplieran estas funciones [482]. Así fue como la primera formulación acelular contenía FHA para evitar la adhesión y PT para inducir anticuerpos que neutralicen la toxina [200]. En formulaciones posteriores se agregaron Fim para fortalecer el efecto inhibitorio sobre la adhesión [482] y Prn. Esta última se agregó porque se observó que su inclusión en vacunas experimentales aumentaba significativamente la protección [483], aunque se desconocía su función en la patogénesis. No se incluyó CyaA porque aún no estaba completamente caracterizada y se creía que podía inducir autoinmunidad. El adyuvante utilizado fue el hidróxido de aluminio ya que era el único aprobado en humanos en ese momento [484]. Este adyuvante induce una respuesta fundamentalmente humoral con perfil Th2 [485], [486], suficiente para controlar un patógeno extracelular. Luego de la introducción de esta vacuna acelular se observó un aumento sostenido en el número de casos reportados,

determinando que la enfermedad sea declarada reemergente por la OMS. También se observó que la inmunidad generada por esta vacuna era de menor duración que la generada por la vacuna celular o la inducida por infección, y la protección contra la colonización aún menos efectiva. La introducción de esta vacuna generó un aumento significativo en la incidencia de infecciones asintomáticas [404], [487] y un corrimiento del rango etario de incidencia. Estudios posteriores mostraron que para evitar la colonización del tracto respiratorio es necesario inducir inmunidad celular con un perfil Th1/Th17 y células T residentes de memoria, además de la respuesta humoral Th2 [211], [302]. Esta necesidad de inmunidad celular y la existencia de infecciones asintomáticas sugiere que la infección de *B. pertussis* podría incluir una fase intracelular de persistencia. Nuestro grupo fue pionero en obtener evidencia de que *B. pertussis* puede comportarse como un patógeno intracelular facultativo [83], [273], [371]. Combinando diversas técnicas para evaluar la capacidad de este patógeno de sobrevivir en localización intracelular confirmamos que es capaz de mantenerse viable en neutrófilos, macrófagos y células de origen epitelial [83], [87], [273], [274], [371]. La sobrevida al encuentro con neutrófilos en ausencia de anticuerpos opsonizantes sugiere que esta bacteria es capaz de evitar la principal defensa de la inmunidad innata del hospedador [83]. Además de esto, en macrófagos se observó que *B. pertussis* es capaz de sobrevivir en localización intracelular durante tiempos relativamente prolongados, señalando que los mismos constituyen posibles nichos de persistencia para esta bacteria [273]. Estudios posteriores de proteómica comparativa permitieron comenzar a develar los mecanismos que permiten a *B. pertussis* adaptarse al entorno intracelular en estas células y algunos factores relevantes durante este proceso [274], [381]. También hay resultados de nuestro grupo y de otros que indican la capacidad de *B. pertussis* de sobrevivir en localización intracelular en células epiteliales del tracto respiratorio [257], [371], [378]. En este caso, los niveles de internalización inicial observados fueron mucho menores debido, probablemente, a que estas células no son fagocitos profesionales. Sin embargo, a pesar de ello, se recuperaron UFC de localización intracelular a tiempos largos post infección [371]. Como se menciona previamente, la existencia de estos nichos intracelulares podría explicar en parte la ineficiencia de las estrategias de control actuales y podría sentar las bases para el diseño de estrategias más exitosas que logren disminuir la circulación del patógeno.

Durante los últimos años se ha acumulado evidencia que indica que varios patógenos respiratorios persistentes y de difícil erradicación, previamente considerados exclusivamente extracelulares, poseen estadios intracelulares durante sus procesos infecciosos y que estos estadios podrían ser la base de su persistencia [375], [376], [377], [397]. A pesar de que

existían indicios de que *B. pertussis* también podría tener un comportamiento similar, esta posibilidad no se ha explorado en profundidad. Los estudios tendientes a investigar esta posibilidad, llevados a cabo principalmente por nuestro grupo de investigación, fueron realizados en su mayoría con células inmunes. En este trabajo de Tesis se abordó el estudio de la infección intracelular de *B. pertussis* en células epiteliales respiratorias, el otro tipo celular relevante en el sitio de infección de este patógeno. En los trabajos previos en los que se estudiaron las posibles infecciones intracelulares de *B. pertussis* en células epiteliales se utilizaron modelos de epitelio pulmonar no polarizados y que no presentan función de barrera [369], [370], [371], que es el gran obstáculo que los patógenos encuentran en este sitio de infección.

La primera etapa de este trabajo se orientó a la obtención de un mejor modelo para estudiar esta interacción que incluyera células polarizadas con uniones estrechas formadas en la conformación de una barrera epitelial. Una vez establecido el modelo se estudió la interacción de *B. pertussis* con el mismo. Se observó por primera vez que *B. pertussis* presenta un patrón de adhesión bacteriano dirigido hacia las uniones estrechas presentes entre las células epiteliales, mediado principalmente por la adhesina bacteriana FHA, confirmando el rol central de esta adhesina en el proceso infeccioso de la bacteria y sugiriendo que las uniones estrechas son blanco principal de este patógeno durante la interacción con el epitelio. Se observó que luego de esta adhesión inicial, *B. pertussis* es capaz de vulnerar la integridad de las uniones estrechas a través de CyaA. Los mecanismos de intoxicación de CyaA han sido estudiados principalmente con células inmunes en las que se une al receptor de superficie CD11b (CR3) [71] y transloca su dominio catalítico que induce la producción de cantidades suprafisiológicas del segundo mensajero cAMP [72]. Esta intoxicación interfiere con las actividades bactericidas de estas células inmunes como la producción de especies reactivas de oxígeno en neutrófilos [72], [85], [267], [268] y la producción de especies reactivas de nitrógeno en macrófagos [85]. También se demostró que CyaA es capaz de revertir el estado de maduración de los macrófagos, desdiferenciándolos a monocitos [84] y profundizando la interferencia de la toxina con el montaje de la respuesta inmune del hospedador contra *B. pertussis*. Si bien no está documentada la expresión del receptor CD11b en células epiteliales, en estudios llevados a cabo con CyaA pura se observó que esta toxina es capaz de unirse a estas células e intoxicarlas [93], [94], [405], [488]. Esta intoxicación lleva a la modulación de la expresión de genes relacionados con compuestos antimicrobianos [93], y a la pérdida de la adhesión intercelular [374], [488] y la función de barrera [93]. Los resultados de este trabajo de Tesis indican que CyaA secretada por las bacterias en el sitio de

infección tiene el mismo efecto que la CyaA pura y vulnera la barrera epitelial pulmonar durante la infección, además del ya conocido rol central en la patogénesis y en la inmunomodulación de células de la respuesta inmune [489], [490].

Los resultados de este estudio también indicaron que *B. pertussis* interactúa de manera preferencial con la membrana basolateral de células epiteliales polarizadas a través de FHA, observándose una mayor adhesión y una internalización más eficiente a través de esta membrana. Esta preferencia por la membrana basolateral también se ha observado en otros patógenos [348], [350], [412], [413] y sugiere que esta membrana está enriquecida en componentes que funcionan como receptores para diversos patógenos bacterianos. En el caso de *B. pertussis*, la existencia de varios dominios de unión presentes en FHA dificulta la identificación de un ligando particular en la membrana basolateral del hospedador. Los ensayos destinados a acotar las posibles opciones indican que la adhesión inicial a la membrana basolateral podría deberse a la interacción entre FHA y proteoglicanos sulfatados que poseen una mayor abundancia en la membrana basolateral [350] y también están presentes en balsas lipídicas [436]. La mayor internalización, por su parte, podría estar mediada por la interacción entre FHA y la integrina $\alpha_5\beta_1$ [104], cuya expresión es mayor también en esta membrana [437], [438]. La acción de CyaA sobre las uniones estrechas garantizaría que *B. pertussis* tenga acceso a la membrana basolateral durante la infección de un epitelio respiratorio sano con uniones estrechas funcionales. Otro aspecto importante de este efecto de CyaA sobre las uniones estrechas es que podría, además, facilitar eventuales sobreinfecciones con patógenos oportunistas presentes en el sitio de infección, y el posible desarrollo de una comorbilidad que podría complicar el cuadro clínico del hospedador. Si bien este estudio se llevó a cabo con células epiteliales bronquiales, estudios previos llevados a cabo con CyaA pura demostraron que esta toxina es capaz de intoxicar células del epitelio nasal y traqueal [94], [257], por lo que podría esperarse un efecto similar al encontrado en este estudio en otros sitios del tracto respiratorio durante la colonización de *B. pertussis*.

Los resultados obtenidos con este modelo, que representa mejor el epitelio respiratorio con el que *B. pertussis* interactúa durante la infección, mostraron niveles de internalización y supervivencia considerablemente mayores que los obtenidos previamente empleando células de línea de origen epitelial sin polarizar [369], [370], [371]. Una conclusión potencialmente relevante para la epidemiología de la enfermedad es que, visto el alto nivel de internalización y supervivencia en las células bronquiales, la importancia del epitelio respiratorio del hospedador como un nicho intracelular de persistencia, y su contribución a la continua circulación de la bacteria, podrían haber sido previamente subestimadas.

En este trabajo de Tesis también se estudió la adaptación de *B. pertussis* al interior de las células epiteliales mediante el análisis del proteoma de bacterias aisladas de localización intracelular en distintos momentos posteriores a la infección. Dado que investigaciones anteriores habían examinado la evolución del proteoma de esta bacteria durante la infección intracelular de células inmunes, en este estudio se compararon los procesos de adaptación a estos dos tipos celulares. Dicha comparación indica que la adaptación al entorno intracelular epitelial requiere modificaciones de otro tipo y sugiere que este entorno es menos exigente que el entorno intracelular de una célula inmune. Se observaron variaciones en la abundancia de unas 150 proteínas entre las bacterias en localización intracelular epitelial y el control extracelular en este estudio, mientras que se detectaron en unas 300 entre el entorno intracelular de macrófagos y el control extracelular [274]. En ambos casos las bacterias modificaron principalmente la abundancia de proteínas relacionadas con procesos metabólicos evidenciando las notorias modificaciones en la disponibilidad de nutrientes entre el medio de cultivo en la condición control y el entorno intracelular. Las modificaciones del proteoma observadas en este estudio indican que *B. pertussis* disminuye su tasa metabólica general y sugieren que el fenotipo intracelular podría ser el de un estado persistor. En este fenotipo hay una desaceleración o detención de varios procesos metabólicos que posibilitan la supervivencia de un patógeno en entornos hostiles [464], [474]. Ya que este fenotipo se revierte al cesar la condición de hostilidad, la persistencia intracelular podría constituir una etapa de la infección que se alterne con otra de proliferación en localización extracelular. Teniendo esto en cuenta, el estudio de los mecanismos de egreso de *B. pertussis* podría aportar conocimientos relevantes para la patogénesis de la bacteria. Estos mecanismos pueden dividirse principalmente entre mecanismos líticos y no líticos, diferenciándose porque los primeros comprometen la integridad de la membrana plasmática de la célula hospedadora. A su vez, los patógenos que egresan pueden provenir de ubicaciones vacuolares, es decir, rodeados por una membrana del hospedador, o del citosol. Las imágenes de microscopía electrónica de *B. pertussis* internalizada en células epiteliales muestran que esta bacteria se encuentra rodeada de membrana endosomal [369], [370] y en los ensayos que demostraron la repoblación del medio extracelular no se detectó la lisis de las células [371]. Se requieren más estudios para evaluar el tipo de egreso de *B. pertussis*, pero en base a estas observaciones podría especularse que ocurra desde compartimientos vacuolares a través de un proceso no lítico. Este tipo de mecanismo fue previamente descrito para patógenos como *Legionella pneumophila* [491], *Porphyromonas gingivalis* [492], *Escherichia coli* uropatogénica [493] y *Chlamydia* [494].

Entre las diferencias encontradas entre el entorno intracelular epitelial y el de macrófagos está la adquisición de algunos nutrientes esenciales para la supervivencia. Los resultados de este trabajo de Tesis sugieren que la fuente de hierro en localización intracelular epitelial difiere de la utilizada por *B. pertussis* en macrófagos. Los transportadores de hierro BfrD, BfrE e IRP1-3 relevantes en la interacción con la célula inmune, no están involucrados en la capacidad de supervivencia en células epiteliales, aunque están expresados en el fenotipo intracelular. *B. pertussis* posee varios mecanismos de adquisición de hierro que pueden expresarse y ejercer su función en simultáneo e incluso compensar unos la ausencia de otros [236], [469], [470], [471], [472], [473]. Además de BfrD, BfrE e IRP1-3, en este estudio se encontró expresado en localización intracelular al receptor de membrana externa FauA, que transporta al sideróforo alcaligina conjugada con hierro a través de la membrana en un proceso mediado por el sistema TonB. También se detectó aumentada la expresión del receptor de sideróforos putativo BrfB (BP2016), dependiente del sistema TonB. Una vez internalizados a través de la membrana externa, el complejo sideróforo-hierro es transportado del periplasma al citoplasma a través de la membrana interna por el receptor AfuA cuya expresión también se detectó en este estudio. Tanto FauA, como BrfB y AfuA podrían estar involucradas en la adquisición de hierro de bacterias residiendo dentro de células epiteliales. Hacen falta otros estudios para explorar estas posibilidades. Además de evidenciar las diferencias entre los dos nichos intracelulares, estos resultados dan cuenta de las variadas estrategias que posee *B. pertussis* para adquirir este nutriente esencial en localización intracelular. Esta variedad e incluso redundancia en las estrategias de adquisición de hierro se ha descrito previamente en patógenos intracelulares como *Shigella flexneri* [495], *Francisella tularensis* [496] y *Yersinia pestis* [497].

Además de ser capaz de adquirir los nutrientes de las fuentes disponibles en el hospedador, un patógeno en localización intracelular debe ser capaz de sobrevivir a los mecanismos bactericidas del mismo. *B. pertussis* posee varios factores que le permiten neutralizar estos efectos y persistir en condiciones de estrés, aunque no se observó la inducción de ninguno en localización intracelular. Las toxinas CyaA y PT, ambas expresadas en el entorno intracelular epitelial, modulan la actividad bactericida en macrófagos, promoviendo la sobrevida intracelular de la bacteria [87], [88]. Podría ser esperable, entonces, que el efecto inmunomodulador de estas toxinas sobre los mecanismos bactericidas de las células epiteliales explique que no se induzcan mecanismos de defensa en *B. pertussis*. Sin embargo, a diferencia de lo observado en células inmunes, la ausencia de estas toxinas no determinó una disminución de la sobrevida intracelular en células epiteliales. La ausencia de

efecto observada en los mutantes defectivos simples no permite descartar un efecto compensatorio entre ellas y que la presencia de sólo una sea suficiente para ejercer un efecto sobre la célula hospedadora. Por esta razón se realizaron ensayos empleando una cepa doble mutante, defectiva en ambas toxinas, recientemente obtenida en el laboratorio. Resultados preliminares mostraron que incluso en ausencia de ambas toxinas, la sobrevivencia de *B. pertussis* no disminuye respecto a la sobrevivencia de la cepa salvaje. Mas aún, en estos estudios se recuperó un número significativamente mayor de UFC de la cepa mutante defectiva en ambas toxinas a tiempos largos post infección. Este resultado, sugiere que estas toxinas no ejercen un efecto modulador importante en el interior de la célula epitelial y que la falta de agresividad en los mecanismos bactericidas de esta célula no se debe a que estén modulados por las toxinas de la bacteria, sino que son naturalmente leves. Esta mayor permisividad del nicho intracelular epitelial en comparación con la del nicho intracelular que proveen los macrófagos puede resultar de gran relevancia para la persistencia de la bacteria teniendo en cuenta el número considerablemente mayor de células epiteliales presentes en el sitio de infección.

En este trabajo de Tesis se estudiaron las modificaciones en la expresión de las proteínas de *B. pertussis* durante el proceso de infección intracelular en células epiteliales. Según se discutió en el Capítulo 4, una forma complementaria de avanzar en la comprensión de esta compleja interacción patógeno-hospedador es estudiando la respuesta de la célula eucariota. Si bien existen estudios en que se evaluó la respuesta de las células epiteliales a la infección por *B. pertussis*, estos se limitaron al estudio de la secreción de citoquinas y quimiocinas por ELISA [93], [281], [282], [372], o al análisis global a nivel transcriptómico, pero a tiempos cortos únicamente [281], [372]. Además de los tiempos de muestreo cortos, estos estudios no eliminan las bacterias infectantes, implicando que ninguno evalúa el desarrollo de la infección intracelular. Por esta razón, el estudio de este trabajo de Tesis se complementa con otro tipo de estudio, actualmente en desarrollo, en el que se prevé evaluar el proteoma de las células infectadas con *B. pertussis* tanto a las 5 horas como a las 48 horas post infección, tal como se evaluó el proteoma bacteriano en este trabajo. Los resultados indican que en el modelo de infección utilizado sólo un porcentaje de las células poseen bacterias en localización intracelular. Esto significa que al analizar la respuesta de todas las células, el resultado se deriva de la contribución tanto de las células con bacterias en localización intracelular como de las células sin bacterias en esa localización. Esto genera resultados poco claros, ya que provienen de una respuesta promedio que diluye la señal de las células infectadas. Es por eso que en este nuevo estudio se planea emplear citometría de flujo

para separar las células infectadas de las que no tienen bacterias en localización intracelular. Esto permitirá evaluar en simultáneo el efecto que tiene la presencia de *B. pertussis* en la célula infectada y el efecto que tiene el entorno de infección sobre las células que no están infectadas. El mismo sistema de separación se empleará para intentar mejorar la calidad de las muestras de bacterias aisladas del espacio intracelular partiendo de una población enriquecida en células infectadas que permita obtener muestras bacterianas con menos contaminación de proteínas eucariotas. La obtención de muestras de proteína bacteriana con mejor calidad y menos variabilidad podría revelar diferencias en la evolución del proteoma bacteriano que no se hayan detectado en este estudio.

En resumen, los resultados presentados en este trabajo de Tesis muestran que *B. pertussis* es capaz de vulnerar la barrera epitelial respiratoria y establecer un nicho de persistencia intracelular en células de la misma. El proceso iniciaría con la adhesión y la ruptura de las uniones estrechas a través de CyaA. Esta ruptura promovería la adhesión y la internalización a través de la membrana basolateral y, una vez internalizada, *B. pertussis* se mantendría viable probablemente en un estado persistor en un entorno intracelular más permisivo que el de los macrófagos, previamente postulados como nicho intracelular para este patógeno. A partir de resultados previos [100], [373] podría especularse que luego de la interacción inicial de *B. pertussis* con el tracto respiratorio superior, la bacteria se disemina hacia el epitelio bronquial. Estudios anteriores [372] sugieren que las células epiteliales sólo inducen la secreción de IL-6 e IL-8 como respuesta a esta infección, aunque las células inmunes presentes en el epitelio podrían secretar citoquinas que monten la respuesta inmune. Esta respuesta reclutaría y activaría células inmunes que también retroalimentarían el montaje de la respuesta. Sin embargo, *B. pertussis* es capaz de modular la activación de las células inmunes a través de sus toxinas [72], [85], [87], [150], [267], [268] y sobrevivir a la interacción innata con neutrófilos y con macrófagos evitando ser eliminada del sitio de infección. Una particularidad de los macrófagos que resulta relevante para el desarrollo de la infección y el montaje de la respuesta del hospedador es la capacidad de los mismos de polarizar su fenotipo hacia distintos perfiles denominados M1 y M2 [275]. No está completamente caracterizado qué tipo de fenotipo se induciría en el entorno de infección de *B. pertussis*, pero un perfil inmune del tipo Th2 que se induciría luego de la infección en individuos vacunados con la vacuna acelular induciría un perfil del tipo M2 [87]. Resultados previos de nuestro grupo indican que, si bien este patógeno es capaz de sobrevivir en localización intracelular en ambos fenotipos, el nivel de sobrevida intracelular en los de tipo M2 es mayor [276]. Esto sugiere que estas células inmunes también podrían constituir un

nicho intracelular transitorio durante la infección y, debido a la circulación de los mismos, podrían incluso diseminar la infección de *B. pertussis* en el organismo en un mecanismo del tipo caballo de Troya. Al no ser completamente eliminada en el epitelio, *B. pertussis* podría acceder al espacio intracelular epitelial donde es capaz de persistir, pudiendo alternar este estadio de persistencia intracelular con etapas de persistencia en localización extracelular en forma de *biofilm* [263] y/o con etapas de proliferación en esta localización cuando las condiciones lo permitan. Estos distintos mecanismos podrían ocurrir en simultáneo o en distintos momentos del ciclo infeccioso contribuyendo a la persistencia del patógeno en el hospedador y explicando las dificultades para controlar las infecciones por *B. pertussis*. Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis sugieren que, además de las características ya definidas en otros estudios, una vacuna debe prevenir y/o eliminar las infecciones intracelulares en la barrera epitelial respiratoria para ser efectiva en el control de la infección y la circulación del patógeno.

Bibliografia

- [1] S. Mattoo and J. D. Cherry, “Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies.,” *Clin Microbiol Rev*, vol. 18, no. 2, pp. 326–382, Apr. 2005, doi: 10.1128/CMR.18.2.326-382.2005.
- [2] G. Eldering and P. Kendrick, “*Bacillus para-pertussis*: a species resembling both *Bacillus pertussis* and *Bacillus bronchisepticus* but identical with neither.,” *J Bacteriol*, vol. 35, pp. 561–572, 1937.
- [3] N. Ferry, “A preliminary report of the bacterial findings in canine distemper,” *American Veterinary Review*, vol. 37, pp. 499–504, 1910.
- [4] R. S. Weyant *et al.*, “*Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia,” *J Clin Microbiol*, vol. 33, no. 1, pp. 1–7, Jan. 1995, doi: 10.1128/jcm.33.1.1-7.1995.
- [5] P. VANDAMME *et al.*, “*Bordetella trematum* sp. nov., Isolated from Wounds and Ear Infections in Humans, and Reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983,” *Int J Syst Bacteriol*, vol. 46, no. 4, pp. 849–858, Oct. 1996, doi: 10.1099/00207713-46-4-849.
- [6] K. K. Soo, P. K. Ran, O. W. Sup, L. N. Yong, L. J. Ho, and S. Jae-Hoon, “New Species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii* sp. nov., Isolated from the Purulent Exudate of an Epidermal Cyst,” *J Clin Microbiol*, vol. 43, no. 5, pp. 2516–2519, May 2005, doi: 10.1128/jcm.43.5.2516-2519.2005.
- [7] F. von Wintzingerode, A. Schattke, R. A. Siddiqui, U. Rösick, U. B. Göbel, and R. Gross, “*Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*.,” *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 51, no. 4, pp. 1257–1265, Jul. 2001, doi: 10.1099/00207713-51-4-1257.
- [8] P. A. Vandamme *et al.*, “*Bordetella bronchialis* sp. nov., *Bordetella flabilis* sp. nov. and *Bordetella sputigena* sp. nov., isolated from human respiratory specimens, and reclassification of *Achromobacter sediminum* Zhang *et al.* 2014 as *Verticillium sediminum* gen. nov., comb. nov.,” *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 65, no. Pt_10, pp. 3674–3682, Oct. 2015, doi: 10.1099/ijsem.0.000473.
- [9] B. T. Cookson *et al.*, “Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, ‘*B. hinzii*,’” *J Clin Microbiol*, vol. 32, no. 10, pp. 2569–2571, 1994, doi: 10.1128/jcm.32.10.2569-2571.1994.
- [10] K. Kersters *et al.*, “*Bordetella avium* sp. nov., Isolated from the Respiratory Tracts of Turkeys and Other Birds,” *Int J Syst Bacteriol*, vol. 34, no. 1, pp. 56–70, Jan. 1984, doi: 10.1099/00207713-34-1-56.
- [11] Y. V Ivanov *et al.*, “Identification and taxonomic characterization of *Bordetella pseudohinzii* sp. nov. isolated from laboratory-raised mice,” *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 66, no. 12, pp. 5452–5459, 2016, doi: 10.1099/ijsem.0.001540.
- [12] N. Tazato, Y. Handa, M. Nishijima, R. Kigawa, C. Sano, and J. Sugiyama, “Novel environmental species isolated from the plaster wall surface of mural paintings in the Takamatsuzuka tumulus: *Bordetella muralis* sp. nov., *Bordetella tumulicola* sp. nov.

- and *Bordetella tumbae* sp. nov.,” *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 65, no. Pt_12, pp. 4830–4838, Dec. 2015, doi: 10.1099/ijsem.0.000655.
- [13] I. Hamidou Soumana, B. Linz, and E. T. Harvill, “Environmental Origin of the Genus *Bordetella*,” *Front Microbiol*, vol. 8, 2017, [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00028>
- [14] B. Linz, L. Ma, I. Rivera, and E. T. Harvill, “Genotypic and phenotypic adaptation of pathogens: lesson from the genus *Bordetella*,” *Curr Opin Infect Dis*, vol. 32, no. 3, 2019, [Online]. Available: https://journals.lww.com/co-infectiousdiseases/fulltext/2019/06000/genotypic_and_phenotypic_adaptation_of_pathogens_.8.aspx
- [15] B. Linz *et al.*, “Acquisition and loss of virulence-associated factors during genome evolution and speciation in three clades of *Bordetella* species,” *BMC Genomics*, vol. 17, no. 1, p. 767, 2016, doi: 10.1186/s12864-016-3112-5.
- [16] J. Parkhill *et al.*, “Comparative analysis of the genome sequences of *bordetella pertussis*, *bordetella parapertussis* and *bordetella bronchiseptica*,” *Nat Genet*, vol. 35, no. 1, pp. 32–40, Sep. 2003, doi: 10.1038/ng1227.
- [17] A. Aslanabadi, K. Ghabili, K. Shad, M. Khalili, and M. M. Sajadi, “Emergence of whooping cough: notes from three early epidemics in Persia,” *Lancet Infect Dis*, vol. 15, no. 12, pp. 1480–1484, 2015, doi: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00292-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00292-3).
- [18] T. Cone Jr, “Whooping cough is first described as a disease sui generis by Baillou in 1649,” *Pediatrics*, vol. 46, no. 4, p. 522, Oct. 1970.
- [19] Bordet Jules, “Le microbe de la coqueluche,” *Annals Institute Pasteur Microbiology*, vol. 20, pp. 48–68, 1906.
- [20] N. H. Carbonetti, “Pertussis leukocytosis: mechanisms, clinical relevance and treatment,” *Pathog Dis*, vol. 74, no. 7, p. ftw087, Oct. 2016, doi: 10.1093/femspd/ftw087.
- [21] C. D. Paddock *et al.*, “Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 47, no. 3, pp. 328–338, Aug. 2008, doi: 10.1086/589753.
- [22] S. M. Altunajji, R. H. Kukuruzovic, N. C. Curtis, and J. Massie, “Antibiotics for whooping cough (pertussis),” *Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 3, 2007, doi: 10.1002/14651858.CD004404.pub3.
- [23] U. Heininger, K. Klich, K. Stehr, and J. D. Cherry, “Clinical Findings in *Bordetella pertussis* Infections: Results of a Prospective Multicenter Surveillance Study,” *Pediatrics*, vol. 100, no. 6, pp. e10–e10, Dec. 1997, doi: 10.1542/peds.100.6.e10.
- [24] U. HEININGER, J. D. CHERRY, T. ECKHARDT, C. LORENZ, P. CHRISTENSON, and K. STEHR, “Clinical and laboratory diagnosis of pertussis in the regions of a large vaccine efficacy trial in Germany,” *Pediatr Infect Dis J*, vol. 12, no. 6, 1993, [Online]. Available: https://journals.lww.com/pidj/fulltext/1993/06000/clinical_and_laboratory_diagnosis_of_pertussis_in.9.aspx
- [25] J. D. Cherry, E. Grimprel, N. Guiso, U. Heininger, and J. Mertsola, “Defining Pertussis Epidemiology: Clinical, Microbiologic and Serologic Perspectives,” *Pediatr Infect Dis J*, vol. 24, no. 5, 2005, [Online]. Available: https://journals.lww.com/pidj/fulltext/2005/05001/defining_pertussis_epidemiology_clinical,.5.aspx

- [26] S. S. Long, C. J. Welkon, and J. L. Clark, "Widespread Silent Transmission of Pertussis in Families: Antibody Correlates of Infection and Symptomatology," *J Infect Dis*, vol. 161, no. 3, pp. 480–486, Mar. 1990, doi: 10.1093/infdis/161.3.480.
- [27] S. S. LONG, H. W. LISCHNER, A. DEFOREST, and J. L. CLARK, "Serologic evidence of subclinical pertussis in immunized children," *Pediatr Infect Dis J*, vol. 9, no. 10, 1990, [Online]. Available: https://journals.lww.com/pidj/fulltext/1990/10000/serologic_evidence_of_subclinical_pertussis_in.3.aspx
- [28] J. L. Deen *et al.*, "Household Contact Study of Bordetella pertussis Infections," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 21, no. 5, pp. 1211–1219, Nov. 1995, doi: 10.1093/clinids/21.5.1211.
- [29] J. G. Deville *et al.*, "Frequency of Unrecognized Bordetella pertussis Infections in Adults," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 21, no. 3, pp. 639–642, Sep. 1995, doi: 10.1093/clinids/21.3.639.
- [30] J. A. Melvin, E. V Scheller, J. F. Miller, and P. A. Cotter, "Bordetella pertussis pathogenesis: current and future challenges," *Nat Rev Microbiol*, vol. 12, no. 4, pp. 274–288, 2014, doi: 10.1038/nrmicro3235.
- [31] C. A. Cummings, H. J. Bootsma, D. A. Relman, and J. F. Miller, "Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by Bordetella BvgAS," *J Bacteriol*, vol. 188, no. 5, pp. 1775–1785, Mar. 2006, doi: 10.1128/JB.188.5.1775-1785.2006.
- [32] K. B. Decker, T. D. James, S. Stibitz, and D. M. Hinton, "The Bordetella pertussis model of exquisite gene control by the global transcription factor BvgA," *Microbiology (N Y)*, vol. 158, no. 7, pp. 1665–1676, Jul. 2012, doi: 10.1099/mic.0.058941-0.
- [33] J. Herrou *et al.*, "Periplasmic domain of the sensor-kinase BvgS reveals a new paradigm for the Venus flytrap mechanism," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 40, pp. 17351–17355, Oct. 2010, doi: 10.1073/pnas.1006267107.
- [34] M. A. Uhl and J. F. Miller, "Autophosphorylation and phosphotransfer in the Bordetella pertussis BvgAS signal transduction cascade.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 91, no. 3, pp. 1163–1167, Feb. 1994, doi: 10.1073/pnas.91.3.1163.
- [35] R. Deora, H. J. Bootsma, J. F. Miller, and P. A. Cotter, "Diversity in the Bordetella virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene," *Mol Microbiol*, vol. 40, no. 3, pp. 669–683, May 2001, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02415.x>.
- [36] P. E. Boucher, K. Murakami, A. Ishihama, and S. Stibitz, "Nature of DNA binding and RNA polymerase interaction of the Bordetella pertussis BvgA transcriptional activator at the fha promoter," *J Bacteriol*, vol. 179, no. 5, pp. 1755–1763, Mar. 1997, doi: 10.1128/jb.179.5.1755-1763.1997.
- [37] P. E. Boucher, A. E. Maris, M.-S. Yang, and S. Stibitz, "The Response Regulator BvgA and RNA Polymerase α Subunit C-Terminal Domain Bind Simultaneously to Different Faces of the Same Segment of Promoter DNA," *Mol Cell*, vol. 11, no. 1, pp. 163–173, 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00007-8).

- [38] P. A. Cotter and A. M. Jones, “Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*,” *Trends Microbiol*, vol. 11, no. 8, pp. 367–373, 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00156-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00156-2).
- [39] P. E. Boucher and S. Stibitz, “Synergistic binding of RNA polymerase and BvgA phosphate to the pertussis toxin promoter of *Bordetella pertussis*,” *J Bacteriol*, vol. 177, no. 22, pp. 6486–6491, Nov. 1995, doi: 10.1128/jb.177.22.6486-6491.1995.
- [40] S. Stibitz and M. S. Yang, “Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the vir locus of *Bordetella pertussis*,” *J Bacteriol*, vol. 173, no. 14, pp. 4288–4296, Jul. 1991, doi: 10.1128/jb.173.14.4288-4296.1991.
- [41] P. A. Cotter and J. F. Miller, “A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* bvgS gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens,” *Mol Microbiol*, vol. 24, no. 4, pp. 671–685, May 1997, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3821741.x>.
- [42] E. Dupré, A. Wohlkonig, J. Herrou, C. Loch, F. Jacob-Dubuisson, and R. Antoine, “Characterization of the PAS domain in the sensor-kinase BvgS: mechanical role in signal transmission,” *BMC Microbiol*, vol. 13, no. 1, p. 172, 2013, doi: 10.1186/1471-2180-13-172.
- [43] A. Melton, Angela; Weiss, “Characterization of Environmental Regulators of *Bordetella pertussis*,” *Infect Immun*, vol. 61, no. 3, pp. 807–815, 1993, [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC302805/>
- [44] T. Merkel, C. Barros, and S. Stibitz, “Characterization of the bvgR Locus of *Bordetella pertussis*,” *J Bacteriol*, vol. 180, no. 7, pp. 1682–1690, Apr. 1998, doi: 10.1128/jb.180.7.1682-1690.1998.
- [45] T. Merkel, P. Boucher, Scott Stibitz, and V. Grippe, “Analysis of bvgR Expression in *Bordetella pertussis*,” *J Bacteriol*, vol. 185, no. 23, pp. 6902–6912, Dec. 2003, doi: 10.1128/jb.185.23.6902-6912.2003.
- [46] W. L. Veal-Carr and S. Stibitz, “Demonstration of differential virulence gene promoter activation in vivo in *Bordetella pertussis* using RIVET,” *Mol Microbiol*, vol. 55, no. 3, pp. 788–798, Feb. 2005, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04418.x>.
- [47] V. Scarlato, B. Aricò, A. Prugnola, and R. Rappuoli, “Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*,” *EMBO J*, vol. 10, no. 12, pp. 3971–3975, Dec. 1991, doi: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04967.x>.
- [48] C. R. Roy, J. F. Miller, and S. Falkow, “Autogenous regulation of the *Bordetella pertussis* bvgABC operon,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 87, no. 10, pp. 3763–3767, May 1990, doi: 10.1073/pnas.87.10.3763.
- [49] A. M. Jones, P. E. Boucher, C. L. Williams, S. Stibitz, and P. A. Cotter, “Role of BvgA phosphorylation and DNA binding affinity in control of Bvg-mediated phenotypic phase transition in *Bordetella pertussis*,” *Mol Microbiol*, vol. 58, no. 3, pp. 700–713, Nov. 2005, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04875.x>.
- [50] K. Moon *et al.*, “The BvgAS Regulon of *Bordetella pertussis*,” *mBio*, vol. 8, no. 5, Nov. 2017, doi: 10.1128/mBio.01526-17.
- [51] K. E. Stockbauer, B. Fuchslocher, J. F. Miller, and P. A. Cotter, “Identification and characterization of BipA, a *Bordetella* Bvg-intermediate phase protein,” *Mol Microbiol*, vol. 39, no. 1, pp. 65–78, Jan. 2001, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02191.x>.

- [52] D. de Gouw *et al.*, “The vaccine potential of *Bordetella pertussis* biofilm-derived membrane proteins.,” *Emerg Microbes Infect*, vol. 3, no. 8, p. e58, Aug. 2014, doi: 10.1038/emi.2014.58.
- [53] N. Sukumar, M. Mishra, G. P. Sloan, T. Ogi, and D. Rajendar, “Differential Bvg Phase-Dependent Regulation and Combinatorial Role in Pathogenesis of Two *Bordetella* Paralogs, BipA and BcfA,” *J Bacteriol*, vol. 189, no. 10, pp. 3695–3704, May 2007, doi: 10.1128/jb.00009-07.
- [54] N. Vergara-Irigaray, A. Chávarri-Martínez, J. Rodríguez-Cuesta, J. F. Miller, P. A. Cotter, and G. Martínez De Tejada, “Evaluation of the role of the Bvg intermediate phase in *Bordetella pertussis* during experimental respiratory infection,” *Infect Immun*, vol. 73, no. 2, pp. 748–760, Feb. 2005, doi: 10.1128/IAI.73.2.748-760.2005.
- [55] K. T. McCabe, M. Hernandez, and T. Merkel, “Regulation and function of the *Bordetella pertussis* aerosol tolerance genes.,” *9th International Bordetella Symposium*. 2010.
- [56] S. I. Morse and J. H. Morse, “Isolation and properties of the leukocytosis- and lymphocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis*.,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 143, no. 6, pp. 1483–1502, Jun. 1976, doi: 10.1084/jem.143.6.1483.
- [57] P. E. Stein, A. Boodhoo, G. D. Armstrong, S. A. Cockle, M. H. Klein, and R. J. Read, “The crystal structure of pertussis toxin,” *Structure*, vol. 2, no. 1, pp. 45–57, 1994, doi: [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00007-1).
- [58] C. Locht, L. Coutte, and N. Mielcarek, “The ins and outs of pertussis toxin,” *FEBS J*, vol. 278, no. 23, pp. 4668–4682, Dec. 2011, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08237.x>.
- [59] S. I. Kotob, S. Z. Hausman, and D. L. Burns, “Localization of the promoter for the *ptl* genes of *Bordetella pertussis*, which encode proteins essential for secretion of pertussis toxin,” *Infect Immun*, vol. 63, no. 8, pp. 3227–3230, Aug. 1995, doi: 10.1128/iai.63.8.3227-3230.1995.
- [60] A. el Bayâ, Brückener Kerstin, and A. M. Schmidt, “Nonrestricted Differential Intoxication of Cells by Pertussis Toxin,” *Infect Immun*, vol. 67, no. 1, pp. 433–435, Jan. 1999, doi: 10.1128/iai.67.1.433-435.1999.
- [61] R. Graf, J. Codina, and L. Birnbaumer, “Peptide inhibitors of ADP-ribosylation by pertussis toxin are substrates with affinities comparable to those of the trimeric GTP-binding proteins.,” *Mol Pharmacol*, vol. 42, no. 5, p. 760, Nov. 1992, [Online]. Available: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/42/5/760.abstract>
- [62] G. J. Spangrude, F. Sacchi, H. R. Hill, D. E. Van Epps, and R. A. Daynes, “Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin.,” *The Journal of Immunology*, vol. 135, no. 6, pp. 4135–4143, Dec. 1985, doi: 10.4049/jimmunol.135.6.4135.
- [63] C. Andreasen and N. Carbonetti, “Pertussis Toxin Inhibits Early Chemokine Production To Delay Neutrophil Recruitment in Response to *Bordetella pertussis* Respiratory Tract Infection in Mice,” *Infect Immun*, vol. 76, no. 11, pp. 5139–5148, Nov. 2008, doi: 10.1128/iai.00895-08.
- [64] G. S. Kirimanjeswara, L. M. Agosto, M. J. Kennett, O. N. Bjornstad, and E. T. Harvill, “Pertussis toxin inhibits neutrophil recruitment to delay antibody-mediated clearance of *Bordetella pertussis*,” *J Clin Invest*, vol. 115, no. 12, pp. 3594–3601, Dec. 2005, doi: 10.1172/JCI24609.

- [65] K. Scanlon, C. Skerry, and N. Carbonetti, "Role of Major Toxin Virulence Factors in Pertussis Infection and Disease Pathogenesis," in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1183, Springer, 2019, pp. 35–51. doi: 10.1007/5584_2019_403.
- [66] Y. Hiramatsu *et al.*, "The Mechanism of Pertussis Cough Revealed by the Mouse-Coughing Model," *mBio*, vol. 13, no. 2, Apr. 2022, doi: 10.1128/mbio.03197-21.
- [67] Y. Hiramatsu *et al.*, "Lipooligosaccharide, Vag8, and pertussis toxin of *Bordetella pertussis* cooperatively cause coughing in mice," *bioRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.12.25.424096.
- [68] J. Shumilla *et al.*, "*Bordetella pertussis* Infection of Primary Human Monocytes Alters HLA-DR Expression," *Infect Immun*, vol. 72, no. 3, pp. 1450–1462, Mar. 2004, doi: 10.1128/iai.72.3.1450-1462.2004.
- [69] J. van't Wout, W. N. Burnette, V. L. Mar, E. Rozdzinski, S. D. Wright, and E. I. Tuomanen, "Role of carbohydrate recognition domains of pertussis toxin in adherence of *Bordetella pertussis* to human macrophages," *Infect Immun*, vol. 60, no. 8, pp. 3303–3308, 1992, doi: 10.1128/iai.60.8.3303-3308.1992.
- [70] S. M. Hellwig, H. F. van Oirschot, W. L. Hazenbos, a B. van Sriel, F. R. Mooi, and J. G. van De Winkel, "Targeting to Fc γ receptors, but not CR3 (CD11b/CD18), increases clearance of *Bordetella pertussis*," *J Infect Dis*, vol. 183, no. 6, pp. 871–9, 2001, doi: 10.1086/319266.
- [71] P. Guermonprez *et al.*, "The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the α M β 2 integrin (CD11b/CD18)," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 193, no. 9, pp. 1035–1044, May 2001, doi: 10.1084/jem.193.9.1035.
- [72] D. L. Confer and J. W. Eaton, "Phagocyte Impotence Caused by an Invasive Bacterial Adenylate Cyclase," *Science (1979)*, vol. 217, no. 4563, pp. 948–950, Sep. 1982, doi: 10.1126/science.6287574.
- [73] A. Martino, E. Volpe, G. Auricchio, V. Colizzi, and P. M. Baldini, "Influence of Pertussis toxin on CD1a Isoform Expression in Human Dendritic Cells," *J Clin Immunol*, vol. 26, no. 2, pp. 153–159, 2006, doi: 10.1007/s10875-006-9009-3.
- [74] N. H. Carbonetti, "Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: Key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools," *Future Microbiology*, vol. 5, no. 3. pp. 455–469, Mar. 2010. doi: 10.2217/fmb.09.133.
- [75] M. Hackett, L. Guo, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, and E. L. Hewlett, "Internal Lysine Palmitoylation in Adenylate Cyclase Toxin from *Bordetella pertussis*," *Science (1979)*, vol. 266, no. 5184, pp. 433–435, Oct. 1994, doi: 10.1126/science.7939682.
- [76] P. Glaser, A. Danchin, D. Ladant, O. Barzu, and A. Ullman, "*Bordetella pertussis* adenylate cyclase: the gene and the protein," *Tokai J Exp Clin Med*, vol. 13, no. 239, 1988.
- [77] H. Sakamoto, J. Bellalou, P. Sebo, and D. Ladant, "*Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no. 19, pp. 13598–13602, 1992, doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42254-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42254-5).
- [78] M. El-Azami-El-Idrissi *et al.*, "Interaction of *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase with CD11b/CD18: ROLE OF TOXIN ACYLATION AND IDENTIFICATION OF THE MAIN INTEGRIN INTERACTION DOMAIN*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 40, pp. 38514–38521, 2003, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M304387200>.

- [79] I. Linhartová *et al.*, “RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism,” *FEMS Microbiol Rev*, vol. 34, no. 6, pp. 1076–112, Nov. 2010, doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00231.x.
- [80] D. Ladant, S. Michelson, R. Sarfati, A. M. Gilles, R. Predeleanu, and O. Bâzu, “Characterization of the Calmodulin-binding and of the Catalytic Domains of *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 264, no. 7, pp. 4015–4020, 1989, doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)84954-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)84954-2).
- [81] P. Glaser, A. Elmaoglou-Lazaridou, E. Krin, D. Ladant, O. Bâzu, and A. Danchin, “Identification of residues essential for catalysis and binding of calmodulin in *Bordetella pertussis* adenylate cyclase by site-directed mutagenesis,” *EMBO J*, vol. 8, no. 3, pp. 967–972, Mar. 1989, doi: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03459.x>.
- [82] C. A. Espinosa-Vinals *et al.*, “Almost half of the RTX domain is dispensable for complement receptor 3 binding and cell-invasive activity of the *Bordetella* adenylate cyclase toxin,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 297, no. 1, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.jbc.2021.100833.
- [83] Y. Lamberti, M. L. Perez Vidakovics, L. W. van der Pol, and M. E. Rodríguez, “Cholesterol-rich domains are involved in *Bordetella pertussis* phagocytosis and intracellular survival in neutrophils,” *Microb Pathog*, vol. 44, no. 6, pp. 501–511, 2008, doi: 10.1016/j.micpath.2008.01.002.
- [84] J. N. Ahmad *et al.*, “*Bordetella* adenylate cyclase toxin inhibits monocyte-to-macrophage transition and dedifferentiates human alveolar macrophages into monocyte-like cells,” *mBio*, vol. 10, no. 5, 2019, doi: 10.1128/mBio.01743-19.
- [85] O. Cerny, J. Kamanova, J. Masin, I. Bibova, K. Skopova, and P. Sebo, “*Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin Blocks Induction of Bactericidal Nitric Oxide in Macrophages through cAMP-Dependent Activation of the SHP-1 Phosphatase,” *The Journal of Immunology*, vol. 194, no. 10, pp. 4901–4913, May 2015, doi: 10.4049/jimmunol.1402941.
- [86] J. Kamanova *et al.*, “Adenylate Cyclase Toxin Subverts Phagocyte Function by RhoA Inhibition and Unproductive Ruffling,” *The Journal of Immunology*, vol. 181, no. 8, pp. 5587–5597, Oct. 2008, doi: 10.4049/jimmunol.181.8.5587.
- [87] H. A. Valdez, J. M. Oviedo, J. P. Gorgojo, Y. Lamberti, and M. E. Rodriguez, “*Bordetella pertussis* modulates human macrophage defense gene expression,” *Pathog Dis*, vol. 74, no. 6, Aug. 2016, doi: 10.1093/femspd/ftw073.
- [88] B. Blancá *et al.*, “*Bordetella pertussis* outer membrane vesicles as virulence factor vehicles that influence bacterial interaction with macrophages,” *Pathog Dis*, vol. 80, no. 1, 2022, doi: 10.1093/femspd/ftac031.
- [89] S. Paccani Rossi *et al.*, “Suppression of T-Lymphocyte Activation and Chemotaxis by the Adenylate Cyclase Toxin of *Bordetella pertussis*,” *Infect Immun*, vol. 76, no. 7, pp. 2822–2832, Jul. 2008, doi: 10.1128/iai.00200-08.
- [90] M. S. Goodwin and A. A. Weiss, “Adenylate cyclase toxin is critical for colonization and pertussis toxin is critical for lethal infection by *Bordetella pertussis* in infant mice,” *Infect Immun*, vol. 58, no. 10, pp. 3445–3447, Oct. 1990, doi: 10.1128/iai.58.10.3445-3447.1990.
- [91] M. Henderson *et al.*, “Contribution of *Bordetella* Filamentous Hemagglutinin and Adenylate Cyclase Toxin to Suppression and Evasion of Interleukin-17-Mediated

- Inflammation,” *Infect Immun*, vol. 80, no. 6, pp. 2061–2075, May 2012, doi: 10.1128/iai.00148-12.
- [92] J. Morova, R. Osicka, J. Masin, and P. Sebo, “RTX cytotoxins recognize 2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides,” 2008. [Online]. Available: www.pnas.org/cgi/content/full/
- [93] S. Hasan *et al.*, “Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin disrupts functional integrity of bronchial epithelial layers,” *Infect Immun*, vol. 86, no. 3, Mar. 2018, doi: 10.1128/IAI.00445-17.
- [94] J. C. Eby *et al.*, “Selective translocation of the Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin across the basolateral membranes of polarized epithelial cells,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 14, pp. 10662–10670, 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.089219.
- [95] S. Guédin *et al.*, “Novel Topological Features of FhaC, the Outer Membrane Transporter Involved in the Secretion of the Bordetella pertussis Filamentous Hemagglutinin*,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 39, pp. 30202–30210, 2000, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M005515200>.
- [96] J. Mazar and P. A. Cotter, “Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion,” *Mol Microbiol*, vol. 62, no. 3, pp. 641–654, Nov. 2006, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05392.x>.
- [97] F. Jacob-Dubuisson *et al.*, “Channel Formation by FhaC, the Outer Membrane Protein Involved in the Secretion of the Bordetella pertussis Filamentous Hemagglutinin*,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 53, pp. 37731–37735, 1999, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.53.37731>.
- [98] H. Hodak, B. Clantin, E. Willery, V. Villeret, C. Loch, and F. Jacob-Dubuisson, “Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate,” *Mol Microbiol*, vol. 61, no. 2, pp. 368–382, Jul. 2006, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05242.x>.
- [99] L. Coutte, R. Antoine, H. Drobecq, C. Loch, and F. Jacob-Dubuisson, “Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway,” *EMBO J*, vol. 20, no. 18, pp. 5040–5048, Sep. 2001, doi: <https://doi.org/10.1093/emboj/20.18.5040>.
- [100] L. Coutte *et al.*, “Role of Adhesin Release for Mucosal Colonization by a Bacterial Pathogen,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 197, no. 6, pp. 735–742, Mar. 2003, doi: 10.1084/jem.20021153.
- [101] K. Saukkonen, C. Cabellos, M. Burroughs, S. Prasad, and E. Tuomanen, “Integrin-mediated localization of Bordetella pertussis within macrophages: Role in pulmonary colonization,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 173, no. 5, pp. 1143–1149, 1991, doi: 10.1084/jem.173.5.1143.
- [102] Y. Ishibashi, S. Claus, and D. A. Relman, “Bordetella pertussis Filamentous Hemagglutinin Interacts with a Leukocyte Signal Transduction Complex and Stimulates Bacterial Adherence to Monocyte CR3 (CD11b/CD18),” 1994.
- [103] D. Relman, E. Tuomanen, S. Falkow, D. T. Golenbock, K. Saukkonen, and S. D. Wrigth, “Recognition of a Bacterial Adhesin by an Integrin: Macrophage CR3 (Q,&, CD11b/CD18) Binds Filamentous Hemagglutinin of Bordetella pertussis,” 1990.
- [104] Y. Ishibashi, D. A. Relman, and A. Nishikawa, “Invasion of human respiratory epithelial cells by Bordetella pertussis: Possible role for a filamentous hemagglutinin

- Arg-Gly-Asp sequence and $\alpha 5\beta 1$ integrin,” *Microb Pathog*, vol. 30, no. 5, pp. 279–288, 2001, doi: 10.1006/mpat.2001.0432.
- [105] S. M. Prasad, Y. Yin, E. Rodzinski, E. I. Tuomanen, and H. Robert Masure, “Identification of a Carbohydrate Recognition Domain in Filamentous Hemagglutinin from *Bordetella pertussis*,” 1993. [Online]. Available: <http://iai.asm.org/>
- [106] S. M. Julio, C. S. Inatsuka, J. Mazar, C. Dieterich, D. A. Relman, and P. A. Cotter, “Natural-host animal models indicate functional interchangeability between the filamentous haemagglutinins of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica* and reveal a role for the mature C-terminal domain, but not the RGD motif, during infection,” *Mol Microbiol*, vol. 71, no. 6, pp. 1574–1590, Mar. 2009, doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06623.x.
- [107] F. D. Menozzi, C. Gantiez, and C. Loch, “Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin,” *FEMS Microbiol Lett*, vol. 78, no. 1, pp. 59–64, 1991, doi: 10.1111/j.1574-6968.1991.tb04417.x.
- [108] J. H. Hannah, F. D. Menozzi, G. Renauld, C. Loch, and M. J. Brennan, “Sulfated Glycoconjugate Receptors for the *Bordetella pertussis* Adhesin Filamentous Hemagglutinin (FHA) and Mapping of the Heparin-Binding Domain on FHA Downloaded from,” 1994. [Online]. Available: <http://iai.asm.org/>
- [109] F. D. Menozzi, *et al.*, “Heparin-Inhibitable Lectin Activity of the Filamentous Hemagglutinin Adhesin of *Bordetella pertussis*,” 1994. [Online]. Available: <http://iai.asm.org/>
- [110] M. L. A. Perez Vidakovics, Y. Lamberti, W. L. Van Der Pol, O. Yantorno, and M. E. Rodriguez, “Adenylate cyclase influences filamentous haemagglutinin-mediated attachment of *Bordetella pertussis* to epithelial alveolar cells,” *FEMS Immunol Med Microbiol*, vol. 48, no. 1, pp. 140–147, 2006, doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00136.x.
- [111] C. Hoffman *et al.*, “*Bordetella* adenylate cyclase toxin interacts with filamentous haemagglutinin to inhibit biofilm formation in vitro,” *Mol Microbiol*, vol. 103, no. 2, pp. 214–228, Jan. 2017, doi: 10.1111/mmi.13551.
- [112] Y. Lamberti, J. A. Hayes, M. L. Perez Vidakovics, and M. E. Rodriguez, “Cholesterol-dependent attachment of human respiratory cells by *Bordetella pertussis*,” *FEMS Immunol Med Microbiol*, vol. 56, no. 2, pp. 143–150, 2009, doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00557.x.
- [113] N. Slaughter *et al.*, “The flotillins are integral membrane proteins in lipid rafts that contain TCR-associated signaling components: implications for T-cell activation,” *Clin Immunol*, vol. 108, no. 2, pp. 138–51, Aug. 2003, doi: 10.1016/s1521-6616(03)00097-4.
- [114] K. Haglund, I. Ivankovic-Dikic, N. Shimokawa, G. D. Kruh, and I. Dikic, “Recruitment of Pyk2 and Cbl to lipid rafts mediates signals important for actin reorganization in growing neurites,” *J Cell Sci*, vol. 117, no. Pt 12, pp. 2557–68, May 2004, doi: 10.1242/jcs.01148.
- [115] F. R. Mooi *et al.*, “Characterization of fimbrial subunits from *Bordetella* species,” *Microb Pathog*, vol. 2, no. 6, pp. 473–484, 1987, doi: [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(87\)90054-4](https://doi.org/10.1016/0882-4010(87)90054-4).
- [116] R. J. L. Willems *et al.*, “Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* fim/fha gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory

- genes involved in export of FHA,” *Mol Microbiol*, vol. 11, no. 2, pp. 337–347, Jan. 1994, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00314.x>.
- [117] R. Willems, A. Paul, H. G. van der Heide, A. R. ter Avest, and F. R. Mooi, “Fimbrial phase variation in *Bordetella pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation,” *EMBO J*, vol. 9, no. 9, pp. 2803–2809, Sep. 1990, doi: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07468.x>.
- [118] P. Pedroni *et al.*, “Cloning of a novel pilin-like gene from *Bordetella pertussis*: homology to the *fim2* gene,” *Mol Microbiol*, vol. 2, no. 4, pp. 539–543, Jul. 1988, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1988.tb00061.x>.
- [119] B. Riboli, P. Pedroni, A. Cuzzoni, G. Grandi, and F. de Ferra, “Expression of *Bordetella pertussis* fimbrial (*fim*) genes in *Bordetella bronchiseptica*: *fimX* is expressed at a low level and vir-regulated,” *Microb Pathog*, vol. 10, no. 5, pp. 393–403, 1991, doi: [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(91\)90084-N](https://doi.org/10.1016/0882-4010(91)90084-N).
- [120] L. F. Van Beek *et al.*, “Adaptation of *Bordetella pertussis* to the Respiratory Tract,” *Journal of Infectious Diseases*, vol. 217, no. 12, pp. 1987–1996, May 2018, doi: [10.1093/infdis/jiy125](https://doi.org/10.1093/infdis/jiy125).
- [121] W. Hazenbos, B. van den Berg, C. Geuijen, F. Mooi, and van Furth, “Binding of FimD on *Bordetella pertussis* to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases,” *J Immunol*, vol. 155, no. 15, pp. 3972–3978, Oct. 1995.
- [122] C. A. Geuijen, R. J. Willems, M. Bongaerts, J. Top, H. Gielen, and F. R. Mooi, “Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract,” *Infect Immun*, vol. 65, no. 10, pp. 4222–4228, Oct. 1997, doi: [10.1128/iai.65.10.4222-4228.1997](https://doi.org/10.1128/iai.65.10.4222-4228.1997).
- [123] F. R. Mooi *et al.*, “Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae,” *Microb Pathog*, vol. 12, no. 2, pp. 127–135, 1992, doi: [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(92\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0882-4010(92)90115-5).
- [124] W. L. W. Hazenbos, C. A. W. Geuijen, B. M. Van Den Berg, F. R. Mooi, and R. Van Furth, “*Bordetella pertussis* Fimbriae Bind to Human Monocytes via the Minor Fimbria) Subunit FimD,” 1995. [Online]. Available: <http://jid.oxfordjournals.org/>
- [125] M. E. Rodríguez, S. M. M. Hellwig, M. L. A. Pérez Vidakovics, G. A. M. Berbers, and J. G. J. Van De Winkel, “*Bordetella pertussis* attachment to respiratory epithelial cells can be impaired by fimbriae-specific antibodies,” *FEMS Immunol Med Microbiol*, vol. 46, no. 1, pp. 39–47, 2006, doi: [10.1111/j.1574-695X.2005.00001.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2005.00001.x).
- [126] J. Storsaeter, H. O. Hallander, L. Gustafsson, and P. Olin, “Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*,” *Vaccine*, vol. 16, no. 20, pp. 1907–1916, 1998, doi: [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00227-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00227-8).
- [127] J. D. Cherry, J. Gornbein, U. Heininger, and K. Stehr, “A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses,” *Vaccine*, vol. 16, no. 20, pp. 1901–1906, 1998, doi: [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00226-6](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00226-6).
- [128] S. Mattoo, M. H. Yuk, L. L. Huang, and J. F. Miller, “Regulation of type III secretion in *Bordetella*,” *Mol Microbiol*, vol. 52, no. 4, pp. 1201–1214, May 2004, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04053.x>.
- [129] T. J. Brickman, C. A. Cummings, S. Y. Liew, D. A. Relman, and S. K. Armstrong, “Transcriptional profiling of the iron starvation response in *Bordetella pertussis*

- Provides new insights into siderophore utilization and virulence gene expression,” *J Bacteriol*, vol. 193, no. 18, pp. 4798–4812, 2011, doi: 10.1128/JB.05136-11.
- [130] J. E. Galán, M. Lara-Tejero, T. C. Marlovits, and S. Wagner, “Bacterial Type III Secretion Systems: Specialized Nanomachines for Protein Delivery into Target Cells,” *Annu Rev Microbiol*, vol. 68, no. 1, pp. 415–438, Sep. 2014, doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155725.
- [131] E. M. Panina, S. Mattoo, N. Griffith, N. A. Kozak, M. H. Yuk, and J. F. Miller, “A genome-wide screen identifies a *Bordetella* type III secretion effector and candidate effectors in other species,” *Mol Microbiol*, vol. 58, no. 1, pp. 267–279, Oct. 2005, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04823.x>.
- [132] A. Kuwae, M. Ohishi, M. Watanabe, M. Nagai, and A. Abe, “BopB is a type III secreted protein in *Bordetella bronchiseptica* and is required for cytotoxicity against cultured mammalian cells,” *Cell Microbiol*, vol. 5, no. 12, pp. 973–983, Dec. 2003, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00341.x>.
- [133] A. Abe, R. Nishimura, and A. Kuwae, “*Bordetella* effector BopN is translocated into host cells via its N-terminal residues,” *Microbiol Immunol*, vol. 61, no. 6, pp. 206–214, Jun. 2017, doi: <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12489>.
- [134] N. Hisashi, K. Asaomi, M. Takeshi, and A. Akio, “The Type III Secreted Protein BopD in *Bordetella bronchiseptica* Is Complexed with BopB for Pore Formation on the Host Plasma Membrane,” *J Bacteriol*, vol. 186, no. 12, pp. 3806–3813, Jun. 2004, doi: 10.1128/jb.186.12.3806-3813.2004.
- [135] B. Medhekar, R. Shrivastava, S. Mattoo, M. Gingery, and J. F. Miller, “*Bordetella* Bsp22 forms a filamentous type III secretion system tip complex and is immunoprotective in vitro and in vivo,” *Mol Microbiol*, vol. 71, no. 2, pp. 492–504, Jan. 2009, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06543.x>.
- [136] A. Kuwae *et al.*, “BopC Is a Novel Type III Effector Secreted by *Bordetella bronchiseptica* and Has a Critical Role in Type III-dependent Necrotic Cell Death*,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 10, pp. 6589–6600, 2006, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M512711200>.
- [137] K. E. Stockbauer, A. K. Foreman-Wykert, and J. F. Miller, “*Bordetella* type III secretion induces caspase 1-independent necrosis,” *Cell Microbiol*, vol. 5, no. 2, pp. 123–132, Feb. 2003, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00260.x>.
- [138] C. T. French, E. M. Panina, S. H. Yeh, N. Griffith, D. G. Arambula, and J. F. Miller, “The *Bordetella* type III secretion system effector BteA contains a conserved N-terminal motif that guides bacterial virulence factors to lipid rafts,” *Cell Microbiol*, vol. 11, no. 12, pp. 1735–1749, Dec. 2009, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01361.x>.
- [139] I. Malcova, L. Bumba, F. Uljanic, D. Kuzmenko, J. Nedomova, and J. Kamanova, “Lipid binding by the N-terminal motif mediates plasma membrane localization of *Bordetella* effector protein BteA,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 296, p. 100607, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100607>.
- [140] J. Bayram *et al.*, “Cytotoxicity of the effector protein BteA was attenuated in *Bordetella pertussis* by insertion of an alanine residue,” *PLoS Pathog*, vol. 16, no. 8, pp. e1008512-, Aug. 2020, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008512>

- [141] K. Nagamatsu *et al.*, “Bordetella evades the host immune system by inducing IL-10 through a type III effector, BopN,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 206, no. 13, pp. 3073–3088, Dec. 2009, doi: 10.1084/jem.20090494.
- [142] M. H. Yuk, E. T. Harvill, P. A. Cotter, and J. F. Miller, “Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF- κ B activation by the Bordetella type III secretion system,” *Mol Microbiol*, vol. 35, no. 5, pp. 991–1004, Mar. 2000, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01785.x>.
- [143] M. H. Yuk, E. T. Harvill, and J. F. Miller, “The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in Bordetella bronchiseptica,” *Mol Microbiol*, vol. 28, no. 5, pp. 945–959, Jun. 1998, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00850.x>.
- [144] N. Fennelly *et al.*, “Bordetella pertussis Expresses a Functional Type III Secretion System That Subverts Protective Innate and Adaptive Immune Responses,” *Infect Immun*, vol. 76, no. 3, pp. 1257–1266, Mar. 2008, doi: 10.1128/iai.00836-07.
- [145] U. Ahuja *et al.*, “Differential regulation of type III secretion and virulence genes in Bordetella pertussis and Bordetella bronchiseptica by a secreted anti- σ factor,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 113, no. 9, pp. 2341–2348, Mar. 2016, doi: 10.1073/pnas.1600320113.
- [146] I. Henderson and J. Nataro, “Virulence Functions of Autotransporter Proteins,” *Infect Immun*, vol. 69, no. 3, pp. 1231–1243, Mar. 2001, doi: 10.1128/iai.69.3.1231-1243.2001.
- [147] P. Emsley, G. McDermott, I. G. Charles, N. F. Fairweather, and N. W. Isaacs, “Crystallographic Characterization of Pertactin, a Membrane-associated Protein from Bordetella pertussis,” *J Mol Biol*, vol. 235, no. 2, pp. 772–773, 1994, doi: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1029>.
- [148] J. D. Cherry, “Comparative efficacy of acellular pertussis vaccines: an analysis of recent trials,” *Pediatr Infect Dis J*, vol. 16, no. 4 Suppl, pp. S90-6, 1997, doi: 10.1097/00006454-199704001-00004.
- [149] S. M. M. Hellwig, M. E. Rodriguez, G. A. M. Berbers, J. G. J. Van De Winkel, and F. R. Mooi, “Crucial Role of Antibodies to Pertactin in Bordetella pertussis Immunity,” 2003. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/jid/article-abstract/188/5/738/851498>
- [150] M. E. Rodriguez, S. M. M. Hellwig, D. F. Hozbor, J. Leusen, W.-L. van der Pol, and J. G. J. van de Winkel, “Fc Receptor-Mediated Immunity Against Bordetella pertussis,” *The Journal of Immunology*, vol. 167, no. 11, pp. 6545–6551, 2001, doi: 10.4049/jimmunol.167.11.6545.
- [151] F. R. Mooi, “Bordetella pertussis and vaccination: The persistence of a genetically monomorphic pathogen,” *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 10, no. 1, pp. 36–49, 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.10.007>.
- [152] A. Zeddeman *et al.*, “Investigations into the emergence of pertactin-deficient Bordetella pertussis isolates in six European countries, 1996 to 2012,” *Euro Surveill*, vol. 19, no. 33, 2014.
- [153] V. Bouchez, D. Brun, T. Cantinelli, G. Dore, E. Njamkepo, and N. Guiso, “First report and detailed characterization of B. pertussis isolates not expressing pertussis toxin or pertactin,” *Vaccine*, vol. 27, no. 43, pp. 6034–6041, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.074>.

- [154] N. Otsuka *et al.*, “Prevalence and Genetic Characterization of Pertactin-Deficient *Bordetella pertussis* in Japan,” *PLoS One*, vol. 7, no. 2, pp. e31985-, Feb. 2012, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031985>
- [155] L. C. Pawloski *et al.*, “Prevalence and Molecular Characterization of Pertactin-Deficient *Bordetella pertussis* in the United States,” *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 21, no. 2, pp. 119–125, Feb. 2014, doi: 10.1128/CVI.00717-13.
- [156] B. Alex-Mikael, M. Jussi, G. Sophie, G. Nicole, B. Guy, and H. Qiushui, “Appearance of *Bordetella pertussis* Strains Not Expressing the Vaccine Antigen Pertactin in Finland,” *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 19, no. 10, pp. 1703–1704, Oct. 2012, doi: 10.1128/CVI.00367-12.
- [157] N. Hegerle *et al.*, “Evolution of French *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* isolates: increase of *Bordetellae* not expressing pertactin,” *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 18, no. 9, pp. E340–E346, 2012, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03925.x>.
- [158] T. M. Finn and L. A. Stevens, “Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant,” *Mol Microbiol*, vol. 16, no. 4, pp. 625–634, May 1995, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02425.x>.
- [159] R. C. Fernandez and A. A. Weiss, “Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus,” *Infect Immun*, vol. 62, no. 11, pp. 4727–4738, Nov. 1994, doi: 10.1128/iai.62.11.4727-4738.1994.
- [160] M. Noofeli, H. Bokhari, P. Blackburn, M. Roberts, J. G. Coote, and R. Parton, “BapC autotransporter protein is a virulence determinant of *Bordetella pertussis*,” *Microb Pathog*, vol. 51, no. 3, pp. 169–177, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.04.004>.
- [161] T. Finn and D. Amsbaugh, “Vag8, a *Bordetella pertussis* bvg-Regulated Protein,” *Infect Immun*, vol. 66, no. 8, pp. 3985–3989, Aug. 1998, doi: 10.1128/iai.66.8.3985-3989.1998.
- [162] M. Barnes and A. Weiss, “BrkA Protein of *Bordetella pertussis* Inhibits the Classical Pathway of Complement after C1 Deposition,” *Infect Immun*, vol. 69, no. 5, pp. 3067–3072, May 2001, doi: 10.1128/iai.69.5.3067-3072.2001.
- [163] E. S. Hovingh, M. Van Gent, H. J. Hamstra, M. Demkes, F. R. Mooi, and E. Pinelli, “Emerging *bordetella pertussis* strains induce enhanced signaling of human pattern recognition receptors tlr2, nod2 and secretion of il-10 by dendritic cells,” *PLoS One*, vol. 12, no. 1, Jan. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0170027.
- [164] N. Marr, N. R. Shah, R. Lee, E. J. Kim, and R. C. Fernandez, “*Bordetella pertussis* Autotransporter Vag8 Binds Human C1 Esterase Inhibitor and Confers Serum Resistance,” *PLoS One*, vol. 6, no. 6, pp. e20585-, Jun. 2011, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020585>
- [165] J. L. Cowell, E. L. Hewlett, and C. R. Manclark, “Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*,” *Infect Immun*, vol. 25, no. 3, pp. 896–901, Sep. 1979, doi: 10.1128/iai.25.3.896-901.1979.
- [166] Y. L. Zhang and R. D. Sekura, “Purification and characterization of the heat-labile toxin of *Bordetella pertussis*,” *Infect Immun*, vol. 59, no. 10, pp. 3754–3759, Oct. 1991, doi: 10.1128/iai.59.10.3754-3759.1991.

- [167] M. Masuda *et al.*, “Activation of Rho through a cross-link with polyamines catalyzed by Bordetella dermonecrotizing toxin,” *EMBO J*, vol. 19, no. 4, pp. 521–530, Feb. 2000, doi: <https://doi.org/10.1093/emboj/19.4.521>.
- [168] G. Schmidt, U.-M. Goehring, J. Schirmer, M. Lerm, and K. Aktories, “Identification of the C-terminal Part of Bordetella Dermonecrotic Toxin as a Transglutaminase for Rho GTPases*,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 45, pp. 31875–31881, 1999, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.31875>.
- [169] A. Fukui and Y. Horiguchi, “Bordetella Dermonecrotic Toxin Exerting Toxicity through Activation of the Small GTPase Rho,” *The Journal of Biochemistry*, vol. 136, no. 4, pp. 415–419, Oct. 2004, doi: 10.1093/jb/mvh155.
- [170] Y. Horiguchi *et al.*, “Bordetella bronchiseptica dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibers through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, no. 21, pp. 11623–11626, Oct. 1997, doi: 10.1073/pnas.94.21.11623.
- [171] T. Matsuzawa *et al.*, “Bordetella Dermonecrotic Toxin Undergoes Proteolytic Processing to Be Translocated from a Dynamin-related Endosome into the Cytoplasm in an Acidification-independent Manner*,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 4, pp. 2866–2872, 2004, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M310340200>.
- [172] Y. Horiguchi, “Escherichia coli cytotoxic necrotizing factors and Bordetella dermonecrotic toxin: the dermonecrosis-inducing toxins activating Rho small GTPases,” *Toxicon*, vol. 39, no. 11, pp. 1619–1627, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00149-0](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00149-0).
- [173] Y. Neo *et al.*, “Evidence for an intact polysaccharide capsule in Bordetella pertussis,” *Microbes Infect*, vol. 12, no. 3, pp. 238–245, 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.12.002>.
- [174] G. Lawson, “Modified technique for staining capsules of Hemophilus pertussis,” *J Lab Clin Med*, vol. 25, no. 4, pp. 435–438, 1940.
- [175] H. Jungnitz, N. P. West, M. J. Walker, G. S. Chhatwal, and C. A. Guzman-guzman-guzman, “A Second Two-Component Regulatory System of Bordetella bronchiseptica Required for Bacterial Resistance to Oxidative Stress, Production of Acid Phosphatase, and In Vivo Persistence Downloaded from,” 1998. [Online]. Available: <http://iai.asm.org/>
- [176] D. E. Comeau, K. Ikenaka, K. L. Tsung, and M. Inouye, “Primary characterization of the protein products of the Escherichia coli ompB locus: structure and regulation of synthesis of the OmpR and EnvZ proteins,” *J Bacteriol*, vol. 164, no. 2, pp. 578–584, Nov. 1985, doi: 10.1128/jb.164.2.578-584.1985.
- [177] S. I. Miller, A. M. Kukral, and J. J. Mekalanos, “A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls Salmonella typhimurium virulence,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 86, no. 13, pp. 5054–5058, Jul. 1989, doi: 10.1073/pnas.86.13.5054.
- [178] C. M. Alpuche Aranda, J. A. Swanson, W. P. Loomis, and S. I. Miller, “Salmonella typhimurium activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 89, no. 21, pp. 10079–10083, Nov. 1992, doi: 10.1073/pnas.89.21.10079.
- [179] T. H. Stenson, A. G. Allen, J. A. Al-Meer, D. Maskell, and M. S. Peppler, “Bordetella pertussis risA, but not risS, is required for maximal expression of Bvg-repressed

- genes,” *Infect Immun*, vol. 73, no. 9, pp. 5995–6004, Sep. 2005, doi: 10.1128/IAI.73.9.5995-6004.2005.
- [180] Q. Chen, V. Ng, J. M. Warfel, T. J. Merkel, and S. Stibitz, “Activation of Bvg-repressed genes in *Bordetella pertussis* by RisA requires cross talk from noncooperonic histidine kinase RisK,” *J Bacteriol*, vol. 199, no. 22, 2017, doi: 10.1128/JB.00475-17.
- [181] T. Cróinín, V. Grippe, and T. Merkel, “Activation of the vrg6 Promoter of *Bordetella pertussis* by RisA,” *J Bacteriol*, vol. 187, no. 5, pp. 1648–1658, Mar. 2005, doi: 10.1128/jb.187.5.1648-1658.2005.
- [182] M. A. Bone *et al.*, “*Bordetella* PlrSR regulatory system controls BvgAS activity and virulence in the lower respiratory tract,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 114, no. 8, pp. E1519–E1527, Feb. 2017, doi: 10.1073/pnas.1609565114.
- [183] J. Vogel and B. F. Luisi, “Hfq and its constellation of RNA,” *Nat Rev Microbiol*, vol. 9, no. 8, pp. 578–589, 2011, doi: 10.1038/nrmicro2615.
- [184] I. Bibova *et al.*, “The RNA chaperone Hfq is required for virulence of *bordetella pertussis*,” *Infect Immun*, vol. 81, no. 11, pp. 4081–4090, Nov. 2013, doi: 10.1128/IAI.00345-13.
- [185] I. Bibova *et al.*, “Transcriptional profiling of *bordetella pertussis* reveals requirement of RNA chaperone Hfq for type III secretion system functionality,” *RNA Biol*, vol. 12, no. 2, pp. 175–185, 2015, doi: 10.1080/15476286.2015.1017237.
- [186] J. Alvarez Hayes *et al.*, “Hfq modulates global protein pattern and stress response in *Bordetella pertussis*,” *J Proteomics*, vol. 211, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.jprot.2019.103559.
- [187] B. T. Cookson, A. N. Tyler, and W. E. Goldman, “Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*,” *Biochemistry*, vol. 28, no. 4, pp. 1744–1749, Feb. 1989, doi: 10.1021/bi00430a048.
- [188] R. S. Rosenthal, W. Nogami, B. T. Cookson, W. E. Goldman, and W. J. Folkening, “Major fragment of soluble peptidoglycan released from growing *Bordetella pertussis* is tracheal cytotoxin,” *Infect Immun*, vol. 55, no. 9, pp. 2117–2120, 1987, doi: 10.1128/iai.55.9.2117-2120.1987.
- [189] T. A. Flak and W. E. Goldman, “Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis,” *Cell Microbiol*, vol. 1, no. 1, pp. 51–60, 1999, doi: 10.1046/j.1462-5822.1999.00004.x.
- [190] T. A. Flak and W. E. Goldman, “Autotoxicity of Nitric Oxide in Airway Disease,” *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 154, no. 4_pt_2, pp. S202–S206, Oct. 1996, doi: 10.1164/ajrccm/154.4_Pt_2.S202.
- [191] A. Preston, R. Thomas, and D. Maskell, “Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* wlb LPS biosynthesis locus,” *Microb Pathog*, vol. 33, no. 3, pp. 91–95, 2002, doi: <https://doi.org/10.1006/mpat.2002.0511>.
- [192] G. Ayme *et al.*, “Biological activities of fragments derived from *Bordetella pertussis* endotoxin: isolation of a nontoxic, Shwartzman-negative lipid A possessing high adjuvant properties,” *Infect Immun*, vol. 27, no. 3, pp. 739–745, Mar. 1980, doi: 10.1128/iai.27.3.739-745.1980.
- [193] M. Watanabe, H. Takimoto, Y. Kumazawa, and K. Amano, “Biological properties of lipopolysaccharides isolated from *Bordetella*,” *Adv Exp Med Biol*, vol. 256, no. 1 990, pp. 589–591, 1990.

- [194] Y. Nakase, M. Tateisi, K. Sekiya, and T. Kasuga, "Chemical and Biological Properties of the Purified O Antigen of *Bordetella pertussis*," *Jpn J Microbiol*, vol. 14, no. 1, pp. 1–8, Jan. 1970, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1970.tb00485.x>.
- [195] P. B. Mann, D. Wolfe, E. Latz, D. Golenbock, A. Preston, and E. T. Harvill, "Comparative toll-like receptor 4-mediated innate host defense to *Bordetella* infection," *Infect Immun*, vol. 73, no. 12, pp. 8144–8152, Dec. 2005, doi: 10.1128/IAI.73.12.8144-8152.2005.
- [196] L. M. Schaeffer, F. X. McCormack, H. Wu, and A. A. Weiss, "Bordetella pertussis Lipopolysaccharide Resists the Bactericidal Effects of Pulmonary Surfactant Protein A," *The Journal of Immunology*, vol. 173, no. 3, pp. 1959–1965, Aug. 2004, doi: 10.4049/JIMMUNOL.173.3.1959.
- [197] C. L. Miller and W. B. Fletcher, "Severity of notified whooping cough.," *Br Med J*, vol. 1, no. 6002, pp. 117–119, Jan. 1976, doi: 10.1136/BMJ.1.6002.117.
- [198] M. Watanabe and M. Nagai, "Acellular pertussis vaccines in Japan: past, present and future," *Expert Rev Vaccines*, vol. 4, no. 2, pp. 173–184, Apr. 2005, doi: 10.1586/14760584.4.2.173.
- [199] Y. Sato and H. Sato, "Development of Acellular Pertussis Vaccines," *Biologicals*, vol. 27, no. 2, pp. 61–69, Jun. 1999, doi: 10.1006/BIOL.1999.0181.
- [200] Y. Sato, M. Kimura, and H. Fukumi, "Development of a pertussis component vaccine in Japan.," *Lancet*, vol. 1, no. 8369, pp. 122–6, Jan. 1984, doi: 10.1016/s0140-6736(84)90061-8.
- [201] C. M. Ausiello, F. Urbani, A. La Sala, R. Lande, and A. Cassone, "Vaccine- and antigen-dependent type 1 and type 2 cytokine induction after primary vaccination of infants with whole-cell or acellular pertussis vaccines," *Infect Immun*, vol. 65, no. 6, pp. 2168–2174, 1997, doi: 10.1128/IAI.65.6.2168-2174.1997.
- [202] M. Ryan *et al.*, "Distinct T-cell subtypes induced with whole cell and acellular pertussis vaccines in children," *Immunology*, vol. 93, no. 1, pp. 1–10, 1998, doi: 10.1046/J.1365-2567.1998.00401.X.
- [203] V. Dirix *et al.*, "Cytokine and antibody profiles in 1-year-old children vaccinated with either acellular or whole-cell pertussis vaccine during infancy," *Vaccine*, vol. 27, no. 43, pp. 6042–6047, Oct. 2009, doi: 10.1016/J.VACCINE.2009.07.075.
- [204] M. Ryan, L. Gothefors, J. Storsaeter, and K. Mills, "Bordetella pertussis-specific Th1/Th2 cells generated following respiratory infection or immunization with an acellular vaccine: comparison of the T cell cytokine profiles in infants and mice," *Dev Biol Stand.*, vol. 89, pp. 297–305, 1997.
- [205] K. Stehr *et al.*, "A comparative efficacy trial in Germany in infants who received either the Lederle/Takeda acellular pertussis component DTP (DTaP) vaccine, the Lederle whole-cell component DTP vaccine, or DT vaccine," *Pediatrics*, vol. 101, no. 1 Pt 1, pp. 1–11, Jan. 1998, doi: 10.1542/PEDS.101.1.1.
- [206] J. G. Liese *et al.*, "Efficacy of a two-component acellular pertussis vaccine in infants," *Pediatr Infect Dis J*, vol. 16, no. 11, pp. 1038–1044, Nov. 1997, doi: 10.1097/00006454-199711000-00007.
- [207] F. Simondon *et al.*, "A randomized double-blind trial comparing a two-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal," *Vaccine*, vol. 15, no. 15, pp. 1606–1612, Oct. 1997, doi: 10.1016/S0264-410X(97)00100-X.

- [208] H.-J. Schmitt *et al.*, “Efficacy of Acellular Pertussis Vaccine in Early Childhood After Household Exposure,” *JAMA*, vol. 275, no. 1, pp. 37–41, Jan. 1996, doi: 10.1001/JAMA.1996.03530250041024.
- [209] L. Gustafsson, H. O. Hallander, P. Olin, E. Reizenstein, and J. Storsaeter, “A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine,” *N Engl J Med*, vol. 334, no. 6, pp. 349–356, Feb. 1996, doi: 10.1056/NEJM199602083340602.
- [210] B. Trollfors *et al.*, “A placebo-controlled trial of a pertussis-toxoid vaccine,” *N Engl J Med*, vol. 333, no. 16, pp. 1045–1050, Oct. 1995, doi: 10.1056/NEJM199510193331604.
- [211] J. M. Warfel, L. I. Zimmerman, and T. J. Merkel, “Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 111, no. 2, pp. 787–792, 2014, doi: 10.1073/pnas.1314688110.
- [212] F. R. Mooi, N. A. T. Van Der Maas, and H. E. De Melker, “Pertussis resurgence: Waning immunity and pathogen adaptation - Two sides of the same coin,” *Epidemiology and Infection*, vol. 142, no. 4. Cambridge University Press, pp. 685–694, 2014. doi: 10.1017/S0950268813000071.
- [213] S. H. Yeh and C. A. M. Mink, “Shift in the Epidemiology of Pertussis Infection,” *Drugs 2006 66:6*, vol. 66, no. 6, pp. 731–741, Sep. 2012, doi: 10.2165/00003495-200666060-00001.
- [214] S. A. Halperin, “The control of pertussis--2007 and beyond,” *N Engl J Med*, vol. 356, no. 2, pp. 110–113, Jan. 2007, doi: 10.1056/NEJMP068288.
- [215] A. M. Wendelboe, A. Van Rie, S. Salmaso, and J. A. Englund, “Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination,” *Pediatr Infect Dis J*, vol. 24, no. 5 Suppl, May 2005, doi: 10.1097/01.INF.0000160914.59160.41.
- [216] N. K. Fry, S. Neal, T. G. Harrison, E. Miller, R. Matthews, and R. C. George, “Genotypic variation in the Bordetella pertussis virulence factors pertactin and pertussis toxin in historical and recent clinical isolates in the United Kingdom,” *Infect Immun*, vol. 69, no. 9, pp. 5520–8, Sep. 2001, doi: 10.1128/IAI.69.9.5520-5528.2001.
- [217] M. Fingermann *et al.*, “Differences of circulating Bordetella pertussis population in Argentina from the strain used in vaccine production,” *Vaccine*, vol. 24, no. 17, pp. 3513–3521, Apr. 2006, doi: 10.1016/J.VACCINE.2006.02.026.
- [218] D. Hozbor *et al.*, “Pertussis epidemiology in Argentina: trends over 2004-2007,” *Journal of Infection*, vol. 59, no. 4. pp. 225–231, Oct. 2009. doi: 10.1016/j.jinf.2009.07.014.
- [219] K. D. Forsyth *et al.*, “New pertussis vaccination strategies beyond infancy: recommendations by the global pertussis initiative,” *Clin Infect Dis*, vol. 39, no. 12, pp. 1802–1809, Dec. 2004, doi: 10.1086/426020.
- [220] A. Van Rie, A. M. Wendelboe, and J. A. Englund, “Role of maternal pertussis antibodies in infants,” *Pediatr Infect Dis J*, vol. 24, no. 5 Suppl, May 2005, doi: 10.1097/01.INF.0000160915.93979.8F.
- [221] F. R. Mooi and S. C. de Greeff, “The case for maternal vaccination against pertussis,” *Lancet Infect Dis*, vol. 7, no. 9, pp. 614–624, Sep. 2007, doi: 10.1016/S1473-3099(07)70113-5.

- [222] S. A. Gall, J. Myers, and M. Pichichero, “Maternal immunization with tetanus–diphtheria–pertussis vaccine: effect on maternal and neonatal serum antibody levels,” *Am J Obstet Gynecol*, vol. 204, no. 4, pp. 334.e1–334.e5, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.ajog.2010.11.024.
- [223] C. Vizzotti *et al.*, “Maternal immunization in Argentina: A storyline from the prospective of a middle income country,” *Vaccine*, vol. 33, no. 47, pp. 6413–6419, Nov. 2015, doi: 10.1016/J.VACCINE.2015.07.109.
- [224] K. H. G. Mills, “Immunity to *Bordetella pertussis*,” 2001.
- [225] J. M. Warfel and T. J. Merkel, “*Bordetella pertussis* infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates,” *Mucosal Immunol*, vol. 6, no. 4, pp. 787–796, Jul. 2013, doi: 10.1038/mi.2012.117.
- [226] D. T. Boehm *et al.*, “Evaluation of Adenylate Cyclase Toxoid Antigen in Acellular Pertussis Vaccines by Using a *Bordetella pertussis* Challenge Model in Mice,” *Infect Immun*, vol. 86, no. 10, Oct. 2018, doi: 10.1128/IAI.00857-17.
- [227] N. Mielcarek *et al.*, “Live Attenuated *B. pertussis* as a Single-Dose Nasal Vaccine against Whooping Cough,” *PLoS Pathog*, vol. 2, no. 7, p. e65, 2006, doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.0020065.
- [228] C. Locht *et al.*, “Live Attenuated Pertussis Vaccine BPZE1 Protects Baboons Against *Bordetella pertussis* Disease and Infection,” *J Infect Dis*, vol. 216, no. 1, pp. 117–124, Jul. 2017, doi: 10.1093/INFDIS/JIX254.
- [229] L. Solans *et al.*, “IL-17-dependent SIgA-mediated protection against nasal *Bordetella pertussis* infection by live attenuated BPZE1 vaccine,” *Mucosal Immunol*, vol. 11, no. 6, pp. 1753–1762, Nov. 2018, doi: 10.1038/S41385-018-0073-9.
- [230] A. Lin *et al.*, “Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 induces a broad antibody response in humans,” *J Clin Invest*, vol. 130, no. 5, pp. 2332–2346, May 2020, doi: 10.1172/JCI135020.
- [231] M. Jahnmatz *et al.*, “Safety and immunogenicity of the live attenuated intranasal pertussis vaccine BPZE1: a phase 1b, double-blind, randomised, placebo-controlled dose-escalation study,” *Lancet Infect Dis*, vol. 20, no. 11, pp. 1290–1301, Nov. 2020, doi: 10.1016/S1473-3099(20)30274-7.
- [232] R. Thorstensson *et al.*, “A phase I clinical study of a live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine--BPZE1; a single centre, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of BPZE1 given intranasally to healthy adult male volunteers,” *PLoS One*, vol. 9, no. 1, Jan. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0083449.
- [233] C. Keech *et al.*, “Immunogenicity and safety of BPZE1, an intranasal live attenuated pertussis vaccine, versus tetanus-diphtheria-acellular pertussis vaccine: a randomised, double-blind, phase 2b trial,” *Lancet*, vol. 401, no. 10379, pp. 843–855, Mar. 2023, doi: 10.1016/S0140-6736(22)02644-7.
- [234] R. Roberts *et al.*, “Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis,” *Vaccine*, vol. 26, no. 36, pp. 4639–4646, Aug. 2008, doi: 10.1016/J.VACCINE.2008.07.004.
- [235] C. J. A. Asensio *et al.*, “Outer membrane vesicles obtained from *Bordetella pertussis* Tohama expressing the lipid A deacylase PagL as a novel acellular vaccine candidate,” *Vaccine*, vol. 29, no. 8, pp. 1649–1656, 2011, doi: 10.1016/J.VACCINE.2010.12.068.

- [236] M. L. P. Vidakovics, J. Paba, Y. Lamberti, C. Andre, M. V. De Sousa, and M. E. Rodriguez, "Profiling the *Bordetella pertussis* proteome during iron starvation," *J Proteome Res*, vol. 6, pp. 2518–2528, 2007.
- [237] J. Alvarez Hayes *et al.*, "Bordetella pertussis iron regulated proteins as potential vaccine components," *Vaccine*, vol. 31, no. 35, pp. 3543–3548, 2013, doi: 10.1016/j.vaccine.2013.05.072.
- [238] J. Alvarez Hayes *et al.*, "Identification of a new protective antigen of *Bordetella pertussis*," *Vaccine*, vol. 29, no. 47, pp. 8731–8739, 2011, doi: 10.1016/j.vaccine.2011.07.143.
- [239] J. Alvarez Hayes *et al.*, "A recombinant iron transport protein from *Bordetella pertussis* confers protection against *Bordetella parapertussis*," *Microbiol Immunol*, vol. 61, no. 10, pp. 407–415, 2017, doi: 10.1111/1348-0421.12532.
- [240] L. P. Celentano, M. Massari, D. Paramatti, S. Salmaso, and A. E. Tozzi, "Resurgence of pertussis in Europe," *Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 24, no. 9, pp. 761–765, 2005, doi: 10.1097/01.inf.0000177282.53500.77.
- [241] Centers for Disease Control and Prevention, "Pertussis--United States, 2001-2003," Dec. 2005.
- [242] J. D. Cherry, "Epidemiological, clinical, and laboratory aspects of pertussis in adults," *Clin Infect Dis*, vol. 28 Suppl 2, no. 6 SUPPL. 2, 1999, doi: 10.1086/515058.
- [243] J. G. Wheeler and A. L. Simmons, "Pertussis update," *Pediatr Infect Dis J*, vol. 24, no. 9, pp. 829–830, 2005, doi: 10.1097/01.INF.0000178292.58579.EF.
- [244] K. Edwards and D. Freeman, "Adolescent and adult pertussis: disease burden and prevention.," *Curr Opin Pediatr*, vol. 18, no. 1, pp. 77–80, Feb. 2006, doi: 10.1097/01.MOP.0000192520.48411.FA.
- [245] V. Bouchez and N. Guiso, "Bordetella pertussis, B. parapertussis, vaccines and cycles of whooping cough," *Pathog Dis*, vol. 73, no. 7, pp. 1–6, 2015, doi: 10.1093/femspd/ftv055.
- [246] B. M. Althouse and S. V. Scarpino, "Asymptomatic transmission and the resurgence of *Bordetella pertussis*," *BMC Med*, vol. 13, no. 1, Jun. 2015, doi: 10.1186/s12916-015-0382-8.
- [247] P. E. M. Fine and J. A. Clarkson, "The recurrence of whooping cough: possible implications for assessment of vaccine efficacy," *Lancet*, vol. 1, no. 8273, pp. 666–669, 1982, doi: 10.1016/S0140-6736(82)92214-0.
- [248] T. Tan, E. Trindade, and D. Skowronski, "Epidemiology of pertussis.," *Pediatr Infect Dis J*, vol. 24, no. 5 Suppl, pp. S10-8, May 2005, doi: 10.1097/01.inf.0000160708.43944.99.
- [249] G. De Serres *et al.*, "Morbidity of pertussis in adolescents and adults," *J Infect Dis*, vol. 182, no. 1, pp. 174–179, 2000, doi: 10.1086/315648.
- [250] S. Senanayake, "Pertussis in Australia today - a disease of adolescents and adults that can kill infants," *Aust Fam Physician.*, vol. 36, no. 1, Feb. 2007.
- [251] C. H. Wirsing Von König, S. Halperin, M. Riffelmann, and N. Guiso, "Pertussis of adults and infants," *Lancet Infectious Diseases*, vol. 2, no. 12, pp. 744–750, Dec. 2002, doi: 10.1016/S1473-3099(02)00452-8.
- [252] F. Kowalzik *et al.*, "Prospective multinational study of pertussis infection in hospitalized infants and their household contacts.," *Pediatr Infect Dis J*, vol. 26, no. 3, pp. 238–242, Mar. 2007, doi: 10.1097/01.INF.0000256750.07118.EE.

- [253] E. L. Hewlett and K. M. Edwards, “Pertussis-Not Just for Kids,” 2005. [Online]. Available: www.nejm.org
- [254] G. Fabricius, P. Martin Aispuro, P. Bergero, D. Bottero, M. Gabrielli, and D. Hozbor, “Pertussis epidemiology in Argentina: TRENDS after the introduction of maternal immunisation,” *Epidemiol Infect*, vol. 146, no. 7, pp. 858–866, May 2018, doi: 10.1017/S0950268818000808.
- [255] K. E. Luker, A. N. Tyler, G. R. Marshall, and W. E. Goldman, “Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in pertussis,” *Mol Microbiol*, vol. 16, no. 4, pp. 733–743, May 1995, doi: 10.1111/J.1365-2958.1995.TB02434.X.
- [256] D. K. Kessie *et al.*, “Activity of Tracheal Cytotoxin of *Bordetella pertussis* in a Human Tracheobronchial 3D Tissue Model,” *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 10, Jan. 2021, doi: 10.3389/fcimb.2020.614994.
- [257] R. Sivarajan *et al.*, “Susceptibility of Human Airway Tissue Models Derived From Different Anatomical Sites to *Bordetella pertussis* and Its Virulence Factor Adenylate Cyclase Toxin,” *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 11, Dec. 2021, doi: 10.3389/fcimb.2021.797491.
- [258] D. Serra *et al.*, “Continuous nondestructive monitoring of *Bordetella pertussis* biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy and other corroborative techniques,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 387, no. 5, pp. 1759–1767, Mar. 2007, doi: 10.1007/S00216-006-1079-9.
- [259] A. Bosch, D. Serra, C. Prieto, J. Schmitt, D. Naumann, and O. Yantorno, “Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 71, no. 5, pp. 736–747, Aug. 2006, doi: 10.1007/S00253-005-0202-8.
- [260] R. M. Donlan and J. W. Costerton, “Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms,” *Clin Microbiol Rev*, vol. 15, no. 2, pp. 167–193, 2002, doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.
- [261] L. Arnal *et al.*, “*Bordetella pertussis* Isolates from Argentinean Whooping Cough Patients Display Enhanced Biofilm Formation Capacity Compared to Tohama I Reference Strain,” *Front Microbiol*, vol. 6, no. DEC, p. 1352, 2015, doi: 10.3389/FMICB.2015.01352.
- [262] N. Cattelan, J. Jennings-Gee, P. Dubey, O. M. Yantorno, and R. Deora, “Hyperbiofilm formation by *Bordetella pertussis* strains correlates with enhanced virulence traits,” *Infect Immun*, vol. 85, no. 12, 2017, doi: 10.1128/IAI.00373-17.
- [263] A. R. Fullen *et al.*, “Architecture and matrix assembly determinants of *Bordetella pertussis* biofilms on primary human airway epithelium,” *PLoS Pathog*, vol. 19, no. 2, Feb. 2023, doi: 10.1371/journal.ppat.1011193.
- [264] D. O. Serra *et al.*, “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*, vol. 6, no. 12, Dec. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0028811.
- [265] M. S. Conover, G. P. Sloan, C. F. Love, N. Sukumar, and R. Deora, “The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin,” *Mol Microbiol*, vol. 77, no. 6, pp. 1439–1455, Sep. 2010, doi: 10.1111/J.1365-2958.2010.07297.X.

- [266] M. Mishra, G. Parise, K. D. Jackson, D. J. Wozniak, and R. Deora, "The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*," *J Bacteriol*, vol. 187, no. 4, pp. 1474–1484, Feb. 2005, doi: 10.1128/JB.187.4.1474-1484.2005.
- [267] J. C. Eby, M. C. Gray, and E. L. Hewlett, "Cyclic AMP-mediated suppression of neutrophil extracellular trap formation and apoptosis by the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin," *Infect Immun*, vol. 82, no. 12, pp. 5256–5269, 2014, doi: 10.1128/IAI.02487-14.
- [268] O. Cerny, K. E. Anderson, L. R. Stephens, P. T. Hawkins, and P. Sebo, "cAMP Signaling of Adenylate Cyclase Toxin Blocks the Oxidative Burst of Neutrophils through Epac-Mediated Inhibition of Phospholipase C Activity," *The Journal of Immunology*, vol. 198, no. 3, pp. 1285–1296, Feb. 2017, doi: 10.4049/jimmunol.1601309.
- [269] N. H. Carbonetti, "Immunomodulation in the pathogenesis of *Bordetella pertussis* infection and disease," *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 7, no. 3, pp. 272–278, Jun. 2007. doi: 10.1016/j.coph.2006.12.004.
- [270] C. N. H, A. G. V, V. R. Nico, and A. V. I, "Pertussis Toxin Targets Airway Macrophages To Promote *Bordetella pertussis* Infection of the Respiratory Tract," *Infect Immun*, vol. 75, no. 4, pp. 1713–1720, Apr. 2007, doi: 10.1128/iai.01578-06.
- [271] K. L. Sealey, T. Belcher, and A. Preston, "Bordetella pertussis epidemiology and evolution in the light of pertussis resurgence," *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 40. Elsevier B.V., pp. 136–143, Jun. 01, 2016. doi: 10.1016/j.meegid.2016.02.032.
- [272] K. Bromberg, G. Tannis, and P. Steiner, "Detection of *Bordetella pertussis* associated with the alveolar macrophages of children with human immunodeficiency virus infection.," *Infect Immun*, vol. 59, no. 12, p. 4715, 1991, doi: 10.1128/IAI.59.12.4715-4719.1991.
- [273] Y. A. Lamberti, J. A. Hayes, M. L. Perez Vidakovics, E. T. Harvill, and M. E. Rodriguez, "Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages," *Infect Immun*, vol. 78, no. 3, pp. 907–913, 2010, doi: 10.1128/IAI.01031-09.
- [274] Y. Lamberti *et al.*, "Proteome analysis of *Bordetella pertussis* isolated from human macrophages," *J Proteomics*, vol. 136, pp. 55–67, Mar. 2016, doi: 10.1016/J.JPROT.2016.02.002.
- [275] C. Atri, F. Z. Guerfali, and D. Laouini, "Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases.," *Int J Mol Sci*, vol. 19, no. 6, Jun. 2018, doi: 10.3390/ijms19061801.
- [276] H. A. Valdez *et al.*, "Human macrophage polarization shapes *B. pertussis* intracellular persistence," *J Leukoc Biol*, vol. 112, no. 1, pp. 173–184, Jul. 2022, doi: 10.1002/JLB.4A0521-254R.
- [277] L. Nguyen and J. Pieters, "The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages.," *Trends Cell Biol*, vol. 15, no. 5, pp. 269–276, May 2005, doi: 10.1016/J.TCB.2005.03.009.
- [278] Y. Sato, K. Izumiya, H. Sato, J. L. Cowell, and C. R. Manclarkw, "Aerosol infection of mice with *Bordetella pertussis*.,," *Infect Immun*, vol. 29, no. 1, p. 261, 1980, doi: 10.1128/IAI.29.1.261-266.1980.
- [279] G. Fedele, A. Cassone, and C. M. aria Ausiello, "T-cell immune responses to *Bordetella pertussis* infection and vaccination," *Pathog Dis*, vol. 73, no. 7, Oct. 2015, doi: 10.1093/FEMSPD/FTV051.

- [280] R. Higgs, S. C. Higgins, P. J. Ross, and K. H. G. Mills, "Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*," *Mucosal Immunol*, vol. 5, no. 5, pp. 485–500, Sep. 2012, doi: 10.1038/MI.2012.54.
- [281] C. E. Belcher *et al.*, "The transcriptional responses of respiratory epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies," 2000. [Online]. Available: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.230262797
- [282] L. Bassinet, C. Fitting, B. Housset, J. M. Cavaillon, and N. Guiso, "Bordetella pertussis adenylate cyclase-hemolysin induces interleukin-6 secretion by human tracheal epithelial cells," *Infect Immun*, vol. 72, no. 9, pp. 5530–5533, Sep. 2004, doi: 10.1128/IAI.72.9.5530-5533.2004.
- [283] R. J. Vandebriel *et al.*, "Association of *Bordetella pertussis* with host immune cells in the mouse lung," *Microb Pathog*, vol. 35, no. 1, pp. 19–29, Jul. 2003, doi: 10.1016/S0882-4010(03)00087-1.
- [284] A. S. McWilliam *et al.*, "Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli," *J Exp Med*, vol. 184, no. 6, pp. 2429–2432, Dec. 1996, doi: 10.1084/JEM.184.6.2429.
- [285] P. Byrne, P. McGuirk, S. Todryk, and K. H. G. Mills, "Depletion of NK cells results in disseminating lethal infection with *Bordetella pertussis* associated with a reduction of antigen-specific Th1 and enhancement of Th2, but not Tr1 cells," *Eur J Immunol*, vol. 34, no. 9, pp. 2579–2588, Sep. 2004, doi: 10.1002/EJL.200425092.
- [286] N. Khelef, D. DeShazer, R. L. Friedman, and N. Guiso, "In vivo and in vitro analysis of *Bordetella pertussis* catalase and Fe-superoxide dismutase mutants," *FEMS Microbiol Lett*, vol. 142, no. 2–3, pp. 231–235, Sep. 1996, doi: 10.1111/J.1574-6968.1996.TB08435.X.
- [287] D. R. Cundell *et al.*, "Effect of tracheal cytotoxin from *Bordetella pertussis* on human neutrophil function in vitro," *Infect Immun*, vol. 62, no. 2, pp. 639–643, 1994, doi: 10.1128/IAI.62.2.639-643.1994.
- [288] F. B. Hickey, C. F. Brereton, and K. H. G. Mills, "Adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* inhibits TLR-induced IRF-1 and IRF-8 activation and IL-12 production and enhances IL-10 through MAPK activation in dendritic cells," *J Leukoc Biol*, vol. 84, no. 1, pp. 234–243, Jul. 2008, doi: 10.1189/JLB.0208113.
- [289] J. S. Boschwitz, J. W. Batanghari, H. Kedem, and D. A. Relman, "Bordetella pertussis infection of human monocytes inhibits antigen-dependent CD4 T cell proliferation," *J Infect Dis*, vol. 176, no. 3, pp. 678–686, 1997, doi: 10.1086/514090.
- [290] P. J. Ross, E. C. Lavelle, K. H. G. Mills, and A. P. Boyd, "Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* synergizes with lipopolysaccharide to promote innate interleukin-10 production and enhances the induction of Th2 and regulatory T cells," *Infect Immun*, vol. 72, no. 3, pp. 1568–1579, Mar. 2004, doi: 10.1128/IAI.72.3.1568-1579.2004.
- [291] K. H. G. Mills, A. Barnard, J. Watkins, and K. Redhead, "Cell-mediated immunity to *Bordetella pertussis*: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model," *Infect Immun*, vol. 61, no. 2, pp. 399–410, 1993, doi: 10.1128/IAI.61.2.399-410.1993.
- [292] M. Leef, K. L. Elkins, J. Barbic, and R. D. Shahin, "Protective immunity to *Bordetella pertussis* requires both B cells and CD4(+) T cells for key functions other than specific

- antibody production,” *J Exp Med*, vol. 191, no. 11, pp. 1841–1852, Jun. 2000, doi: 10.1084/JEM.191.11.1841.
- [293] T. R. Mosmann and R. L. Coffman, “TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties,” *Annu Rev Immunol*, vol. 7, pp. 145–173, 1989, doi: 10.1146/ANNUREV.IY.07.040189.001045.
- [294] F. Y. Liew, “T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective,” *Nat Rev Immunol*, vol. 2, no. 1, pp. 55–60, 2002, doi: 10.1038/NRI705.
- [295] T. Mosmann, H. Cherwinski, M. Bond, M. Giedlin, and R. Coffman, “Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986,” *J Immunol.*, vol. 136, no. 7, pp. 2348–2357, Jul. 1986.
- [296] W. Ouyang, J. K. Kolls, and Y. Zheng, “The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation,” *Immunity*, vol. 28, no. 4, pp. 454–467, Apr. 2008, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2008.03.004.
- [297] J. Barbic, M. F. Leef, D. L. Burns, and R. D. Shahin, “Role of gamma interferon in natural clearance of *Bordetella pertussis* infection,” *Infect Immun*, vol. 65, no. 12, p. 4904, 1997, doi: 10.1128/IAI.65.12.4904-4908.1997.
- [298] S. Peppoloni *et al.*, “Lymphokine secretion and cytotoxic activity of human CD4+ T-cell clones against *Bordetella pertussis*,” *Infect Immun*, vol. 59, no. 10, pp. 3768–3773, 1991, doi: 10.1128/IAI.59.10.3768-3773.1991.
- [299] B. P. Mahon, B. J. Sheahan, F. Griffin, G. Murphy, and K. H. G. Mills, “Atypical disease after *Bordetella pertussis* respiratory infection of mice with targeted disruptions of interferon-gamma receptor or immunoglobulin mu chain genes,” *J Exp Med*, vol. 186, no. 11, pp. 1843–1851, Dec. 1997, doi: 10.1084/JEM.186.11.1843.
- [300] S. C. Higgins, A. G. Jarnicki, E. C. Lavelle, and K. H. G. Mills, “TLR4 Mediates Vaccine-Induced Protective Cellular Immunity to *Bordetella pertussis*: Role of IL-17-Producing T Cells,” *The Journal of Immunology*, vol. 177, no. 11, pp. 7980–7989, Dec. 2006, doi: 10.4049/JIMMUNOL.177.11.7980.
- [301] A. Dunne *et al.*, “Inflammasome Activation by Adenylate Cyclase Toxin Directs Th17 Responses and Protection against *Bordetella pertussis*,” *The Journal of Immunology*, vol. 185, no. 3, pp. 1711–1719, Aug. 2010, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1000105.
- [302] M. M. Wilk, A. Misiak, R. M. McManus, A. C. Allen, M. A. Lynch, and K. H. G. Mills, “Lung CD4 Tissue-Resident Memory T Cells Mediate Adaptive Immunity Induced by Previous Infection of Mice with *Bordetella pertussis*,” *The Journal of Immunology*, vol. 199, no. 1, pp. 233–243, Jul. 2017, doi: 10.4049/jimmunol.1602051.
- [303] G. Fedele, M. Bianco, and C. M. Ausiello, “The virulence factors of *Bordetella pertussis*: talented modulators of host immune response,” *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, vol. 61, no. 6, pp. 445–457, Dec. 2013, doi: 10.1007/S00005-013-0242-1.
- [304] B. M. Van Den Berg, H. Beekhuizen, F. R. Mooi, and R. Van Furth, “Role of Antibodies against *Bordetella pertussis* Virulence Factors in Adherence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to Human Bronchial Epithelial cells Downloaded from,” 1999. [Online]. Available: <http://iaia.asm.org/>
- [305] B. M. van den Berg, H. Beekhuizen, R. J. Willems, F. R. Mooi, and R. van Furth, “Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract,” *Infect Immun*, vol. 67, no. 3, pp. 1056–62, 1999, [Online]. Available:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=96429&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [306] W. S. Tyler, "Comparative subgross anatomy of lungs. Pleuras, interlobular septa, and distal airways," *Am Rev Respir Dis*, vol. 128, no. 2 Pt 2, 1983, doi: 10.1164/ARRD.1983.128.2P2.S32.
- [307] C. C. W. Hsia, D. M. Hyde, and E. R. Weibel, "Lung Structure and the Intrinsic Challenges of Gas Exchange.," *Compr Physiol*, vol. 6, no. 2, pp. 827–95, Mar. 2016, doi: 10.1002/cphy.c150028.
- [308] N. A. Wright and Malcolm. Alison, "The biology of epithelial cell populations," 1984, Accessed: Nov. 23, 2023. [Online]. Available: <https://search.worldcat.org/title/10348629>
- [309] Y. J. Hsieh and B. L. Wanner, "Global regulation by the seven-component Pi signaling system," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 13, no. 2. pp. 198–203, Apr. 2010. doi: 10.1016/j.mib.2010.01.014.
- [310] F. Osculati, M. Bentivoglio, M. Castellucci, S. Cinti, C. Zancanaro, and A. Sbarbati, "The solitary chemosensory cells and the diffuse chemosensory system of the airway.," *Eur J Histochem*, vol. 51 Suppl 1, pp. 65–72, 2007.
- [311] G. Krasteva *et al.*, "Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, no. 23, pp. 9478–9483, Jun. 2011, doi: 10.1073/PNAS.1019418108.
- [312] B. I. Gustafsson, M. Kidd, A. Chan, M. V. Malfertheiner, and I. M. Modlin, "Bronchopulmonary neuroendocrine tumors," *Cancer*, vol. 113, no. 1, pp. 5–21, Jul. 2008, doi: 10.1002/CNCR.23542.
- [313] J. R. Gosney, M. C. J. Sissons, and R. O. Allibone, "Neuroendocrine cell populations in normal human lungs: a quantitative study.," *Thorax*, vol. 43, no. 11, p. 878, 1988, doi: 10.1136/THX.43.11.878.
- [314] D. Spina, "Epithelium smooth muscle regulation and interactions," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 158, no. 5 Pt 3, 1998, doi: 10.1164/AJRCCM.158.SUPPLEMENT_2.13TAC100A.
- [315] S. M. Serafini and E. D. Michaelson, "Length and distribution of cilia in human and canine airways.," *Bull Eur Physiopathol Respir*, vol. 13, no. 4, pp. 551–9, 1977.
- [316] S. Ganesan, A. T. Comstock, and U. S. Sajjan, "Barrier function of airway tract epithelium," *Tissue Barriers*, vol. 1, no. 4, p. e24997, Oct. 2013, doi: 10.4161/tisb.24997.
- [317] M. M. Ayers and P. K. Jeffery, "Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium.," *Eur Respir J*, vol. 1, no. 1, pp. 58–80, Jan. 1988.
- [318] Y. Inayama *et al.*, "In vitro and in vivo growth and differentiation of clones of tracheal basal cells.," *Am J Pathol*, vol. 134, no. 3, p. 539, 1989, Accessed: Nov. 23, 2023. [Online]. Available: </pmc/articles/PMC1879538/?report=abstract>
- [319] M. J. Evans, L. S. Van Winkle, M. V Fanucchi, and C. G. Plopper, "Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium.," *Exp Lung Res*, vol. 27, no. 5, pp. 401–15, 2001, doi: 10.1080/019021401300317125.
- [320] R. Hajj, T. Baranek, R. Le Naour, P. Lesimple, E. Puchelle, and C. Coraux, "Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties," *Stem Cells*, vol. 25, no. 1, pp. 139–148, Jan. 2007, doi: 10.1634/STEMCELLS.2006-0288.

- [321] Y. Inayama *et al.*, “The differentiation potential of tracheal basal cells.,” *Lab Invest*, vol. 58, no. 6, pp. 706–17, Jun. 1988.
- [322] K. U. Hong, S. D. Reynolds, S. Watkins, E. Fuchs, and B. R. Stripp, “In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations,” *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 286, no. 4, 2004, doi: 10.1152/AJPLUNG.00155.2003.
- [323] K. U. Hong, S. D. Reynolds, S. Watkins, E. Fuchs, and B. R. Stripp, “Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium,” *Am J Pathol*, vol. 164, no. 2, pp. 577–588, 2004, doi: 10.1016/S0002-9440(10)63147-1.
- [324] G. Singh, S. L. Katyal, W. E. Brown, A. L. Kennedy, U. Singh, and M. L. Wong-Chong, “Clara cell 10 kDa protein (CC10): comparison of structure and function to uteroglobin.,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1039, no. 3, pp. 348–55, Jul. 1990, doi: 10.1016/0167-4838(90)90270-p.
- [325] D. S. Phelps and J. Floros, “Localization of pulmonary surfactant proteins using immunohistochemistry and tissue in situ hybridization.,” *Exp Lung Res*, vol. 17, no. 6, pp. 985–95, 1991, doi: 10.3109/01902149109064330.
- [326] J. G. Widdicombe and R. J. Pack, “The Clara cell.,” *Eur J Respir Dis*, vol. 63, no. 3, pp. 202–20, May 1982.
- [327] R. De Water *et al.*, “Ultrastructural localization of bronchial antileukoprotease in central and peripheral human airways by a gold-labeling technique using monoclonal antibodies.,” *Am Rev Respir Dis*, vol. 133, no. 5, pp. 882–90, May 1986.
- [328] M. J. Evans, L. J. Cabral-Anderson, and G. Freeman, “Role of the Clara cell in renewal of the bronchiolar epithelium.,” *Lab Invest*, vol. 38, no. 6, pp. 648–53, Jun. 1978.
- [329] J. E. Boers, A. W. Ambergen, and F. B. Thunnissen, “Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium.,” *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 159, no. 5 Pt 1, pp. 1585–91, May 1999, doi: 10.1164/ajrccm.159.5.9806044.
- [330] M. R. Knowles and R. C. Boucher, “Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways.,” *J Clin Invest*, vol. 109, no. 5, pp. 571–7, Mar. 2002, doi: 10.1172/JCI15217.
- [331] C. Pohl *et al.*, “Barrier functions and paracellular integrity in human cell culture models of the proximal respiratory unit.,” *Eur J Pharm Biopharm*, vol. 72, no. 2, pp. 339–49, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.ejpb.2008.07.012.
- [332] R. Bals and P. S. Hiemstra, “Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens.,” *Eur Respir J*, vol. 23, no. 2, pp. 327–33, Feb. 2004, doi: 10.1183/09031936.03.00098803.
- [333] K. H. Kilburn, “A hypothesis for pulmonary clearance and its implications.,” *Am Rev Respir Dis*, vol. 98, no. 3, pp. 449–63, Sep. 1968, doi: 10.1164/arrd.1968.98.3.449.
- [334] R. Tarran, B. R. Grubb, J. T. Gatzky, C. W. Davis, and R. C. Boucher, “The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition.,” *J Gen Physiol*, vol. 118, no. 2, pp. 223–36, Aug. 2001, doi: 10.1085/jgp.118.2.223.
- [335] E. Puchelle, S. de Bentzmann, and J. M. Zahm, “Physical and functional properties of airway secretions in cystic fibrosis--therapeutic approaches.,” *Respiration*, vol. 62 Suppl 1, pp. 2–12, 1995, doi: 10.1159/000196486.

- [336] M. C. Rose, T. J. Nickola, and J. A. Voynow, "Airway mucus obstruction: mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet cell hyperplasia.," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 25, no. 5, pp. 533–7, Nov. 2001, doi: 10.1165/ajrcmb.25.5.f218.
- [337] M. C. Rose and J. A. Voynow, "Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease.," *Physiol Rev*, vol. 86, no. 1, pp. 245–78, Jan. 2006, doi: 10.1152/physrev.00010.2005.
- [338] D. F. Rogers, "The airway goblet cell.," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 35, no. 1, pp. 1–6, Jan. 2003, doi: 10.1016/s1357-2725(02)00083-3.
- [339] A. Dohrman *et al.*, "Mucin gene (MUC 2 and MUC 5AC) upregulation by Gram-positive and Gram-negative bacteria.," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1406, no. 3, pp. 251–9, Apr. 1998, doi: 10.1016/s0925-4439(98)00010-6.
- [340] M. T. Borchers, M. P. Carty, and G. D. Leikauf, "Regulation of human airway mucins by acrolein and inflammatory mediators.," *Am J Physiol*, vol. 276, no. 4, pp. L549–55, Apr. 1999, doi: 10.1152/ajplung.1999.276.4.L549.
- [341] E. Gensch *et al.*, "Tobacco smoke control of mucin production in lung cells requires oxygen radicals AP-1 and JNK.," *J Biol Chem*, vol. 279, no. 37, pp. 39085–93, Sep. 2004, doi: 10.1074/jbc.M406866200.
- [342] M. X. G. Shao, T. Nakanaga, and J. A. Nadel, "Cigarette smoke induces MUC5AC mucin overproduction via tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme in human airway epithelial (NCI-H292) cells.," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 287, no. 2, pp. L420–7, Aug. 2004, doi: 10.1152/ajplung.00019.2004.
- [343] L. E. Haswell, K. Hewitt, D. Thorne, A. Richter, and M. D. Gaça, "Cigarette smoke total particulate matter increases mucous secreting cell numbers in vitro: a potential model of goblet cell hyperplasia.," *Toxicol In Vitro*, vol. 24, no. 3, pp. 981–7, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.tiv.2009.12.019.
- [344] S. M. Casalino-Matsuda, M. E. Monzon, A. J. Day, and R. M. Forteza, "Hyaluronan fragments/CD44 mediate oxidative stress-induced MUC5B up-regulation in airway epithelium.," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 40, no. 3, pp. 277–85, Mar. 2009, doi: 10.1165/rcmb.2008-0073OC.
- [345] E. E. Schneeberger and R. D. Lynch, "The tight junction: a multifunctional complex.," *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 286, no. 6, pp. C1213–28, Jun. 2004, doi: 10.1152/ajpcell.00558.2003.
- [346] K. Shin, V. C. Fogg, and B. Margolis, "Tight junctions and cell polarity.," *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 22, pp. 207–35, 2006, doi: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104219.
- [347] A. Hartsock and W. J. Nelson, "Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton.," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1778, no. 3, pp. 660–669, 2008, doi: 10.1016/J.BBAMEM.2007.07.012.
- [348] G. A. Pedersen *et al.*, "The basolateral vesicle sorting machinery and basolateral proteins are recruited to the site of enteropathogenic *E. coli* microcolony growth at the apical membrane," *PLoS One*, vol. 12, no. 6, pp. 1–21, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0179122.
- [349] T. R. Muth, C. J. Gottardi, D. L. Roush, and M. J. Caplan, "A basolateral sorting signal is encoded in the alpha-subunit of Na-K-ATPase.," *Am J Physiol*, vol. 274, no. 3, pp. C688–96, Mar. 1998, doi: 10.1152/ajpcell.1998.274.3.C688.

- [350] I. Bucior, K. Mostov, and J. N. Engel, “Pseudomonas aeruginosa-mediated damage requires distinct receptors at the apical and basolateral surfaces of the polarized epithelium,” *Infect Immun*, vol. 78, no. 3, pp. 939–953, Mar. 2010, doi: 10.1128/IAI.01215-09.
- [351] E. H. Stoops and M. J. Caplan, “Trafficking to the apical and basolateral membranes in polarized epithelial cells.,” *J Am Soc Nephrol*, vol. 25, no. 7, pp. 1375–86, Jul. 2014, doi: 10.1681/ASN.2013080883.
- [352] G. K. Ojakian and R. Schwimmer, “The polarized distribution of an apical cell surface glycoprotein is maintained by interactions with the cytoskeleton of Madin-Darby canine kidney cells.,” *J Cell Biol*, vol. 107, no. 6, pp. 2377–2387, Dec. 1988, doi: 10.1083/jcb.107.6.2377.
- [353] H. Fölsch, “Regulation of membrane trafficking in polarized epithelial cells.,” *Curr Opin Cell Biol*, vol. 20, no. 2, pp. 208–13, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.ceb.2008.01.003.
- [354] M. S. Balda and K. Matter, “Tight junctions and the regulation of gene expression,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1788, no. 4, pp. 761–767, Apr. 2009, doi: 10.1016/J.BBAMEM.2008.11.024.
- [355] S. Koch and A. Nusrat, “Dynamic regulation of epithelial cell fate and barrier function by intercellular junctions.,” *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1165, pp. 220–7, May 2009, doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04025.x.
- [356] R. Shaykhiev *et al.*, “Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular architecture in the human airway epithelium in vivo.,” *Cell Mol Life Sci*, vol. 68, no. 5, pp. 877–92, Mar. 2011, doi: 10.1007/s00018-010-0500-x.
- [357] A. Nusrat *et al.*, “Tight junctions are membrane microdomains,” *J Cell Sci*, vol. 113, no. 10, pp. 1771–1781, May 2000, doi: 10.1242/jcs.113.10.1771.
- [358] J. M. Anderson and C. M. Van Itallie, “Physiology and function of the tight junction.,” *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 1, no. 2. 2009. doi: 10.1101/cshperspect.a002584.
- [359] C. M. Van Itallie and J. M. Anderson, “Architecture of tight junctions and principles of molecular composition,” *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 36. Academic Press, pp. 157–165, Dec. 01, 2014. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.08.011.
- [360] S. Bajpai *et al.*, “Alpha-Catenin mediates initial E-cadherin-dependent cell-cell recognition and subsequent bond strengthening.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no. 47, pp. 18331–6, Nov. 2008, doi: 10.1073/pnas.0806783105.
- [361] F. Drees, S. Pokutta, S. Yamada, W. J. Nelson, and W. I. Weis, “Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly.,” *Cell*, vol. 123, no. 5, pp. 903–15, Dec. 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.09.021.
- [362] H. R. Ibrahim, T. Aoki, and A. Pellegrini, “Strategies for new antimicrobial proteins and peptides: lysozyme and aprotinin as model molecules.,” *Curr Pharm Des*, vol. 8, no. 9, pp. 671–93, 2002, doi: 10.2174/1381612023395349.
- [363] T. Ganz, “Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity.,” *Nat Rev Immunol*, vol. 3, no. 9, pp. 710–20, Sep. 2003, doi: 10.1038/nri1180.
- [364] S. Kota *et al.*, “Role of human beta-defensin-2 during tumor necrosis factor-alpha/NF-kappaB-mediated innate antiviral response against human respiratory syncytial virus.,” *J Biol Chem*, vol. 283, no. 33, pp. 22417–29, Aug. 2008, doi: 10.1074/jbc.M710415200.

- [365] M. N. Becker, G. Diamond, M. W. Verghese, and S. H. Randell, “CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium.,” *J Biol Chem*, vol. 275, no. 38, pp. 29731–6, Sep. 2000, doi: 10.1074/jbc.M000184200.
- [366] P. K. Singh *et al.*, “Production of beta-defensins by human airway epithelia.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no. 25, pp. 14961–6, Dec. 1998, doi: 10.1073/pnas.95.25.14961.
- [367] D. Parker and A. Prince, “Innate immunity in the respiratory epithelium.,” *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 45, no. 2, pp. 189–201, Aug. 2011, doi: 10.1165/rcmb.2011-0011RT.
- [368] S. L. Johnston, D. L. Goldblatt, S. E. Evans, M. J. Tuvim, and B. F. Dickey, “Airway Epithelial Innate Immunity,” *Front Physiol*, vol. 12, Nov. 2021, doi: 10.3389/fphys.2021.749077.
- [369] L. Bassinet, P. Gueirard, B. Maitre, B. Housset, P. Gounon, and N. Guiso, “Role of Adhesins and Toxins in Invasion of Human Tracheal Epithelial Cells by *Bordetella pertussis*,” *Infect Immun*, vol. 68, no. 4, pp. 1934–1941, 2000, doi: 10.1128/IAI.68.4.1934-1941.2000.Updated.
- [370] P. Gueirard, L. Bassinet, I. Bonne, M. C. Prevost, and N. Guiso, “Ultrastructural analysis of the interactions between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* and human tracheal epithelial cells,” *Microb Pathog*, vol. 38, no. 1, pp. 41–46, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.micpath.2004.08.003.
- [371] Y. Lamberti, J. Gorgojo, C. Massillo, and M. E. Rodriguez, “*Bordetella pertussis* entry into respiratory epithelial cells and intracellular survival,” *Pathog Dis*, vol. 69, no. 3, pp. 194–204, 2013, doi: 10.1111/2049-632X.12072.
- [372] M. M. Kroes *et al.*, “*Bordetella pertussis*-infected innate immune cells drive the anti-pertussis response of human airway epithelium,” *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-07603-8.
- [373] L. I. Zimmerman, J. F. Papin, J. Warfel, R. F. Wolf, S. D. Kosanke, and T. J. Merkel, “Histopathology of *Bordetella pertussis* in the baboon model,” *Infect Immun*, vol. 86, no. 11, Nov. 2018, doi: 10.1128/IAI.00511-18.
- [374] C. Angely *et al.*, “Exposure to *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin affects integrin-mediated adhesion and mechanics in alveolar epithelial cells,” *Biol Cell*, vol. 109, no. 8, pp. 293–311, Aug. 2017, doi: 10.1111/boc.201600082.
- [375] B. Wang and P. P. Cleary, “Intracellular Invasion by *Streptococcus pyogenes*: Invasins, Host Receptors, and Relevance to Human Disease.,” *Microbiol Spectr*, vol. 7, no. 4, Jul. 2019, doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0049-2018.
- [376] P. Garai, L. Berry, M. Moussouni, S. Bleves, and A. B. Blanc-Potard, “Killing from the inside: Intracellular role of T3SS in the fate of *Pseudomonas aeruginosa* within macrophages revealed by *mgtC* and *oprF* mutants,” *PLoS Pathog*, vol. 15, no. 6, Jun. 2019, doi: 10.1371/journal.ppat.1007812.
- [377] P. Morey *et al.*, “Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells.,” *Microbiology (Reading)*, vol. 157, no. Pt 1, pp. 234–250, Jan. 2011, doi: 10.1099/mic.0.040451-0.
- [378] S. M. M. Hellwig, L. W. Hazenbos, J. G. J. Van De Winkel, and F. R. Mooi, “Evidence for an intracellular niche for *Bordetella pertussis* in broncho-alveolar lavage cells of mice,” 1999.

- [379] D. Petráčková *et al.*, “Transcriptional profiling of human macrophages during infection with *Bordetella pertussis*,” *RNA Biol*, vol. 17, no. 5, pp. 731–742, May 2020, doi: 10.1080/15476286.2020.1727694.
- [380] M. R. Farman *et al.*, “Avirulent phenotype promotes *Bordetella pertussis* adaptation to the intramacrophage environment,” *Emerg Microbes Infect*, vol. 12, no. 1, 2023, doi: 10.1080/22221751.2022.2146536.
- [381] J. H. Cafiero, Y. A. Lamberti, K. Surmann, B. Vecerek, and M. E. Rodriguez, “A *Bordetella pertussis* MgtC homolog plays a role in the intracellular survival,” *PLoS One*, vol. 13, no. 8, p. e0203204, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0203204.
- [382] C. Loch, P. Bertin, F. D. Menozzi, and G. Renaud, “The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesin produced by virulent *Bordetella* spp,” 1993.
- [383] D. W. Stainer and M. J. Scholte, “A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*,” *J Gen Microbiol*, vol. 63, no. 2, pp. 211–20, Oct. 1970, doi: 10.1099/00221287-63-2-211.
- [384] A. L. Cozens *et al.*, “CFfR Expression and Chloride Secretion in Polarized Immortal Human Bronchial Epithelial Cells,” *Am J Respir Cell Mol. Bio.*, vol. 10, no. 23, pp. 38–47, 1994, doi: 10.1165/ajrcmb.10.1.7507342.
- [385] J. P. Gorgojo, M. D. C. Carrica, C. M. Baroli, H. A. Valdez, J. Alvarez Hayes, and M. E. Rodriguez, “Adenylate cyclase toxin of *Bordetella parapertussis* disrupts the epithelial barrier granting the bacterial access to the intracellular space of epithelial cells,” *PLoS One*, vol. 18, no. 11, p. e0291331, 2023, doi: 10.1371/journal.pone.0291331.
- [386] C. Terryn *et al.*, “Rapid method of quantification of tight-junction organization using image analysis,” *Cytometry Part A*, vol. 83 A, no. 2, pp. 235–241, Feb. 2013, doi: 10.1002/cyto.a.22239.
- [387] J. Gorgojo, E. T. Harvill, and M. E. Rodriguez, “*Bordetella parapertussis* survives inside human macrophages in lipid raft-enriched phagosomes,” *Infect Immun*, vol. 82, no. 12, pp. 5175–5184, 2014, doi: 10.1128/IAI.02553-14.
- [388] W. Manz, U. Szewzyk, P. Ericsson, R. Amann, K.-H. Schleifer, and T.-A. Stenstrom, “Situ Identification of Bacteria in Drinking Water and Adjoining Biofilms by Hybridization With 16S and 23S rRNA-Directed Fluorescent Oligonucleotide Probes,” 1993. [Online]. Available: <https://journals.asm.org/journal/aem>
- [389] S. Blankenburg *et al.*, “Improving Proteome Coverage for Small Sample Amounts: An Advanced Method for Proteomics Approaches with Low Bacterial Cell Numbers,” *Proteomics*, vol. 19, no. 23, p. e1900192, Dec. 2019, doi: 10.1002/pmic.201900192.
- [390] J. Cox, M. Y. Hein, C. A. Lubner, I. Paron, N. Nagaraj, and M. Mann, “Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ,” *Mol Cell Proteomics*, vol. 13, no. 9, pp. 2513–26, Sep. 2014, doi: 10.1074/mcp.M113.031591.
- [391] F. Seyednasrollah, K. Rantanen, P. Jaakkola, and L. L. Elo, “ROTS: reproducible RNA-seq biomarker detector-prognostic markers for clear cell renal cell cancer,” *Nucleic Acids Res*, vol. 44, no. 1, p. e1, Jan. 2016, doi: 10.1093/nar/gkv806.
- [392] T. Suomi and L. L. Elo, “Enhanced differential expression statistics for data-independent acquisition proteomics,” *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 5869, Jul. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-05949-y.

- [393] B. T. Sherman *et al.*, “DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update).,” *Nucleic Acids Res*, vol. 50, no. W1, pp. W216–W221, Jul. 2022, doi: 10.1093/nar/gkac194.
- [394] D. Szklarczyk *et al.*, “The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest.,” *Nucleic Acids Res*, vol. 51, no. D1, pp. D638–D646, Jan. 2023, doi: 10.1093/nar/gkac1000.
- [395] S. Hasan, P. Sebo, and R. Osicka, “A guide to polarized airway epithelial models for studies of host–pathogen interactions,” *FEBS Journal*, vol. 285, no. 23. Blackwell Publishing Ltd, pp. 4343–4358, Dec. 01, 2018. doi: 10.1111/febs.14582.
- [396] M. Bertuzzi, G. E. Hayes, and E. M. Bignell, “Microbial uptake by the respiratory epithelium: Outcomes for host and pathogen,” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 43, no. 2. Oxford University Press, pp. 145–161, Mar. 01, 2019. doi: 10.1093/femsre/fuy045.
- [397] Y. Lamberti and K. Surmann, “The intracellular phase of extracellular respiratory tract bacterial pathogens and its role on pathogen-host interactions during infection.,” *Curr Opin Infect Dis*, vol. 34, no. 3, pp. 197–205, Jun. 2021, doi: 10.1097/QCO.0000000000000727.
- [398] D. E. Voth and R. A. Heinzen, “Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*,” *Cell Microbiol*, vol. 9, no. 4, pp. 829–840, Apr. 2007, doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00901.x.
- [399] H. M. Al-Younes, T. Rudel, and T. F. Meyer, “Characterization and intracellular trafficking pattern of vacuoles containing *Chlamydia pneumoniae* in human epithelial cells.,” *Cell Microbiol*, vol. 1, no. 3, pp. 237–47, Nov. 1999, doi: 10.1046/j.1462-5822.1999.00024.x.
- [400] K. L. Fine, M. G. Metcalfe, E. White, M. Virji, R. K. Karls, and F. D. Quinn, “Involvement of the autophagy pathway in trafficking of *Mycobacterium tuberculosis* bacilli through cultured human type II epithelial cells.,” *Cell Microbiol*, vol. 14, no. 9, pp. 1402–14, Sep. 2012, doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01804.x.
- [401] G. Y. Chen, D. A. Pensinger, and J.-D. Sauer, “*Listeria monocytogenes* cytosolic metabolism promotes replication, survival, and evasion of innate immunity.,” *Cell Microbiol*, vol. 19, no. 10, Oct. 2017, doi: 10.1111/cmi.12762.
- [402] K. Subramanian, B. Henriques-Normark, and S. Normark, “Emerging concepts in the pathogenesis of the *Streptococcus pneumoniae*: From nasopharyngeal colonizer to intracellular pathogen.,” *Cell Microbiol*, vol. 21, no. 11, p. e13077, Nov. 2019, doi: 10.1111/cmi.13077.
- [403] Z. Cheng *et al.*, “Pathogenic bacteria exploit transferrin receptor transcytosis to penetrate the blood–brain barrier,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 120, no. 39, Sep. 2023, doi: 10.1073/pnas.2307899120.
- [404] H. de Graaf *et al.*, “Controlled human infection with *Bordetella pertussis* induces asymptomatic, immunizing colonization,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 71, no. 2, pp. 403–411, Jul. 2020, doi: 10.1093/cid/ciz840.
- [405] M. Bianchi, R. Sivarajan, T. Walles, S. Hackenberg, and M. Steinke, “Susceptibility of primary human airway epithelial cells to *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin in two- and three-dimensional culture conditions,” *Innate Immun*, vol. 27, no. 1, pp. 89–98, Jan. 2021, doi: 10.1177/1753425920979354.

- [406] G. M. Donato, C. S. Goldsmith, C. D. Paddock, J. C. Eby, M. C. Gray, and E. L. Hewlett, "Delivery of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin to target cells via outer membrane vesicles," *FEBS Lett*, vol. 586, no. 4, pp. 459–465, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.febslet.2012.01.032.
- [407] J. Y. Kim, U. S. Sajjan, G. P. Krasan, and J. J. LiPuma, "Disruption of tight junctions during traversal of the respiratory epithelium by Burkholderia cenocepacia," *Infect Immun*, vol. 73, no. 11, pp. 7107–7112, Nov. 2005, doi: 10.1128/IAI.73.11.7107-7112.2005.
- [408] F. Blank, B. M. Rothen-Rutishauser, S. Schurch, and P. Gehr, "An Optimized In Vitro Model of the Respiratory Tract Wall to Study Particle Cell Interactions," 2006.
- [409] H. L. Winton *et al.*, "Cell lines of pulmonary and non-pulmonary origin as tools to study the effects of house dust mite proteinases on the regulation of epithelial permeability," 1998.
- [410] Y. Grumbach, N. Vu, T. Quynh, R. Chiron, and V. Urbach, "LXA 4 stimulates ZO-1 expression and transepithelial electrical resistance in human airway epithelial (16HBE14o-) cells," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 296, pp. 101–108, 2009, doi: 10.1152/ajplung.00018.2008.-Lipoxin.
- [411] L. Droessler, V. Cornelius, A. G. Markov, and S. Amasheh, "Tumor Necrosis Factor Alpha Effects on the Porcine Intestinal Epithelial Barrier Include Enhanced Expression of TNF Receptor 1.," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 16, Aug. 2021, doi: 10.3390/ijms22168746.
- [412] S. Hatayama *et al.*, "Cellular tight junctions prevent effective Campylobacter jejuni invasion and inflammatory barrier disruption promoting bacterial invasion from lateral membrane in polarized intestinal epithelial cells," *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 8, no. JAN, Jan. 2018, doi: 10.3389/fcimb.2018.00015.
- [413] C. Wegele *et al.*, "Non-typeable haemophilus influenzae invade choroid plexus epithelial cells in a polar fashion," *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 16, pp. 1–24, Aug. 2020, doi: 10.3390/ijms21165739.
- [414] S. B. Cohen *et al.*, "Alveolar Macrophages Provide an Early Mycobacterium tuberculosis Niche and Initiate Dissemination," *Cell Host Microbe*, vol. 24, no. 3, pp. 439-446.e4, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.chom.2018.08.001.
- [415] M. P. Franco, M. Mulder, R. H. Gilman, and H. L. Smits, "Human brucellosis," *Lancet Infect Dis*, vol. 7, no. 12, pp. 775–786, Dec. 2007, doi: 10.1016/S1473-3099(07)70286-4.
- [416] J.-A. Herweg and T. Rudel, "Interaction of Chlamydiae with human macrophages.," *FEBS J*, vol. 283, no. 4, pp. 608–18, Feb. 2016, doi: 10.1111/febs.13609.
- [417] T. Hanawa, T. Yamamoto, and S. Kamiya, "Listeria monocytogenes can grow in macrophages without the aid of proteins induced by environmental stresses," *Infect Immun*, vol. 63, no. 12, pp. 4595–4599, Dec. 1995, doi: 10.1128/iai.63.12.4595-4599.1995.
- [418] J. M. Warfel, J. Beren, V. K. Kelly, G. Lee, and T. J. Merkel, "Nonhuman primate model of pertussis," *Infect Immun*, vol. 80, no. 4, pp. 1530–1536, Apr. 2012, doi: 10.1128/IAI.06310-11.
- [419] J. M. Warfel and T. J. Merkel, "The baboon model of pertussis: Effective use and lessons for pertussis vaccines," *Expert Review of Vaccines*, vol. 13, no. 10. Expert Reviews Ltd., pp. 1241–1252, Oct. 01, 2014. doi: 10.1586/14760584.2014.946016.

- [420] D. Shi, G. Mi, M. Wang, and T. J. Webster, “In vitro and ex vivo systems at the forefront of infection modeling and drug discovery,” *Biomaterials*, vol. 198, pp. 228–249, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.10.030.
- [421] H. Wan *et al.*, “Tight junction properties of the immortalized human bronchial epithelial cell lines Calu-3 and 16HBE14o-,” *Eur Respir J*, vol. 15, no. 6, pp. 1058–1068, Jun. 2000.
- [422] V. Malya, K. R. Paudel, G. De Rubis, N. G. Hansbro, P. M. Hansbro, and K. Dua, “Cigarette smoking induces lung cancer tumorigenesis via upregulation of the WNT/ β -catenin signaling pathway,” *Life Sci*, vol. 326, p. 121787, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.lfs.2023.121787.
- [423] C. Duff, P. G. Murphy, M. Callaghan, and S. McClean, “Differences in invasion and translocation of *Burkholderia cepacia* complex species in polarised lung epithelial cells in vitro,” *Microb Pathog*, vol. 41, no. 4–5, pp. 183–192, Oct. 2006, doi: 10.1016/j.micpath.2006.07.005.
- [424] M. Del Mar Cendra and E. Torrents, “Differential adaptability between reference strains and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* into the lung epithelium intracellular lifestyle,” *Virulence*, vol. 11, no. 1, pp. 862–876, Jan. 2020, doi: 10.1080/21505594.2020.1787034.
- [425] N. Möller, S. Ziesemer, P. Hildebrandt, N. Assenheimer, U. Völker, and J. P. Hildebrandt, “S. aureus alpha-toxin monomer binding and heptamer formation in host cell membranes-Do they determine sensitivity of airway epithelial cells toward the toxin?,” *PLoS One*, vol. 15, no. 5, May 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0233854.
- [426] I. Bucior, J. F. Pielage, and J. N. Engel, “*Pseudomonas aeruginosa* Pili and Flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium,” *PLoS Pathog*, vol. 8, no. 4, Apr. 2012, doi: 10.1371/journal.ppat.1002616.
- [427] A. Lee *et al.*, “Airway epithelial tight junctions and binding and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa*,” *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 277, no. 1 21-1, 1999, doi: 10.1152/ajplung.1999.277.1.l204.
- [428] B. Aroeti, G. Friedman, E. Zlotkin-Rivkin, and M. S. Donnenberg, “Retraction of enteropathogenic *E. coli* type IV pili promotes efficient host cell colonization, effector translocation and tight junction disruption,” *Gut Microbes*, vol. 3, no. 3, pp. 267–271, 2012, doi: 10.4161/gmic.19814.
- [429] S. Kügler, K. Böcker, G. Heusipp, L. Greune, K. S. Kim, and M. A. Schmidt, “Pertussis toxin transiently affects barrier integrity, organelle organization and transmigration of monocytes in a human brain microvascular endothelial cell barrier model,” *Cell Microbiol*, vol. 9, no. 3, pp. 619–632, Mar. 2007, doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00813.x.
- [430] Y. Wakimoto *et al.*, “The First Reported Case of *Bordetella pertussis* Bacteremia in a Patient With Human Immunodeficiency Virus Infection,” *Open Forum Infect Dis*, vol. 9, no. 3, p. ofac020, Mar. 2022, doi: 10.1093/ofid/ofac020.
- [431] J. Chun and A. Prince, “TLR2-induced calpain cleavage of epithelial junctional proteins facilitates leukocyte transmigration,” *Cell Host Microbe*, vol. 5, no. 1, pp. 47–58, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.chom.2008.11.009.
- [432] C. Martín, G. Gómez-Bilbao, and H. Ostolaza, “*Bordetella* adenylate cyclase toxin promotes calcium entry into both CD11b+ and CD11b- cells through cAMP-dependent

- L-type-like calcium channels.” *J Biol Chem*, vol. 285, no. 1, pp. 357–64, Jan. 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.003491.
- [433] K. B. Uribe, A. Etxebarria, C. Martín, and H. Ostolaza, “Calpain-Mediated Processing of Adenylate Cyclase Toxin Generates a Cytosolic Soluble Catalytically Active N-Terminal Domain.” *PLoS One*, vol. 8, no. 6, p. e67648, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0067648.
- [434] L. Bumba, J. Masin, R. Fiser, and P. Sebo, “Bordetella adenylate cyclase toxin mobilizes its b2 integrin receptor into lipid rafts to accomplish translocation across target cell membrane in two steps,” *PLoS Pathog*, vol. 6, no. 5, pp. 1–15, May 2010, doi: 10.1371/journal.ppat.1000901.
- [435] A. P. Barnes *et al.*, “Phosphodiesterase 4D forms a cAMP diffusion barrier at the apical membrane of the airway epithelium,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 9, pp. 7997–8003, Mar. 2005, doi: 10.1074/jbc.M407521200.
- [436] S. Sarrazin, W. C. Lamanna, and J. D. Esko, “Heparan sulfate proteoglycans.” *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 3, no. 7, Jul. 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a004952.
- [437] J. M. Pilewski, J. D. Latoche, S. M. Arcasoy, and S. M. Albelda, “Expression of integrin cell adhesion receptors during human airway epithelial repair in vivo,” 1997. [Online]. Available: www.physiology.org/journal/ajplung
- [438] M. Cristina Plotkowski *et al.*, “Pseudomonas aeruginosa Internalization by Human Epithelial Respiratory Cells Depends on Cell Differentiation, Polarity, and Junctional Complex Integrity,” 1999. [Online]. Available: www.atsjournals.org
- [439] M. Di Pietro, S. Filardo, S. Romano, and R. Sessa, “Chlamydia trachomatis and chlamydia pneumoniae interaction with the host: Latest advances and future prospective,” *Microorganisms*, vol. 7, no. 5. MDPI AG, May 01, 2019. doi: 10.3390/microorganisms7050140.
- [440] X. T. Cheng, Y. X. Xie, B. Zhou, N. Huang, T. Farfel-Becker, and Z. H. Sheng, “Characterization of LAMP1-labeled nondegradative lysosomal and endocytic compartments in neurons,” *Journal of Cell Biology*, vol. 217, no. 9, pp. 3127–3139, Sep. 2018, doi: 10.1083/jcb.201711083.
- [441] L. I. Bouwman, P. Niewold, and J. P. M. van Putten, “Basolateral invasion and trafficking of Campylobacter jejuni in polarized epithelial cells.” *PLoS One*, vol. 8, no. 1, p. e54759, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0054759.
- [442] U. S. Sajjan, J. H. Yang, M. B. Hershenson, and J. J. LiPuma, “Intracellular trafficking and replication of Burkholderia cenocepacia in human cystic fibrosis airway epithelial cells,” *Cell Microbiol*, vol. 8, no. 9, pp. 1456–1466, Sep. 2006, doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00724.x.
- [443] M. R. Terebiznik *et al.*, “Helicobacter pylori VacA toxin promotes bacterial intracellular survival in gastric epithelial cells,” *Infect Immun*, vol. 74, no. 12, pp. 6599–6614, Dec. 2006, doi: 10.1128/IAI.01085-06.
- [444] I. U. Mysorekar and S. J. Hultgren, “Mechanisms of uropathogenic Escherichia coli persistence and eradication from the urinary tract,” 2006. [Online]. Available: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0602136103
- [445] C. G. Zhang, B. A. Chromy, and S. L. McCutchen-Maloney, “Host–pathogen interactions: a proteomic view,” *Expert Rev Proteomics*, vol. 2, no. 2, pp. 187–202, Apr. 2005, doi: 10.1586/14789450.2.2.187.

- [446] M. Coiras, E. Camafeita, M. R. López-Huertas, E. Calvo, J. A. López, and J. Alcamí, “Application of proteomics technology for analyzing the interactions between host cells and intracellular infectious agents.,” *Proteomics*, vol. 8, no. 4, pp. 852–73, Feb. 2008, doi: 10.1002/pmic.200700664.
- [447] F. Schmidt and U. Völker, “Proteome analysis of host–pathogen interactions: Investigation of pathogen responses to the host cell environment,” *Proteomics*, vol. 11, no. 15, pp. 3203–3211, Aug. 2011, doi: 10.1002/pmic.201100158.
- [448] D. Bumann, “Pathogen proteomes during infection: A basis for infection research and novel control strategies,” *J Proteomics*, vol. 73, no. 11, pp. 2267–2276, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.jprot.2010.08.004.
- [449] P. Cash, “Proteomics of bacterial pathogens,” *Expert Opin Drug Discov*, vol. 3, no. 5, pp. 461–473, May 2008, doi: 10.1517/17460441.3.5.461.
- [450] J. C. Betts, P. T. Lukey, L. C. Robb, R. A. McAdam, and K. Duncan, “Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling,” *Mol Microbiol*, vol. 43, no. 3, pp. 717–731, Feb. 2002, doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02779.x.
- [451] S. M. Twine *et al.*, “In vivo proteomic analysis of the intracellular bacterial pathogen, *Francisella tularensis*, isolated from mouse spleen,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 345, no. 4, pp. 1621–1633, Jul. 2006, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.05.070.
- [452] Y. Abu Kwaik, B. I. Eisenstein, and N. C. Engleberg, “Phenotypic modulation by *Legionella pneumophila* upon infection of macrophages.,” *Infect Immun*, vol. 61, no. 4, pp. 1320–9, Apr. 1993, doi: 10.1128/iai.61.4.1320-1329.1993.
- [453] Y. Bechah *et al.*, “Genomic, proteomic, and transcriptomic analysis of virulent and avirulent *Rickettsia prowazekii* reveals its adaptive mutation capabilities.,” *Genome Res*, vol. 20, no. 5, pp. 655–63, May 2010, doi: 10.1101/gr.103564.109.
- [454] R. E. Molestina, J. B. Klein, R. D. Miller, W. H. Pierce, J. A. Ramirez, and J. T. Summersgill, “Proteomic analysis of differentially expressed *Chlamydia pneumoniae* genes during persistent infection of HEp-2 cells.,” *Infect Immun*, vol. 70, no. 6, pp. 2976–81, Jun. 2002, doi: 10.1128/IAI.70.6.2976-2981.2002.
- [455] M. Ogawa *et al.*, “Proteomic analysis of *Rickettsia felis* highlights the expression profile of intracellular bacteria,” *Proteomics*, vol. 7, no. 8, pp. 1232–1248, Apr. 2007, doi: 10.1002/pmic.200600721.
- [456] E. Fernández-Arenas *et al.*, “Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction.,” *Mol Cell Proteomics*, vol. 6, no. 3, pp. 460–78, Mar. 2007, doi: 10.1074/mcp.M600210-MCP200.
- [457] D. Becker *et al.*, “Robust *Salmonella* metabolism limits possibilities for new antimicrobials.,” *Nature*, vol. 440, no. 7082, pp. 303–7, Mar. 2006, doi: 10.1038/nature04616.
- [458] M. R. Wilkins *et al.*, “Guidelines for the next 10 years of proteomics.,” *Proteomics*, vol. 6, no. 1, pp. 4–8, Jan. 2006, doi: 10.1002/pmic.200500856.
- [459] F. Schmidt *et al.*, “Time-resolved quantitative proteome profiling of host-pathogen interactions: the response of *Staphylococcus aureus* RN1HG to internalisation by human airway epithelial cells.,” *Proteomics*, vol. 10, no. 15, pp. 2801–11, Aug. 2010, doi: 10.1002/pmic.201000045.

- [460] G. Baggerman, E. Vierstraete, A. De Loof, and L. Schoofs, “Gel-Based Versus Gel-Free Proteomics: A Review,” *Comb Chem High Throughput Screen*, vol. 8, no. 8, pp. 669–677, Dec. 2005, doi: 10.2174/138620705774962490.
- [461] K. A. Neilson *et al.*, “Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry,” *Proteomics*, vol. 11, no. 4, pp. 535–53, Feb. 2011, doi: 10.1002/pmic.201000553.
- [462] M. Bantscheff, M. Schirle, G. Sweetman, J. Rick, and B. Kuster, “Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 389, no. 4, pp. 1017–31, Oct. 2007, doi: 10.1007/s00216-007-1486-6.
- [463] Z. Li, R. M. Adams, K. Chourey, G. B. Hurst, R. L. Hettich, and C. Pan, “Systematic comparison of label-free, metabolic labeling, and isobaric chemical labeling for quantitative proteomics on LTQ Orbitrap Velos,” *J Proteome Res*, vol. 11, no. 3, pp. 1582–90, Mar. 2012, doi: 10.1021/pr200748h.
- [464] T. K. Wood, S. J. Knabel, and B. W. Kwan, “Bacterial persister cell formation and dormancy,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 79, no. 23, pp. 7116–7121, Dec. 2013, doi: 10.1128/AEM.02636-13.
- [465] J. Alvarez Hayes, Y. Lamberti, K. Surmann, F. Schmidt, U. Völker, and M. E. Rodriguez, “Shotgun proteome analysis of *Bordetella pertussis* reveals a distinct influence of iron availability on the bacterial metabolism, virulence, and defense response,” *Proteomics*, vol. 15, no. 13, pp. 2258–2266, 2015, doi: 10.1002/pmic.201400512.
- [466] S. Elsen, L. R. Swem, D. L. Swem, and C. E. Bauer, “RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system,” *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 68, no. 2, pp. 263–79, Jun. 2004, doi: 10.1128/MMBR.68.2.263-279.2004.
- [467] A. Rivera-Millot *et al.*, “Characterization of a Bvg-regulated fatty acid methyltransferase in *Bordetella pertussis*,” *PLoS One*, vol. 12, no. 5, May 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0176396.
- [468] S. R. Hennigar and J. P. McClung, “Nutritional Immunity: Starving Pathogens of Trace Minerals,” *Am J Lifestyle Med*, vol. 10, no. 3, pp. 170–173, 2016, doi: 10.1177/1559827616629117.
- [469] C. H. Moore, L. A. Foster, D. G. Gerbig, D. W. Dyer, and B. W. Gibson, “Identification of alcaligin as the siderophore produced by *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*,” *J Bacteriol*, vol. 177, no. 4, pp. 1116–8, Feb. 1995, doi: 10.1128/jb.177.4.1116-1118.1995.
- [470] B. Beall and G. N. Sanden, “A *Bordetella pertussis* *fepA* homologue required for utilization of exogenous ferric enterobactin,” *Microbiology (Reading)*, vol. 141 (Pt 12), pp. 3193–205, Dec. 1995, doi: 10.1099/13500872-141-12-3193.
- [471] C. K. Vanderpool and S. K. Armstrong, “The *Bordetella* *bhu* locus is required for heme iron utilization,” *J Bacteriol*, vol. 183, no. 14, pp. 4278–87, Jul. 2001, doi: 10.1128/JB.183.14.4278-4287.2001.
- [472] T. J. Brickman, R. J. Suhadolc, and S. K. Armstrong, “Interspecies variations in *Bordetella* catecholamine receptor gene regulation and function,” *Infect Immun*, vol. 83, no. 12, pp. 4639–4652, 2015, doi: 10.1128/IAI.00787-15.
- [473] T. J. Brickman and S. K. Armstrong, “Iron and pH-responsive FtrABCD ferrous iron utilization system of *Bordetella* species,” *Mol Microbiol*, vol. 86, no. 3, pp. 580–593, Nov. 2012, doi: 10.1111/mmi.12003.

- [474] W. Eisenreich, T. Rudel, J. Heesemann, and W. Goebel, “Persistence of Intracellular Bacterial Pathogens-With a Focus on the Metabolic Perspective.,” *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 10, p. 615450, 2020, doi: 10.3389/fcimb.2020.615450.
- [475] I. Rivera *et al.*, “Conservation of Ancient Genetic Pathways for Intracellular Persistence Among Animal Pathogenic Bordetellae,” *Front Microbiol*, vol. 10, Dec. 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.02839.
- [476] D. Beier and R. Gross, “Regulation of bacterial virulence by two-component systems,” *Curr Opin Microbiol*, vol. 9, no. 2, pp. 143–152, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.mib.2006.01.005.
- [477] L. Coutte *et al.*, “The multifaceted RisA regulon of *Bordetella pertussis*,” *Sci Rep*, vol. 6, Sep. 2016, doi: 10.1038/srep32774.
- [478] C. N. Paiva and M. T. Bozza, “Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens?,” *Antioxid Redox Signal*, vol. 20, no. 6, pp. 1000–1037, Feb. 2014, doi: 10.1089/ars.2013.5447.
- [479] C. Belon, C. Soscia, A. Bernut, A. Laubier, S. Bleves, and A. B. Blanc-Potard, “A Macrophage Subversion Factor Is Shared by Intracellular and Extracellular Pathogens,” *PLoS Pathog*, vol. 11, no. 6, Jun. 2015, doi: 10.1371/journal.ppat.1004969.
- [480] K. K. Huynh and S. Grinstein, “Regulation of Vacuolar pH and Its Modulation by Some Microbial Species,” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 71, no. 3, pp. 452–462, Sep. 2007, doi: 10.1128/mmbr.00003-07.
- [481] A. Robinson, L. I. Irons, and L. A. Ashworth, “Pertussis vaccine: present status and future prospects.,” *Vaccine*, vol. 3, no. 1, pp. 11–22, Mar. 1985, doi: 10.1016/0264-410x(85)90004-0.
- [482] C. R. Manclark and D. L. Burns, “Prospects for a new acellular pertussis vaccine.,” *Ann Inst Pasteur Microbiol (1985)*, vol. 136B, no. 3, pp. 323–9, 1985, doi: 10.1016/s0769-2609(85)80077-6.
- [483] R. D. Shahin, M. J. Brennan, Z. M. Li, B. D. Meade, and C. R. Manclark, “Characterization of the protective capacity and immunogenicity of the 69-kD outer membrane protein of *Bordetella pertussis*.,” *J Exp Med*, vol. 171, no. 1, pp. 63–73, Jan. 1990, doi: 10.1084/jem.171.1.63.
- [484] S. Lee and M. T. Nguyen, “Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases.,” *Immune Netw*, vol. 15, no. 2, pp. 51–7, Apr. 2015, doi: 10.4110/in.2015.15.2.51.
- [485] H. S. Warren, F. R. Vogel, and L. A. Chedid, “Current status of immunological adjuvants.,” *Annu Rev Immunol*, vol. 4, pp. 369–88, 1986, doi: 10.1146/annurev.iy.04.040186.002101.
- [486] F. R. Vogel, “Immunologic adjuvants for modern vaccine formulations.,” *Ann N Y Acad Sci*, vol. 754, pp. 153–60, May 1995, doi: 10.1111/j.1749-6632.1995.tb44448.x.
- [487] S. Esposito *et al.*, “Pertussis prevention: Reasons for resurgence, and differences in the current acellular pertussis vaccines,” *Front Immunol*, vol. 10, no. JUL, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.01344.
- [488] C. Angely *et al.*, “Functional and structural consequences of epithelial cell invasion by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin.,” *PLoS One*, vol. 15, no. 5, p. e0228606, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0228606.

- [489] J. Novak *et al.*, “Structure-Function Relationships Underlying the Capacity of Bordetella Adenylate Cyclase Toxin to Disarm Host Phagocytes.,” *Toxins (Basel)*, vol. 9, no. 10, Sep. 2017, doi: 10.3390/toxins9100300.
- [490] N. Guiso, “Bordetella adenylate cyclase-hemolysin toxins,” *Toxins*, vol. 9, no. 9. MDPI AG, Sep. 11, 2017. doi: 10.3390/toxins9090277.
- [491] J. Chen *et al.*, “Legionella effectors that promote nonlytic release from protozoa.,” *Science*, vol. 303, no. 5662, pp. 1358–61, Feb. 2004, doi: 10.1126/science.1094226.
- [492] H. Takeuchi, N. Furuta, I. Morisaki, and A. Amano, “Exit of intracellular Porphyromonas gingivalis from gingival epithelial cells is mediated by endocytic recycling pathway.,” *Cell Microbiol*, vol. 13, no. 5, pp. 677–91, May 2011, doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01564.x.
- [493] Y. Miao, G. Li, X. Zhang, H. Xu, and S. N. Abraham, “A TRP Channel Senses Lysosome Neutralization by Pathogens to Trigger Their Expulsion.,” *Cell*, vol. 161, no. 6, pp. 1306–19, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.05.009.
- [494] K. Hybiske and R. S. Stephens, “Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium Chlamydia.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 27, pp. 11430–5, Jul. 2007, doi: 10.1073/pnas.0703218104.
- [495] L. J. Runyen-Janecky, S. A. Reeves, E. G. Gonzales, and S. M. Payne, “Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, Iuc, and Feo Iron Acquisition Systems to Iron Acquisition In Vitro and in Cultured Cells,” *Infect Immun*, vol. 71, no. 4, pp. 1919–1928, Apr. 2003, doi: 10.1128/IAI.71.4.1919-1928.2003.
- [496] N. M. Pérez and G. Ramakrishnan, “The Reduced Genome of the Francisella tularensis Live Vaccine Strain (LVS) Encodes Two Iron Acquisition Systems Essential for Optimal Growth and Virulence,” *PLoS One*, vol. 9, no. 4, p. e93558, Apr. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0093558.
- [497] R. D. Perry, I. Mier, and J. D. Fetherston, “Roles of the Yfe and Feo transporters of Yersinia pestis in iron uptake and intracellular growth.,” *Biometals*, vol. 20, no. 3–4, pp. 699–703, Jun. 2007, doi: 10.1007/s10534-006-9051-x.