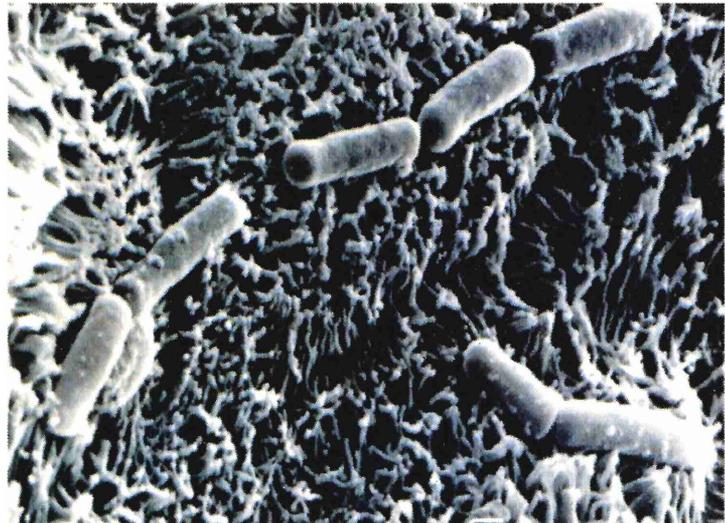




*UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA.
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA*

*Bacillus cereus: ESTUDIOS IN VITRO DE FACTORES DE
VIRULENCIA RELEVANTES EN EL CONTEXTO DE
INFECCIONES INTESTINALES.*



TESIS DOCTORAL

JESSICA MINNAARD

DIRECTOR: DR PABLO F. PEREZ

El presente trabajo, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos y en la Cátedra de Microbiología, bajo la dirección del Dr. Pablo F. Pérez.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Cristina Añón y a la Dra. Noemí Zaritzky por abrirme las puertas de CIDCA y permitirme trabajar allí.
- A la Dra. Graciela De Antoni, porque me brindó la posibilidad de iniciar el camino de la investigación, y sobre todo, porque siempre creyó en mí.
- Al Dr. Pablo Pérez, mi director, porque me estimuló a ser artífice de mis logros, me ayudó a reflexionar sobre los errores y siempre me alienta a continuar.
- A la Universidad Nacional de La Plata y al Departamento de Ciencias Biológicas, por su apoyo económico para la realización de este trabajo de tesis.
- A mis compañeros del laboratorio de microbiología del CIDCA, los de ayer, los de hoy y los de siempre, y a mis compañeros de la cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), porque no sólo estuvieron a mi lado en los experimentos.
- A mis compañeros del CIDCA, por acompañarme incluso fuera del ámbito de trabajo.
- A Micaela e Ivanna, con quienes compartimos las cepas, por su inestimable colaboración, sobre todo en la última etapa de los experimentos.
- A la Dra Susana Jurado de la Facultad de Ciencias Veterinarias por la dedicación en la obtención de las imágenes de microscopía electrónica de transmisión.
- A la Lic. Patricia Sarmiento por la dedicación en la obtención de las imágenes de microscopía electrónica de barrido.
- Al Dr. Alain Servin del Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale de Paris (France) y al Dr. Yves Tirilly de Ecole Supérieure de Microbiologie et Sécurité Alimentaire de Brest (France), y sus colaboradores, por las facilidades brindadas para la utilización del equipamiento de sus laboratorios.
- A la Dra Liliana Semorile de la Universidad Nacional de Quilmes y su grupo de trabajo, en especial la Dra. Lucrecia Delfederico, con la invaluable colaboración en la realización de las PCR.
- A mi familia, sostén de todos mis actos.
- A Miguel, por su amor. Sin él esto no hubiese empezado y mucho menos llegado hasta acá.
- A Dios, por su infinita Misericordia y por darme una segunda oportunidad.

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis Doctoral han sido parcialmente publicados en los siguientes artículos y actas de congresos:

1. **Humen, M.; Minnaard, J. and Pérez, P. F.** Effect of Enterotoxigenic *Bacillus cereus* on Enterocyte-like Cells and Eritrocytes. Pages 740-744 in Proceedings of the XVII International Symposium of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene. Veldhoven, Netherlands, 1999.
2. **Minnaard, J; Humen, M; Pérez, P. F.** 2001. Effect of *Bacillus cereus* Exocellular Factors on Human Intestinal Epithelial Cell.. Journal of Food Protection . **64** :1535-1541.
3. **Hugo, A. A.; Minnaard, J. y Pérez, P. F.** 2003. “Evaluación de un Método Colorimétrico para el Estudio de la Interacción Entre Microorganismos y Células del Epitelio Intestinal”. Revista Argentina de Microbiología. **35**: 188-192.
4. **Minnaard, J.; Lievin-Le Moal, V.; Coconnier, M.; Servin, A.; and Pérez, P.** Disassembly of F-Actin Cytoskeleton After Interaction of *Bacillus cereus* With Fully Differentiates Human Intestinal Caco-2 Cells. 2004. Infection and Immunity. **72**: 3106-3112
5. **Minnaard, J.; Delfederico, L.; Vasseur, V.; Hollmann, A.; Rolny, I.; Semorile, L.; and Pérez, P.** 2007. Virulence of *Bacillus cereus*: A Multivariate Analysis. International Journal of Food Microbiology. **116**: 197-206.

INDICE

Índice General.....	I
Índice de Figuras.....	VI
Índice de Tablas.....	VII
Abreviaturas.....	VIII
Prólogo.....	X

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCION

I. 1. Generalidades.....	1
I. 2. Mecanismos de defensa del hospedador.....	2
I. 3. Factores de virulencia	
Toxinas.....	4
Adhesión.....	7
Invasión.....	9
Modelos de estudio.....	13
I. 4. <i>Bacillus cereus</i>	14

II. OBJETIVOS

II. 1. Objetivo general	20
II. 2. Objetivos particulares.....	20

III. MATERIALES Y METODOS

Cepario de trabajo.....	21
III. 1. ESTUDIO DE LOS FACTORES EXTRACELULARES DE <i>Bacillus cereus</i>	
Obtención de sobrenadantes.....	22
Determinación de enterotoxina.....	22
Efecto biológico de los sobrenadantes	
Efecto hemolítico	
Preparación de la suspensión de glóbulos rojos.....	22
Capacidad hemolítica	22
Experimento de protección osmótica.....	23
Efecto citopático	
Determinación de la integridad de monocapas de enterocitos humanos en cultivo mediante coloración de cristal violeta.....	23
Estabilidad térmica de factores extracelulares.....	23
Microscopía electrónica de barrido.....	23
Marcación fluorescente del citoesqueleto.....	24
Medición de la actividad deshidrogenasa mitocondrial.....	25
Marcación de fosfatidilserina de la membrana citoplasmática.	
Diferenciación entre apoptosis y necrosis.....	25
Determinación de la concentración de proteínas en los sobrenadantes.....	26

III. 2. ESTUDIO DE INFECCIÓN DE CELULAS EPITELIALES EN CULTIVO POR <i>Bacillus cereus</i>	
Infección de las células Caco-2.....	27
Asociación de <i>Bacillus cereus</i> a células de epitelio intestinal humano en cultivo.	
Puesta a punto del sistema para determinar asociación	
Relación A600nm y ufc/ml.....	27
Determinación de la dosis bacteriana que desprende la monocapa de enterocitos en cultivo.....	27
Determinación de la CIM de cloranfenicol en medio DMEM para cepas de <i>Bacillus cereus</i>	27
Cuantificación de la asociación.....	27
Estudios por microscopía electrónica	
Microscopía de barrido.....	28
Microscopía de transmisión.....	28
Invasión a células Caco-2 por cepas de <i>Bacillus cereus</i>	
Puesta a punto del sistema para determinar invasión	
Proporción de microorganismos esporulados en cultivos de <i>Bacillus cereus</i>	28
Determinación de la efectividad de la dosis de gentamicina.....	29
Cuantificación de la invasión.....	29
Localización de los microorganismos invasivos por microscopía	
Microscopía confocal	30
Microscopía de transmisión.....	30
Factores involucrados en la interacción <i>Bacillus cereus</i> -enterocito	
Efecto de la concentración microbiana.....	30
Hidrofobicidad superficial.....	30
Naturaleza de las estructuras involucradas en la asociación.....	31
Efecto de factores extracelulares sobre la asociación.....	31
Efecto del calcio sobre la asociación.....	31
Efecto del tiempo de diferenciación celular sobre la asociación....	32
Determinación del daño celular producido a las células Caco-2 por la infección de <i>Bacillus cereus</i>	
Estudio del citoesqueleto de los enterocitos infectados.....	31
Efecto sobre la viabilidad celular: apoptosis-necrosis.....	32
Estudio de las vías de señalización involucradas en la infección de células Caco-2 por <i>Bacillus cereus</i>	
Estudio del citoesqueleto de las células epiteliales luego de la infección con <i>Bacillus cereus</i> en presencia de inhibidores de las vías de señalización.....	33
Efecto de los inhibidores de las vías de los lípidos fosforilados sobre la adhesión-invasión de la cepa T1.....	33
Efecto de los inhibidores de las vías de señalización por lípidos fosforilados sobre el desprendimiento de enterocitos luego de la infección con cepas de <i>Bacillus cereus</i>	33
III. 3. ANÁLISIS MULTIVARIADO DE FACTORES DE VIRULENCIA	
Ribotipificación.....	33
PCR.....	34
Relación entre actividad biológica y presencia de los genes de virulencia..	35

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV. 1. ESTUDIO DE LOS FACTORES EXTRACELULARES

de *Bacillus cereus*

Determinación de enterotoxina.....	36
Efecto biológico de los sobrenadantes	
Efecto hemolítico	
Capacidad hemolítica.....	37
Experimento de protección osmótica.....	37
Efecto citopático	
Efecto sobre la integridad de monocapas de enterocitos humanos en cultivo.....	38
Estabilidad térmica de factores extracelulares.....	40
Observación mediante Microscopía Electrónica de barrido	41
Efecto del sobrenadante sobre el citoesqueleto de las células eucarióticas.....	42
Actividad deshidrogenasa mitocondrial.....	45
Marcación de fosfatidilserina de la membrana citoplasmática.	
Diferenciación entre apoptosis y necrosis.....	46
Discusión.....	49

IV. 2. ESTUDIO DE INFECCIÓN DE CELULAS EPITELIALES

EN CULTIVO POR *Bacillus cereus*

Asociación de *Bacillus cereus* a células de epitelio intestinal humano en cultivo

Puesta a punto del sistema para determinar asociación	
Determinación de la dosis bacteriana.....	56
Determinación de la CIM de cloranfenicol en medio DMEM para cepas de <i>Bacillus cereus</i>	57
Cuantificación de la asociación.....	58
Estudios por microscopía electrónica	
Microscopía de barrido.....	60
Microscopía de transmisión.....	62
Invasión a células Caco-2 por cepas de <i>Bacillus cereus</i>	
Puesta a punto del sistema para determinar invasión.....	65
Cuantificación de la invasión	67
Localización de los microorganismos invasivos por microscopía.....	68
Factores involucrados en la interacción <i>Bacillus cereus</i> -enterocito.....	71
Hidrofobicidad superficial.....	72
Naturaleza de las estructuras involucradas en la asociación	73
Efecto de factores extracelulares sobre la asociación.....	76
Efecto del calcio sobre la asociación.....	77
Efecto del tiempo de diferenciación celular sobre la asociación....	78
Determinación del daño celular producido a las células Caco-2 por la infección de <i>Bacillus cereus</i>	
Estudio del citoesqueleto de los enterocitos infectados.....	80
Efecto sobre la viabilidad celular: apoptosis-necrosis.....	87
Estudio de las vías de señalización involucradas en la infección de células Caco-2 por <i>Bacillus cereus</i>	
Estudio del citoesqueleto de las células epiteliales luego de la infección con <i>Bacillus cereus</i> en presencia de inhibidores de las vías de señalización.....	88

Efecto de los inhibidores de las vías de los lípidos fosforilados sobre la adhesión-invasión de la cepa T1.....	91
Efecto de los inhibidores de las vías de señalización por lípidos fosforilados sobre el desprendimiento de enterocitos luego de la infección con cepas de <i>Bacillus cereus</i>	92
Discusión.....	93
IV. 3. ANÁLISIS MULTIVARIADO DE FACTORES DE VIRULENCIA	
Ribotipificación.....	106
PCR.....	106
Relación entre actividad biológica y presencia de los genes de virulencia.....	109
Discusión.....	115
V. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.....	121
VI. PERSPECTIVAS.....	123
VII. APENDICE	
Características de las cepas de <i>Bacillus cereus</i> usadas en este estudio	
Aislamiento y caracterización de las cepas de <i>Bacillus cereus</i>	124
Medios de cultivo y soluciones	
Medios de cultivo.....	125
Soluciones de lavado y colorantes.....	126
Coloraciones	
Coloración de Gram.....	126
Coloración con cristal violeta.....	126
Coloración de Dorner.....	126
Cultivo de células Caco-2.....	126
Evaluación de un método colorimétrico para el estudio de la interacción entre microorganismos y células de epitelio intestinal.....	128
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	137

INDICE DE FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Figura 1: Representación esquemática de los 4 grupos de toxinas	5
Figura 2: Esquema de una célula epitelial y de las microvellosidades.....	10
Figura 3: Microscopía de fluorescencia de células Caco-2	10
Figura 4: Microscopía confocal de células Caco-2	10
Figura 5: Células Caco-2 teñidas con Anexina V y Ioduro de propidio.....	12
Figura 6: Patrones de distribución de vellosidades en células Caco-2	14
Figura 7: Microscopía de transmisión de células Caco-2	14

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV. 1. ESTUDIO DE LOS FACTORES EXTRACELULARES

de *Bacillus cereus*

Figura 8: Absorbancia de los sobrenadantes en el test de TECRA	36
Figura 9: Desprendimiento de la monocapa de enterocitos tratadas con sobrenadantes de cultivos de <i>Bacillus cereus</i>	38
Figura 10: Curvas dosis-respuesta de desprendimiento celular	39
Figura 11: Efecto del calentamiento de los sobrenadantes	41
Figura 12: Microscopía electrónica de barrido de células Caco-2	41
Figura 13: Tinción de citoesqueleto de células Caco-2	43
Figura 14: Proyección de planos focales de células Caco-2	43
Figura 15: Galería de imágenes de células Caco-2	44
Figura 16: Efecto de los sobrenadantes sobre la actividad deshidrogenasa mitocondrial de células Caco-2	45
Figura 17: Cinética de actividad deshidrogenasa mitocondrial de células Caco-2..	46
Figura 18: Células Caco-2 teñidas con Anexina V-FITC	47
Figura 19: Células Caco-2 teñidas con Ioduro de propidio	48
Figura 20: Relación concentración de proteína en el sobrenadante vs. necrosis ...	48

IV. 2. ESTUDIO DE INFECCIÓN DE CELULAS EPITELIALES EN CULTIVO

POR *Bacillus cereus*

Figura 21: Relación entre la A600 nm y ufc/ml para la cepa 2	56
Figura 22: Desprendimiento de células Caco-2 incubadas con diferentes dosis de las cepas M2 y 2	57
Figura 23: Microscopía electrónica de barrido de diferentes cepas asociadas a células Caco-2	61
Figura 24: Microscopía electrónica de barrido de <i>Bacillus cereus</i> asociada a Caco-2 en una zona libre de células.....	62
Figura 25: Microscopía óptica de cortes finos para microscopía de transmisión...	63
Figura 26: Microscopía electrónica de transmisión de células Caco-2 infectadas con cepas de <i>Bacillus cereus</i>	64
Figura 27: Curvas de esporulación de <i>Bacillus cereus</i>	66
Figura 28: Integridad de monocapa de enterocitos infectadas con cepas de <i>Bacillus cereus</i>	67
Figura 29: Microscopía confocal de células Caco-2 infectadas con la cepa 2.....	69
Figura 30: Microscopía de transmisión de células Caco-2 infectadas con <i>Bacillus cereus</i>	70
Figura 31: Curva de asociación de la cepa 2 a células Caco-2.....	71
Figura 32: Hidrofobicidad superficial de las cepas de <i>Bacillus cereus</i>	72
Figura 33: Relación entre asociación y la hidrofobicidad superficial.....	73

Figura 34: Efecto de distintos tratamientos sobre la asociación.....	74
Figura 35: Efecto de sobrenadante de la cepa 2 sobre la infección de la misma cepa.....	76
Figura 36: Efecto de sobrenadante de la cepa 2 sobre la infección de la cepa B10502.....	77
Figura 37: Efecto del calcio sobre la infección.....	78
Figura 38: Efecto del tiempo de cultivo celular sobre la infección.....	79
Figura 39: Efecto del infección sobre el citoesqueleto de los enterocitos.....	81
Figura 40: Distribución de F-actina en células Caco-2 infectadas.....	82
Figura 41: Marcación de F-actina de células Caco-2 incubadas con el medio de infección.....	83
Figura 42: Colocalización de la bacteria con el daño del citoesqueleto.....	84
Figura 43: Cinética de asociación de la cepa 2.....	85
Figura 44: Efecto de la infección a distintos tiempos sobre el citoesqueleto.....	86
Figura 45: Células Caco-2 infectadas teñidas con yoduro de propidio.....	87
Figura 46: Estudio del daño al citoesqueleto durante la infección en presencia de distintos inhibidores de vías de señalización.....	89
Figura 47: Esquema de la vía de los lípidos fosforilados.....	90
Figura 48: Estudio del efecto de inhibidores de la vía de los lípidos fosforilados sobre la infección.....	91
Figura 49: Estudio del efecto de inhibidores de la vía de los lípidos fosforilados sobre la integridad de la monocapa.....	92
IV. 3. ANÁLISIS MULTIVARIADO DE FACTORES DE VIRULENCIA	
Figura 50: Patrones genotípicos y análisis por grupos de las cepas de <i>Bacillus cereus</i>	107
Figura 51: Electroforesis en geles de agarosa de los productos PCR.....	108
Figura 52: Análisis mediante biplots de las cepas de <i>Bacillus cereus</i>	113
VII. APENDICE	
Figura 53: Tinción de Gram de <i>Bacillus cereus</i>	124
Figura 54: Tinción de Dorner de <i>Bacillus cereus</i>	124
Figura 55: Relación entre la concentración bacteriana y color desarrollado en la determinación de la actividad nitrato reductasa.....	134
Figura 56: Cinética de nitrato reductasa para diferentes concentraciones bacterianas.....	135
Figura 57: Cálculo de la concentración bacteriana para la determinación por coloración en el método de nitrato reductasa.....	136

INDICE DE TABLAS

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla 1: Enfermedades bacterianas, año de descubrimiento y autor.....	1
---	---

III. MATERIALES Y METODOS

Tabla 2: Cepa de trabajo y origen.....	21
Tabla 3: Primers y temperatura de hibridación.....	35

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV. 1. ESTUDIO DE LOS FACTORES EXTRACELULARES

de *Bacillus cereus*

Tabla 4: Modelo de desprendimiento de los sobrenadantes.....	40
--	----

IV. 2. ESTUDIO DE INFECCIÓN DE CELULAS EPITELIALES EN CULTIVO POR *Bacillus cereus*

Tabla 5: CIM de cloranfenicol para cepas de <i>Bacillus cereus</i>	58
--	----

Tabla 6: Valores de asociación de las cepas de <i>Bacillus cereus</i> a células Caco-2..	59
--	----

Tabla 7: Efecto de la gentamicina sobre <i>Bacillus cereus</i>	66
--	----

Tabla 8: Estudio comparativo de la infección con diferentes dosis de <i>Bacillus cereus</i>	68
--	----

Tabla 9: Estudio de factores involucrados en la asociación.....	75
---	----

Tabla 10: Inhibidores utilizados en los estudios de infección.....	88
--	----

IV. 3. ANÁLISIS MULTIVARIADO DE FACTORES DE VIRULENCIA

Tabla 11: PCR de las cepas estudiadas.....	106
--	-----

Tabla 12: Análisis multivariado de las cepas estudiadas.....	111
--	-----

Tabla 13: Resumen del análisis multivariado.....	112
--	-----

Tabla 14: Autovalores resultantes del análisis de componentes principales.....	112
--	-----

Tabla 15: Autovectores seleccionados para la conformación de los Componentes Principales.....	112
--	-----

Tabla 16: Valores de las variables y Componentes principales de las cepas estudiadas.....	113
--	-----

Tabla 17: Características de las cepas utilizadas en este trabajo de tesis.....	125
---	-----

Tabla 18: Porcentaje de asociación de diferentes microorganismos por dos métodos diferentes.....	136
---	-----

ABREVIATURAS

A _{600nm}	Absorbancia medida a 600 nm
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADP	Adenosin difosfato
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
AN	Agar nutritivo
ARN	Acido ribonucleico
ARNr	Acido ribonucleico ribosomal
BHIG	Caldo cerebro-corazón adicionado con glucosa
CaM	Complejo Ca-Calmodulina
CaMK	Ca-Calmodulina kinasa
CEACAM	Moléculas de adhesión celular relacionadas con antígenos carcinoembriogénicos
CIM	Concentración inhibitoria mínima
COX	Ciclooxigenasa
CV	Cristal violeta
CytK	Citotoxina K de <i>Bacillus cereus</i>
DAG	Diacilglicerol
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GR	Glóbulos rojos
GTP	Guanosintrifosfato
GTPc	Guanosintrifosfato cíclico
HBL	Hemolisina BL de <i>Bacillus cereus</i>
HlyII	Hemolisina II de <i>Bacillus cereus</i>
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Presión
Hs	Hora
ICAM	Moléculas de adhesión intercelular
Ig	Inmunoglobulina
IP ₃	Inositol trifosfato
L	Litro
LDH	Lactato deshidrogenasa
LLO	Listeriolisina O
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Protein quinasas activadas por mitógenos
MDI	Multiplicidad de infección
MEB	Microscopía de barrido
MET	Microscopía de transmisión
mg	Miligramo
Min	Minuto
ml	mililitro
MLC	Cadena liviana de miosina
MLCK	Kinasa de la cadena liviana de miosina
mM	Milimolar

MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
ND	No determinado
NDp	No desprende
NE	No especificado
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NHE	Enterotoxina no hemolítica de <i>Bacillus cereus</i>
NHEA	Componente A de la enterotoxina no hemolítica de <i>Bacillus cereus</i>
NK	Células natural killer
NRLs	Receptor tipo Nod
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Buffer salino fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PG	Prostaglandinas
Pi3K	Fosfatidilinositol-3 quinasa
Pi5K	Fosfatidilinositol-5 quinasa
PiP ₃	Fosfatidil inositol trifosfato
PKA	Protein kinasa A
PKB	Protein quinasa B
PKC	Protein kinasa C
PKG	Protein kinasa G
PLC	Fosfolipasa C
PM	Peso molecular
PMN	Polimorfonucleares
PRMs	Pattern recognition molecules
PS	Fosfatilserina
SLO	Estreptolisina O
SN	Sobrenadantes
Tamb	Temperatura ambiente
TLRs	Receptor tipo Toll
U.V.	Ultravioleta
ufc	Unidades formadoras de colonia
μm	Micrómetro

PROLOGO

En el contexto de las toxoinfecciones intestinales, *Bacillus cereus* está asociado a dos síndromes principales: emético y diarreico, que por su corta duración, en general, transcurren sin que el individuo afectado concorra a centros asistenciales. Pero estos cuadros clínicos pueden adquirir relevancia si ocurren en individuos de corta edad o en ancianos.

La virulencia de *Bacillus cereus* ha sido atribuida tradicionalmente a varios factores extracelulares y se ha sugerido la participación de fenómenos de adhesión a las células de epitelio intestinal, pero numerosos detalles de las interacciones relevantes quedan por definir.

En el presente trabajo de tesis se efectúa un recorrido por diversos aspectos de la interacción entre *Bacillus cereus* y el epitelio intestinal a través de la utilización de un sistema modelo constituido por enterocitos humanos en cultivo (línea Caco-2). Las cepas utilizadas incluyen microorganismos aislados de leche maternizada, leche en polvo, cepas de referencia y cepas aisladas de diferentes brotes.

El estudio consta de tres partes fundamentales:

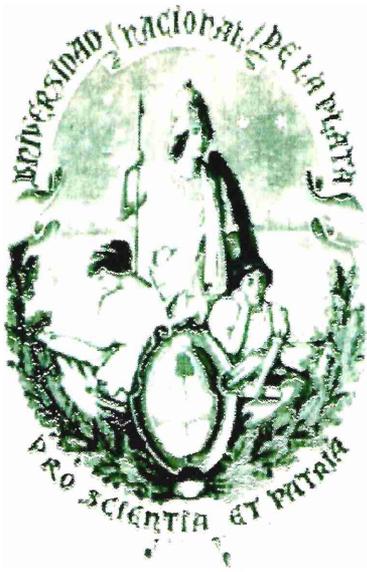
- 1- Estudio de los factores extracelulares de *Bacillus cereus*
- 2- Estudio de infección de células epiteliales en cultivo por *Bacillus cereus*
- 3- Análisis multivariado de factores de virulencia

Se determina la acción de sobrenadantes de cultivos sobre los enterocitos a través de estudios morfológicos y de actividad deshidrogenasa mitocondrial. Posteriormente, en los estudios de adhesión/invasión, se abordan aspectos relacionados con la interacción directa bacteria-enterocito y se realiza un análisis crítico de la determinación de la capacidad de invasión de *Bacillus cereus*.

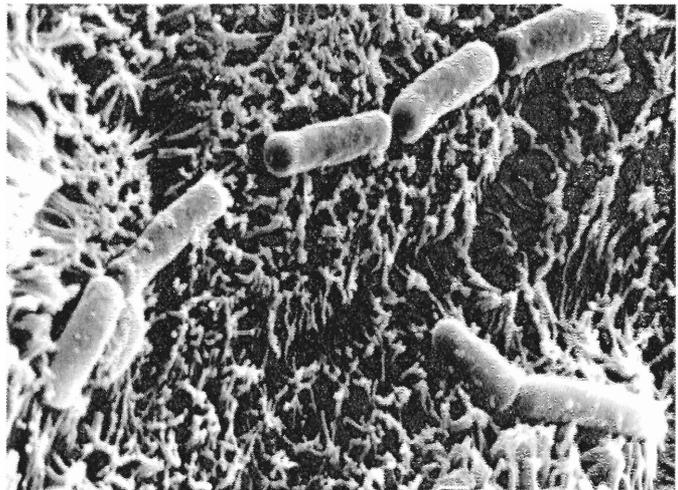
A través de la utilización de inhibidores de diferentes vías de señalización, se realiza una disección de las señales desencadenadas por la infección.

Finalmente, mediante un análisis multivariado, se realiza un agrupamiento de cepas teniendo en cuenta la presencia de secuencias relacionadas con los factores extracelulares conocidos hasta el momento y la actividad biológica de las cepas estudiadas.

Los resultados contenidos en el presente trabajo constituyen un avance en el conocimiento sobre los mecanismos de patogénesis de *Bacillus cereus* y plantean interrogantes que dan lugar a diversas perspectivas para el estudio de este microorganismo.



I. INTRODUCCIÓN GENERAL



I. INTRODUCCIÓN

I. 1. GENERALIDADES

Desde el comienzo de la humanidad, el hombre ha convivido con el mundo microbiano y se ha adaptado para hacer frente a una gran variedad de microbios. Esto es así, ya que, si bien, muchos microorganismos son beneficiosos o bien neutrales para la salud del hombre, otros son capaces de dañarla.

De este último grupo, la mayoría de las bacterias causantes de enfermedades infecciosas en el hombre, fueron descubiertas a fines del Siglo XIX y

principios del Siglo XX: Koch en 1877 demostró que el agente causal del ántrax era una bacteria (*Bacillus anthracis*) y luego se descubrieron muchos de los agentes etiológicos hoy conocidos (Tabla 1). Desde aquellos tiempos las investigaciones han continuado con un importante avance en los últimos años por el uso de las técnicas de biología molecular y celular.

Tabla 1: Bacterias causantes de enfermedades: año de descubrimiento y autor del mismo.

Enfermedad o proceso patológico	Agente causal	Año de descubrimiento	Autor del descubrimiento
Antrax	<i>Bacillus anthracis</i>	1877	R. Koch
Formación de pus	<i>Staphylococcus</i>	1878	R. Koch
Gonoreia	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1879	A.L.S. Neisser
Fiebre tifoidea	<i>Salmonella typhi</i>	1880	C.J. Eberth
Formación de pus	<i>Streptococcus</i>	1881	A. Ogston
Tuberculosis	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1882	R. Koch
Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>	1883	R. Koch
Difteria	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1883	T.A.E. Klebs
Tetanos	<i>Clostridium tetani</i>	1884	A. Nicolaier
Diarrea	<i>Escherichia coli</i>	1885	T. Escherich
Pneumonia	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1886	A. Fraenkel
Meningitis	<i>Neisseria meningitidis</i>	1887	A. Weischselbaum
Intoxicación alimentaria	<i>Salmonella enteritidis</i>	1888	A.A.H. Gaertner
Gangrena gaseosa	<i>Clostridium perfringens</i>	1892	W.H. Welch
Peste bubónica	<i>Yersinia pestis</i>	1894	S. Kitasato/A.J.E. Yersin
Botulismo	<i>Clostridium botulinum</i>	1896	E.M.F. van Ermengem
Disenteria bacilar	<i>Shigella dysenteriae</i>	1898	K. Shiga
Fiebre paratifoidea	<i>Salmonella paratyphi</i>	1900	H. Schottmüller
Sífilis	<i>Treponema pallidum</i>	1903	F.R. Schaudinn y E. Hoffman
Tos convulsa	<i>Bordetella pertussis</i>	1906	J. Bordet y O. Gengou

Nuestra relación con estas formas de vida microscópicas es permanente. Existen más de 1000 diferentes especies que viven en las superficies epiteliales del cuerpo humano, como comensales o microbiota intestinal. Se estiman 10^{14} microorganismos sobre un total de 10^{13} células eucarióticas del hospedador (Henderson et al., 1999^a). Las actividades humanas determinan su interacción con los microbios y así como eliminan ciertas enfermedades, permiten la aparición de otras que mayormente son combatidas con los antibióticos, cuya aparición mejoró notablemente la calidad de vida del hombre.

Desafortunadamente, el descubrimiento de los antimicrobianos generalizó el concepto de que eso era suficiente para combatir las enfermedades de origen bacteriano lo que desencadenó un uso indiscriminado e irracional de los mismos provocando la selección de cepas multirresistentes.

Dentro de los temas que actualmente ocupan a la salud pública, los asociados a agentes infecciosos se encuentran en la vanguardia. Ellos incluyen: enfermedades emergentes, infecciones asociadas a brotes alimentarios y del agua, infecciones nosocomiales, bioterrorismo y resistencia a antibióticos.

I. 2. MECANISMOS DE DEFENSA DEL HOSPEDADOR

El hombre ha desarrollado mecanismos de defensa para poder mantenerse libre de enfermedades, ya que está expuesto, en forma continua, a microorganismos, a sus productos metabólicos y a otras moléculas que le pueden causar daño.

El primer sistema de defensa es no específico (inmunidad innata o natural) y está representado por barreras biológicas (inflamación, fagocitosis), barreras químicas (enzimas, interferones, fibronectina, complemento), barreras generales (fiebre) y barreras físicas (piel, mucosas) (Prescott, et al. 1999^b). Comprende una gran variedad de poblaciones celulares como las células epiteliales, monocitos, macrófagos, células dendríticas, leucocitos polimorfonucleares (PMNs) y células NK (natural killer) (Henderson, et al 1999^g).

El segundo sistema de defensa es específico (inmunidad adquirida) y lo constituyen los linfocitos B y los linfocitos T, que lo definen esencialmente. Los linfocitos B van a dar origen a los anticuerpos (inmunoglobulinas) que neutralizan

toxinas, opsonizan bacterias y participan en la activación del complemento por la vía clásica (Salyers and Whitt, 2002^a; Henderson et al., 1999^h).

Si bien ambos sistemas se clasifican por separado, son dos partes interdependientes de un sistema inmunológico integral. Los productos que surgen a raíz de la activación de la cascada del complemento, promueven la respuesta inflamatoria, facilitan y aumentan la eficiencia de la fagocitosis, atraen células (quimiotaxis) y estimulan la secreción de citoquinas que controlan la respuesta inmune ya que determinan el tipo de respuesta que se va a producir a través de la inducción de diferentes tipos de células T (Henderson et al., 1999^h).

El reconocimiento de microorganismos patógenos se lleva a cabo por receptores específicos del hospedador, denominados PRMs (del inglés: pattern recognition molecules), que reconocen moléculas expresadas exclusivamente por los microorganismos, denominadas

patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs es su sigla en inglés: pathogen-associated molecular patterns) que son altamente conservadas.

Ejemplo de estas moléculas son los lipopolisacáridos, flagelina, peptidoglicano, lipoproteínas y ADN bacteriano (Chamaillard, et al. 2004)

En cuanto a los PRM, los ejemplos más estudiados son los receptores tipo Toll (TLRs) que se encuentran en la superficie de células específicas. Otro ejemplo son los receptores tipo Nod (NLRs) que se hallan en el citoplasma (Chamaillard et al., 2004; Fritz et al., 2006; Marodi, 2006)

A nivel de la mucosa intestinal, la respuesta innata provee la primera línea de defensa contra los microorganismos patógenos y determina la generación de señales para la respuesta adquirida (Maldonado Galdeano and Perdígón, 2006).

Las células epiteliales del intestino modulan la respuesta inmunológica a través de la secreción de productos que activan o inhiben las células inmunes profesionales (Rumbo and Schiffrin, 2005). Dentro de este último grupo se hallan: macrófagos, células T y células B que se encuentran en el tejido linfóide asociado al tracto gastrointestinal que produce las IgA que se halla en el mucus (Salysers and Whitt, 2002^a). En el intestino delgado el tejido linfóide asociado al sistema digestivo está representado por las placas de Peyer y acúmulos linfóides. Allí, las células M toman muestras de los antígenos de la luz intestinal para que sean procesados por los macrófagos, quienes los presentan a los linfocitos T CD4⁺ que activan los linfocitos B específicos que se diferenciarán en células plasmáticas para dar anticuerpos específicos (Prescott et al., 1999^b). La presentación a linfocitos T CD8⁺ desencadena respuestas importantes para el control

de patógenos intracelulares tales como *Listeria monocytogenes* (Zaiss et al., 2008).

La característica particular de las células epiteliales es que están estrechamente empaquetadas y unidas unas con otras por estructuras llamadas “uniones estrechas” y desmosomas (Henderson et al., 1999^b). De esta manera se trata de evitar el tránsito de bacterias a través del epitelio. Además se hallan unidas a una membrana basal, constituida por glicoproteínas. De esta manera las células tienen una asimetría en sus dominios apical y basolateral, lo cual les confiere una característica muy importante como es la polarización.

Otros mecanismos de defensa involucran la secreción gástrica, la motilidad intestinal, la producción de lisozima, la secreción pancreática, la bilis y la flora intestinal (Henderson et al., 1999^g).

En la mucosa intestinal se produce una interesante paradoja: el sistema inmune es capaz de responder ante microorganismos patógenos desencadenando una respuesta inflamatoria y es tolerante ante los microorganismos comensales, los cuales se encuentran en cantidades importantes (1×10^{11} a 1×10^{12} ufc/gr de deposiciones) (Sansonet, 2006). ¿Cómo es posible esto? Algunas teorías sostienen que los microorganismos patógenos son capaces de atravesar la barrera del epitelio intestinal, entonces de esta manera tienen acceso a los receptores PRMs que se corresponden a sus PAMPs. Los microorganismos pertenecientes a la microbiota intestinal, si bien mantendrían una reacción inflamatoria basal muy baja, no serían capaces de acceder a los receptores que desencadenan una respuesta nociva para el hospedador (Sansonet, 2006). De cualquier manera, este sistema se encuentra en un constante equilibrio dinámico y numerosos aspectos quedan aún sin aclarar.

I. 3. FACTORES DE VIRULENCIA

Los microorganismos son capaces de producir efectos adversos sobre el hospedador a través de dos mecanismos fundamentales:

- producción de toxinas
- adhesión/invasión

En este contexto se describen una gran variedad de moléculas y estructuras que constituyen los llamados factores de virulencia. Se han postulado diferentes términos tales como:

adhesinas (responsable de la adhesión de los microorganismos a los tejidos), invasinas (responsables de la invasión a los tejidos), agresinas (factores bacterianos capaces de dañar las células o tejidos del hospedador), impedinas (permiten a la bacteria eludir los sistemas de defensa del hospedador y modulinas (componentes bacterianos que estimulan la síntesis de citoquinas (Henderson et al., 1999^a).

I. 3. A. TOXINAS

Las toxinas son sustancias específicas, producidas por el microorganismo, que dañan al hospedador por interferir en los mecanismos de señalización celular (Prescott et al., 1999^a)

Las toxinas existen tanto en bacterias Gram positivas como negativas (Henderson et al. 1999^a).

El progreso en su estudio ha sido considerablemente rápido en los últimos años por el avance de la genética molecular y la biología celular, luego aplicada a la biología de las toxinas. Se agrupan en dos grandes clases sobre la base de la naturaleza química: no proteicas y proteicas.

Las toxinas no proteicas, endotoxinas, tienen un importante rol en la patogénesis asociada a bacterias Gram negativas. Están constituidas por la membrana externa de la pared celular y su componente principal es el LPS (Henderson et al., 1999^f).

Las toxinas proteicas, de acuerdo al sitio de acción, se clasifican en 4 grupos (Rappuoli and Pizza, 2000), como se observa en la figura 1:

1. Toxinas que actúan sobre la superficie: producen su efecto por activación inapropiada de los receptores celulares, que envía un mensaje erróneo dentro de la célula, alterando las rutas normales de comunicación. Un ejemplo característico de este tipo de toxinas es la STa de *E. coli*. STa se une a la guanilato ciclase de la superficie de la célula epitelial. Como resultado de esto el GTP se convierte en GTPc que activa una proteína quinasa G que fosforila un transportador de membrana provocando la inhibición de la absorción de sodio y el aumento de la secreción de cloruro.

2. Formadoras de poro: se insertan como oligómeros dentro de la estructura de la membrana plasmática, formando poros de distinto tamaño. Son capaces de operar como monómeros solubles en agua y también como proteínas hidrofóbicas. Exponen sus residuos hidrofóbicos para que interactúen con la fase hidrofóbica de la membrana, formando así un canal hidrofílico que permite el flujo de pequeñas moléculas y la interrupción del potencial eléctrico de membrana.

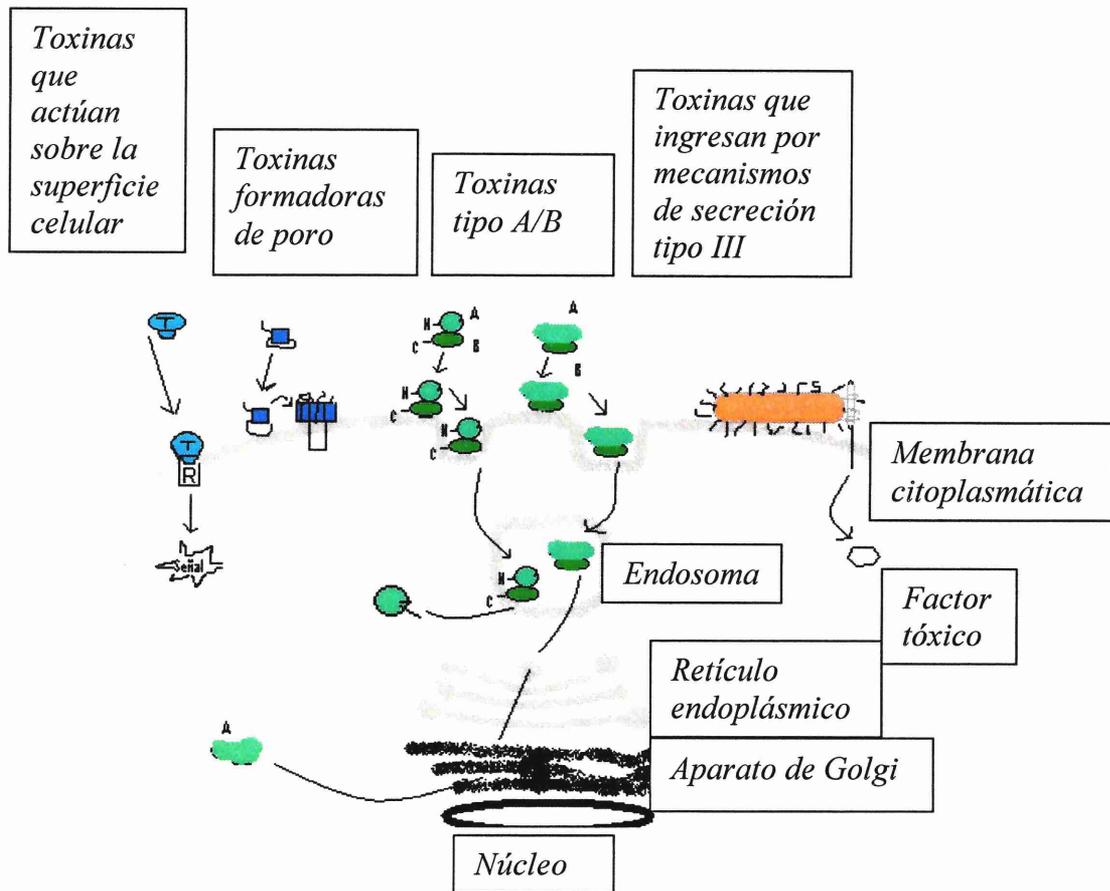


Figura 1: Representación esquemática de los 4 grupos de toxinas bacterianas adaptado de Rappuoli and Pizza., 2000.

Las células tienden a reparar el daño producido, pero generalmente mueren vía apoptosis. Esto sugiere que las toxinas quizás disparen una señal específica que induce la apoptosis; o bien permiten el ingreso al citosol de moléculas que modifican funciones celulares que desencadenan la vía apoptótica. Existen algunas toxinas formadoras de poro que inducen la producción de citoquinas, aparentemente sin relación con la formación del poro. Se describen dos subgrupos importantes, dentro de las toxinas formadoras de poro: a) RTX de bacterias Gram negativas y b) citolisinas tiol activadas que se unen por colesterol, de bacterias Gram positivas, como por ejemplo cereolisina O producida por *Bacillus cereus*. Las

pertenecientes al subgrupo a) poseen una estructura común que incluye una serie de nonapéptidos ricos en glicina. La cantidad de estas estructuras repetidas varía según la toxina pero en todas están involucradas en sitios de unión dependientes de Ca^{+2} (Welch, 2001). Son secretadas al medio de cultivo y localizadas sobre la superficie de la célula blanco para formar los poros. Las pertenecientes al subgrupo b) interactúan con el colesterol de las membranas citoplasmáticas formando poros. También inhiben la función de las células B, inducen la liberación de citoquinas y estimulan la transducción de señales (liberación de inositol fosfatasa). Ejemplos conocidos de estas toxinas son la estreptolisina O, la cereolisina O, la perfringolisina O y la listeriolisina O.

Dentro de las toxinas que actúan en el citosol, hallamos las de tipo A/B y las que ingresan por mecanismo de secreción tipo III.

3. Las toxinas de tipo A/B, dañan las células por varios mecanismos enzimáticos, como resultado de la inactivación de los procesos esenciales de la función celular.

La acción de estas toxinas implica la unión inicial de la molécula de toxina a la superficie celular, seguido por una endocitosis y translocación dentro del citosol a través de las vesículas endocíticas. Las toxinas poseen dos dominios, A y B, que pueden ser dos proteínas distintas o dos regiones de una cadena polipeptídica. El dominio A es la parte catalíticamente activa que actúa dentro del citosol, y el dominio B es la parte que se une al receptor superficial de membrana y provoca la translocación de la toxina a través de la membrana. Dentro del citosol ocurre una activación y el fragmento A adquiere actividad enzimática como ADP-ribosiltransferasa, adenilatociclase, metaloproteína, ribonucleasa, glucosyl-transferasa o deaminasa, dependiendo de la naturaleza de la toxina. Las toxinas tetánica, diftérica y botulínica pertenecen al grupo en que el componente A es secretado directamente al citosol desde el endosoma. Cuando el componente A es transportado al aparato de Golgi y al retículo endoplásmico, para luego ser liberado al citosol estamos ante toxinas como de cólera y Shiga-toxina.

4. Toxinas que ingresan mediante el sistema de secreción tipo III. Este sistema consiste en un complejo que atraviesa la membrana bacteriana a través del cual la bacteria puede inyectar las proteínas, intactas, directamente dentro del citoplasma de las células eucarióticas (Plano, 2001; Salyers and Whitt, 2002^d). La secreción

es dependiente de contacto y está asociada a un ambiente de bajo contenido de calcio (Salyers and Whitt, 2002^d).

Los componentes del sistema incluyen: generador de energía, moléculas efectoras que inducen cambios en algunas funciones de la célula hospedadora, chaperonas citoplasmáticas, proteínas citoplasmáticas y de la membrana externa involucradas en el transporte de las moléculas efectoras y proteínas regulatorias. Este sistema está generalmente codificado en las islas de patogenicidad, que son regiones del genoma que contienen genes de virulencia que presentan transferencia horizontal entre diferentes especies e incluso géneros (Hacker and Kaper, 1999; Henderson et al., 1999⁶). La presencia de esta vía ha sido demostrada, por ejemplo, en *Yersinia spp.* (Cowan et al., 2000), *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) (Finlay and Falkow, 1997).

Las bacterias Gram negativas poseen otros sistemas de secreción, quizás por el hecho de que para enviar sus productos al exterior deben sortear la barrera que significa la membrana externa. Ellos son, además del sistema de secreción tipo III, los sistemas de secreción tipo I, II, IV y V (Salyers and Whitt, 2002^b; Schesser et al., 2000).

El sistema de secreción tipo I es específico para ciertas proteínas y está ubicado tanto en la membrana interna como externa de las bacterias Gram negativas. Secreta proteínas al medio extracelular sin un paso intermedio en el espacio periplásmico. Consta de tres proteínas: una ATPasa que provee la energía para la formación del poro y el transporte de las proteínas a través de la membrana, una proteína que expande el espacio periplásmico que conecta la membrana citoplasmática y la

membrana externa, y una proteína en la membrana externa. Al igual que en el sistema de secreción tipo III, las proteínas se transportan intactas. Un ejemplo de proteína transportada mediante este sistema es la α -hemolisina de *E. coli* (Schesser et al., 2000).

El sistema de secreción tipo II está compuesto por 12 a 14 proteínas, denominadas secretinas que se hallan en la membrana externa y forman poros. Otros componentes se hallan en la membrana citoplasmática. Un ejemplo es el sistema Xcp de *P. aeruginosa* que exporta la exotoxina A y otras proteínas (Sandkvist, 2001).

El sistema de secreción tipo IV forma una estructura en el espacio periplásmico y alcanza las dos membranas (Christie, 2001). Este sistema tiene la particularidad de que además de transferir proteínas puede transportar ADN complejo con éstas tanto entre bacterias como entre bacterias y células eucarióticas (Schesser et al., 2000). Y al igual que el sistema de secreción tipo III, puede transferirlas directamente al interior de las células del hospedador.

El sistema de secreción tipo V es similar al de tipo II, pero se diferencia en el transporte de las proteínas a través de la membrana externa. En este sistema las proteínas se autotransportan

y la fracción C terminal es removida enzimáticamente luego de que las proteínas son liberadas al exterior de la membrana externa. Entre las proteínas secretadas por este sistema se encuentra la IgA proteasa de *Neisseria gonorrhoeae*.

Tanto en el sistema II como el sistema V la fracción N terminal y el dominio hidrofóbico permiten el reconocimiento de la proteína a ser transportada y el sistema de secreción localizado en la cara citoplasmática de la membrana interna. (Schesser et al., 2000).

Las bacterias Gram positivas poseerían un sistema de secreción que podría ser el equivalente al sistema de secreción tipo III de los gérmenes Gram negativos. Este sistema fue descrito para *Streptococcus pyogenes*, donde se propuso un modelo por el cual este microorganismo translocaría un efector (SPN: *S. pyogenes* NAD-glicohidrolasa) a la célula del hospedador a través del poro formado en la membrana de la célula eucariótica por la estreptolisina O (SLO), una citolisina dependiente de colesterol. Este sistema de translocación requiere la adhesión previa de la bacteria a la célula del hospedador y para producir el efecto citotóxico son necesarios tanto el efector, SPN, como la SLO (Madden et al., 2001)

I. 3. B. ADHESIÓN

Otro de los eventos importantes en las infecciones intestinales es la adherencia de los microorganismos a las células epiteliales (Henderson et al., 1999^d). Muchas veces la adhesión es fundamental para la colonización del tejido y eventualmente, para la invasión, diseminación, distribución de toxinas y para explicar los daños en la célula hospedadora que no están asociados a factores extracelulares.

El proceso de adhesión está compuesto por una serie de etapas o factores que incluyen presentación, orientación, accesibilidad a los receptores del hospedador y de las bacterias. Para ello hay ciertas facetas a tener en cuenta: las fuerzas físico – químicas involucradas, la especificidad de los procesos de unión, los efectos sobre la célula del hospedador, los eventos post-adhesión y los efectos

sobre la bacterias (Henderson et al., 1999^d).

En cuanto a las fuerzas involucradas, las bacterias sólo se adhieren a superficies complementarias, mediante interacciones iónicas o coulombicas, por medio de puentes de hidrógeno (Pool-Zobel et al., 1993), por uniones hidrofóbicas (Duncan-Hewit, 1990) o por medio de complejos de coordinación que involucran iones metálicos multivalentes.

En algunos casos la adhesión es específica: el receptor de la célula del hospedador reconoce al ligando de la superficie bacteriana como una estructura complementaria y forman una unión fuerte, que puede ser inhibida por otras moléculas con idénticos sitios receptores. En contraste es mucho menos específica en el caso de bacterias hidrofóbicas que pueden unirse a moléculas hidrofóbicas tanto del hospedador como de superficies inanimadas. (Busscher and Weerkamp, 1989).

Una amplia variedad de moléculas pueden funcionar como receptores: proteínas, polisacáridos, fosfolípidos, moléculas de la matriz extracelular glicoproteínas, glicolípidos y los receptores de citoquinas, hormonas e inmunoglobulinas (Finlay and Caparon., 2000).

Las estructuras bacterianas involucradas en la adhesión pueden ser: fimbrias (o pili), flagelos, cápsula o capa S, que poseen adhesinas, que son las moléculas responsables de la adhesión. También la pared celular posee moléculas que funcionan como adhesinas como son el LPS, ácidos lipoteicoicos, ácidos teicoicos y proteínas de la membrana externa (Henderson et al., 1999^d). Las lectinas, ubicadas en los pili, cápsula o sobre la pared bacteriana son responsables de la adhesión de las bacterias Gram (-), generalmente, a las células de epitelio intestinal, faringeo, bucal, tracto

urinario o eritrocitos por su interacción con los carbohidratos (Henderson et al., 1999^d).

La adhesión de ciertas bacterias afecta a las células del hospedador, morfológica y funcionalmente, desencadenando muchas veces procesos de apoptosis, reorganización del citoesqueleto, disminución de la actividad enzimática, aumento de permeabilidad de membrana con liberación de fluidos e inducción de liberación de citoquinas. Estos procesos también pueden ser desencadenados por toxinas, pero hay ejemplos donde basta la interacción directa con la célula eucariótica para desencadenar respuestas celulares. Este es el caso, por ejemplo, de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) (Goosney et al., 1999).

Con respecto a la microbiota intestinal, parece no existir un efecto sobre la célula del hospedador, ya que no provoca un efecto biológico aparente. La adhesión de microorganismos comensales de epitelio implica un mutuo reconocimiento y aparentemente una indiferencia de ambas partes; sin embargo las bacterias de la microbiota intestinal regulan la producción de moléculas antimicrobianas y la liberación de citoquinas de las células epiteliales (Salyers and Whitt, 2002^b).

La interacción hospedador – bacteria, también afecta a esta última en su estructura y función, ya que puede estimular el crecimiento, inducir estructuras adhesivas o promover la secreción de proteínas necesarias para la invasión.

El estudio de la adhesión de microorganismos utiliza diferentes aproximaciones, que van desde el empleo de superficies modelo, como una interfase hidrocarburo – agua hasta

sistemas *in vivo*. El avance en las técnicas de estudio permitirá profundizar los conocimientos de los mecanismos involucrados en la interacción hospedador - patógeno.

Entre las técnicas empleadas para la cuantificación de la capacidad de

adhesión de los microorganismos se encuentran la microscopía electrónica, inmunoblotting, ensayo de ELISA, marcación fluorescente, medida de metabolitos, marcación radioactiva, recuento microscópico y recuento de microorganismos viables, entre otros.

I. 3. C. INVASIÓN

Las bacterias patógenas capaces de invadir las células eucarióticas no fagocíticas, previamente se adhieren a ellas y desencadenan una serie de señales que llevan a su internalización. La invasión de las células epiteliales es el primer paso en el comienzo de muchas infecciones.

La mayoría de las bacterias invasivas acceden al interior celular por inducción de rearrreglos del citoesqueleto. Ejemplos de bacterias que utilizan este mecanismo son *Yersinia spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* (Salyers and Whitt, 2002^b).

Todas las células eucarióticas pueden cambiar su forma y permiten el movimiento de las organelas y otras estructuras, ya que poseen una red de proteínas a través del citoplasma que conocemos como citoesqueleto. Además, el citoesqueleto, se halla involucrado en los procesos de mitosis y citoquinesis.

Los principales componentes del citoesqueleto son: microtúbulos, filamentos intermedios y filamentos de actina (microfilamentos) (Henderson et al., 1999^b).

Los microtúbulos, formados por una única proteína globular, llamada tubulina, permiten el movimiento de las organelas y la citoquinesis (Henderson et al., 1999^b).

Los filamentos intermedios se denominan así, justamente porque su

diámetro (10 nm) es intermedio entre el diámetro de los filamentos de actina (6 nm) y el de los microtúbulos (23 nm). Su principal función es permitir a la célula resistir el estrés mecánico que se produce durante la elongación; esto lo puede realizar por la gran fuerza de tensión que poseen estas proteínas (Henderson et al., 1999^b).

Los filamentos de actina son necesarios para la locomoción celular, la fagocitosis y la división celular. Se hallan en alta concentración en la periferia de las células y determinan la forma que éstas pueden tener. Estas proteínas producen estructuras celulares, como por ejemplo las microvellosidades (Figura 2). Estas estructuras están involucradas en la absorción y en la interacción con microorganismos. Los haces de actina se hallan unidos entre sí por vilina, y a la membrana plasmática por estructuras formadas por miosina I y calmodulina (Henderson et al., 1999^b).

En una fotografía de microscopía de fluorescencia pueden observarse las zonas con fluorescencia verde que identifican la actina distribuida en el ribete en cepillo (Figura 3). En una microscopía confocal de las células epiteliales podremos observar la continuidad de la red de actina en el ribete en cepillo (Figura 4-A). En una muestra, donde se halla alterada la red de actina esta pierde continuidad (Figura 4-B)

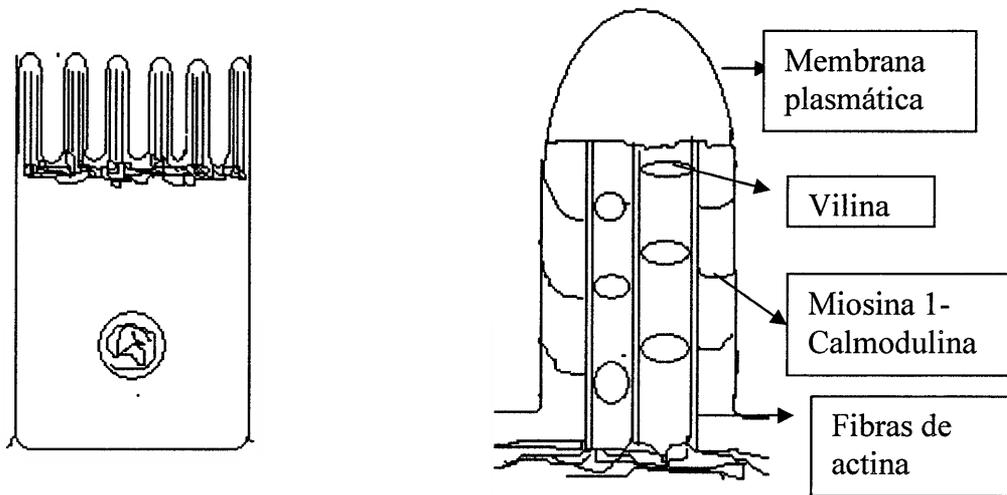


Figura 2: Esquema de una célula epitelial con sus microvellosidades (izquierda) y en detalle la estructura de una microvellosidad (derecha). Los filamentos de actina se hallan unidos entre sí por proteínas llamadas vilina y a la membrana plasmática por estructuras que contienen de miosina 1 y calmodulina. (Adaptado de Henderson et al, 1999^b)

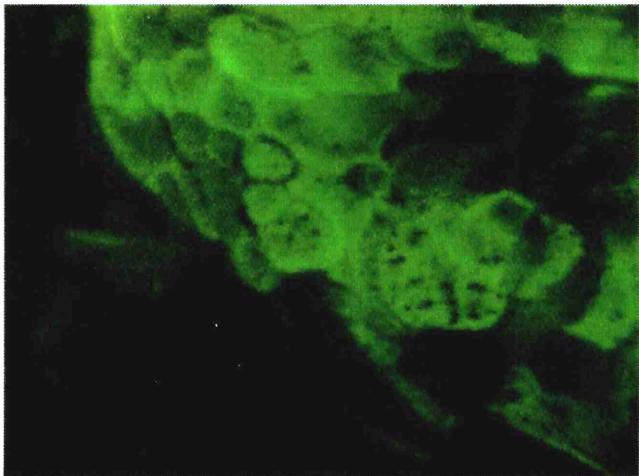


Figura 3: Microscopía de fluorescencia de células Caco-2 en confluencia teñidas con FITC-faloidina

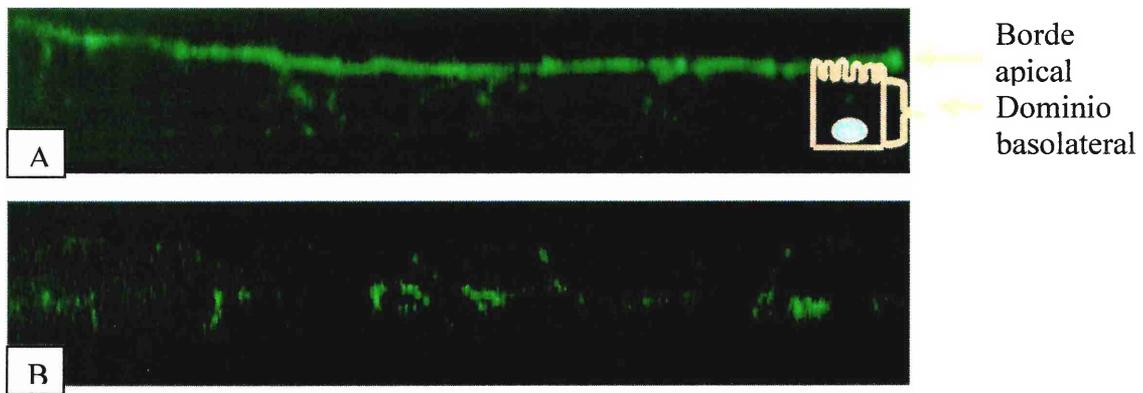


Figura 4: Integración de imágenes de microscopía confocal mostrando un plano lateral de células Caco-2. A: Células control. B: Células con la red de actina alterada.

La importancia de la actina del citoesqueleto para las células eucarióticas, y su participación en una amplia variedad de vías de señalización, constituyen un blanco para las bacterias patógenas, quienes producen una serie de cambios en el citoesqueleto para su propio beneficio.

Dentro de los cambios que producen las bacterias en el citoesqueleto para favorecer su internalización, se han descrito dos modelos: “zipper” y “trigger” (McCallum and Theriot, 2000).

El primer modelo (zipper) es el descrito para *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Yersinia enterocolitica*. Se produce un aumento de receptores en la interfase célula hospedador-bacteria y transducción de señales lo que induce rearrreglos en el citoesqueleto que permite la formación de una vacuola que encierra a la bacteria. Durante los primeros minutos, la célula hospedador todavía exhibe un aspecto normal y luego puede sufrir profundas modificaciones.

El segundo modelo (trigger) se ajusta al modo de invasión de *Salmonella* y *Shigella*. El contacto de las bacterias con la célula epitelial implica la aparición de sitios focales de adhesión e induce un aparato de secreción (tipo III) que permite el ingreso de efectores (proteínas) que inducen rearrreglos en la red de actina formando extensiones llamadas pseudópodos, que envuelven a la bacteria y la internalizan en un fagosoma.

Existen otras bacterias que utilizan los microtúbulos, como *Campylobacter jejuni*, *Porphyromonas gingivalis* y *Klebsiella pneumoniae*. (Henderson et al., 1999^e).

Para poder averiguar que proteína del citoesqueleto se halla comprometida en la invasión, se usan inhibidores de la

polimerización de los microfilamentos, como la citocalasina, y de los microtúbulos, como la colchicina (Henderson et al., 1999^e).

Tal como ocurre con la adhesión, la invasión afecta a la célula hospedadora y a las bacterias.

Los cambios en las células del hospedador pueden ser desde apenas perceptibles hasta la muerte celular. En este amplio rango, hay efectos intermedios que pueden ser transitorios, o duraderos, dependiendo de la bacteria invasiva. Algunos de los efectos pueden ser liberación de citoquinas, liberación de prostaglandinas y efecto sobre la expresión de receptores.

Las células que responden mediante liberación de citoquinas, pueden activar las defensas del hospedador o bien beneficiar al patógeno, ya que la superproducción de estos mediadores de la inflamación puede derivar en consecuencias adversas para el hospedador.

La diarrea puede ser considerada como un mecanismo de defensa del hospedador, ya que es una manera de expulsar los microorganismos del intestino. Esta respuesta a la infección es regulada por las prostaglandinas (PG), como la PGE₂, que son reguladores de la secreción gastrointestinal muy importantes, por su capacidad de inducir la secreción de agua y electrolitos desde las células de la mucosa a la luz intestinal. Las prostaglandinas derivan de la prostaglandina H, que a su vez es producida por la acción de la ciclooxigenasa (COX) sobre el ácido araquidónico, un fosfolípido de membrana. La actividad COX es el producto de dos genes: uno constitutivo, COX I y otro inducible, COX II. Los microorganismos invasivos, como *Yersinia enterocolitica* y *Shigella dysenteriae* aumentan la expresión de

COX II y la secreción de PGE₂ y PGF₂α (Henderson et al., 1999^e).

Si consideramos la muerte celular como el máximo efecto que puede producir una bacteria, esta puede ser mediante necrosis o apoptosis.

La apoptosis, conocida como muerte celular programada, es un proceso natural por el cual se controla el número de células. Al contrario de la necrosis, la apoptosis es regulada por procesos que involucran la activa participación de la célula y es controlada por complejas vías de transducción de señales que están mediadas por proteínas llamadas caspasas. Se caracteriza por una serie de cambios como son la pérdida de la asimetría y uniones de membrana, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN cromosomal y una disminución del tamaño celular (Gavrieli et al., 1992; Gorczyca et al., 1993)

Uno de los eventos tempranos de la apoptosis es la traslocación de la fosfatidilserina de membrana desde el interior de la célula hacia el exterior, quedando expuesta al medio extracelular. Una de las maneras de

poder observar este fenómeno es con anexina V, una proteína con afinidad por los fosfolípidos, en especial la fosfatidilserina (PS). Si se utiliza Anexina V conjugada con algún fluoróforo, como FITC, permite la observación de este fenómeno por microscopía de fluorescencia (Vermes, et al., 1995).

La Anexina V se usa junto con un colorante como el ioduro de propidio, que tiñe los núcleos de las células. Este último colorante va a poder trasponer la membrana plasmática cuando ésta haya perdido su integridad, hecho que ocurre en los estadios tardíos de la apoptosis o durante la necrosis. De esta manera al observar las muestras al microscopio de fluorescencia (Figura 5), se ven las células necróticas con el núcleo teñido de naranja (Figura 5-B), las células apoptóticas se observarán de color verde (Figura 5-C), y pueden observarse células con doble marcado que también serían necróticas (Figura 5-D). Las células negativas para ambos marcadores corresponden a células viables (Figura 5-A).

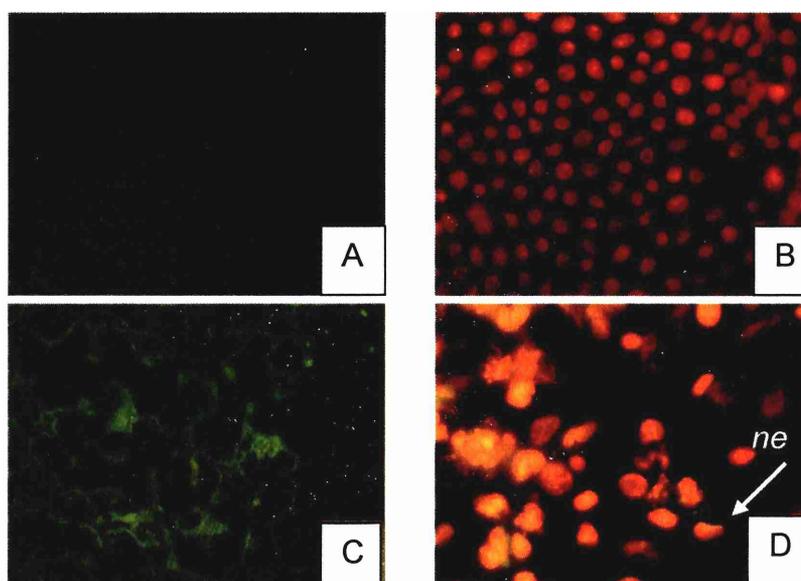


Figura 5: Distintos ejemplos de monocapas de células Caco-2 teñidas con Anexina V y Ioduro de propidio para diferenciar distintas vías de muerte celular. Control (A), células necróticas (B), células apoptóticas (C) y células necróticas pero con doble marcado (D)

La muerte de la célula por cualquiera de las dos vías puede ser considerado como una estrategia de defensa ya que el microorganismo invasivo pierde su ambiente de crecimiento.

La bacteria, luego de invadir, debe sobrevivir y crecer. Para ello puede permanecer dentro de una vacuola, o salir de ella y permanecer en el citoplasma o bien salir de la célula y mantener una existencia extracelular.

Cualquiera sea el camino que elija deberá adaptarse al nuevo ambiente. Esto lo logra mediante la regulación de sistemas que responden a parámetros como: temperatura, pH, osmolaridad, concentración de oxígeno, CO₂ y moléculas antibacterianas.

La gran mayoría de los conocimientos que hoy tenemos de la invasión bacteriana a células eucarióticas se han obtenido a partir de estudios en modelos animales y células en cultivo.

I. 3. D. MODELOS DE ESTUDIO

Cada sistema de estudio utilizado tiene sus ventajas y desventajas.

Los modelos animales tienen la ventaja que presentan la situación *in vivo* y se usan animales tales como el ratón, rata o conejo que son fáciles de manejar. Pero las desventajas son que su fisiología puede diferir de la del hombre o animal blanco de la infección en la naturaleza, la patofisiología puede ser distinta y los animales usados para los estudios pueden no ser susceptibles a las mismas cepas responsables de las infecciones en el hospedador natural (Henderson et al., 1999^d).

Muchos de estos inconvenientes pueden ser solucionados a partir de la biotecnología que es capaz de producir animales con algunas características particulares.

En lo que se refiere al cultivo de células eucarióticas, permiten los estudios de invasión a nivel celular y molecular. La desventaja que presentan es que, en algunos casos, las células no están polarizadas y por lo tanto no hay diferencias entre los polos apical y basolateral; además las condiciones de crecimiento difieren de las halladas *in vivo*, afectando la expresión de genes.

Sin embargo, aunque los cultivos de células no reproducen en su totalidad los procesos *in vivo*, constituyen una

excelente aproximación experimental para los estudios de infección.

También se ha avanzado en el uso de los cultivos de células con relevancia fenotípica para el patógeno, como es el caso de las células derivadas del intestino como modelos para patógenos intestinales.

La línea Caco-2 (ATCC HTB-37), constituye un buen modelo para el estudio de las interacciones entre células de epitelio intestinal humano y bacterias entéricas, ya sean patógenas o no (Fogh and Orfeo, 1977; Bernet-Camard et al., 1996; Bibiloni et al., 1999; Burns et al., 2001). Estas células exhiben un patrón de diferenciación estructural y funcional característico de los enterocitos naturales como por ejemplo ribete en cepillo, uniones estrechas funcionales y alto nivel de enzimas asociadas al ribete en cepillo como la fosfatasa alcalina, sacarasa isomaltasa y aminopeptidasa (Pinto et al., 1983; Chantret et al., 1994). Estas características las adquieren luego de la confluencia. Esta etapa también se caracteriza por la presencia de domos, distribuidos al azar en la monocapa celular indicando un cambio funcional en la misma, ya que su formación se debe a la secreción de sustancias a la zona basolateral.

Un cultivo de células Caco-2 entre los 2 y 6 días va a crecer en cluster de

células poligonales y luego, cuando se halla confluyente se caracteriza por dos patrones de distribución del ribete en cepillo: alfombra gruesa (thick carpet pattern) (Figura 6 A) o como ramilletes de flores (flower-like pattern), cuyos extremos parecen juntarse (Figura 6 B). En el ribete en cepillo se observan las

microvellosidades proyectando perpendicularmente a la superficie (Figura 7). En esta foto de microscopía de transmisión puede observarse la polarización de la células caracterizada por su asimetría (el ribete en cepillo solo se localiza en la superficie apical).

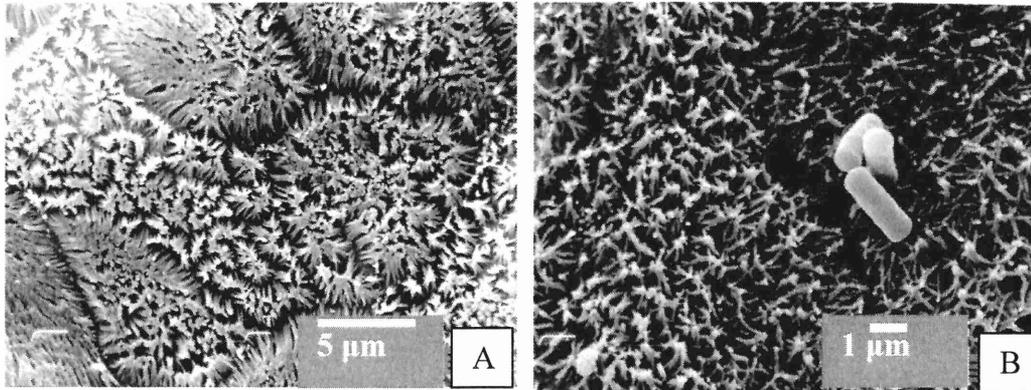


Figura 6: Patrones de distribución de células Caco-2 en confluencia: alfombra gruesa (thick carpet pattern) (A) o como ramilletes de flores (flower-like pattern) (B). Las barras indican tamaño.

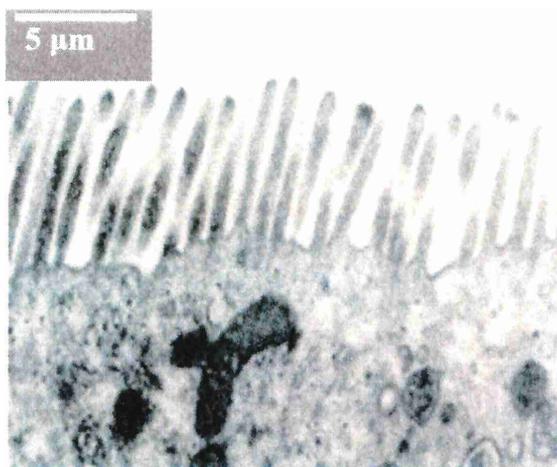


Figura 7: Microscopía de transmisión de células Caco-2 incubadas en medio DMEM durante 15 días a 37°C en 5% CO₂. La barra indica tamaño.

I. 4. *Bacillus cereus*

El grupo *Bacillus cereus* (mayormente llamado *Bacillus cereus sensu lato*) contiene siete especies muy relacionadas: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus (sensu stricto)*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus*

weihenstephannensis y *Bacillus medusa* (Bavykin et al., 2004).

Tradicionalmente tres especies, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus (sensu stricto)* y *Bacillus thuringiensis* se diferenciaban por algunas características fenotípicas y pruebas

bioquímicas, pero la homogeneidad del grupo y la transferencia horizontal de información genética hacen muy difícil la identificación, ya que ciertos marcadores como la capacidad hemolítica, presencia de cápsula o presencia de cristales parasporales están codificados en plásmidos (Sergeev et al., 2005; Helgason et al., 2000; Cardazzo et al., 2008). Por lo tanto, cualquier movimiento de este elemento genético, ya sea la pérdida o adquisición del mismo, hace indistinguible las especies del grupo *cereus* (Slamti and Lereclus, 2005). Algunos autores como Helgason y colaboradores, sostienen que son una misma especie, siendo *B. cereus* la más antigua de todas (Helgason et al., 2000)

Microscópicamente *Bacillus cereus* (*sensu stricto*) es un bacilo largo, Gram positivo agrupado en cadenas o suelto, móvil por flagelos peritricos y esporulado. Su capacidad de desarrollar aeróbicamente y la presencia de la enzima catalasa es lo que distingue a los miembros de este género de *Clostridium* (Schoeni and Wong Lee, 2005)

Crece en un amplio rango de temperaturas, de 10°C a 50°C. Esporula rápidamente en condiciones normales y la germinación es altamente dependiente de adecuadas condiciones ambientales (Kotiranta et al., 2000). Bajo condiciones de laboratorio, el estado inicial de la germinación del esporo se produce en un amplio rango de temperaturas, siendo 30°C la temperatura óptima, -1°C la temperatura mínima y 59°C la temperatura máxima (Kramer and Gilbert, 1992).

Tanto la forma vegetativa como la esporulada son frecuentes habitantes de un amplio rango de ambientes. Dado que no posee requerimientos nutricionales muy complejos es posible encontrarlos en tierra y arcilla,

sedimentos, cenizas, aguas naturales y vegetación. También lo podemos hallar en varios tipos de alimentos, sobre todo cereales y derivados, leche, alimentos secos, especias, productos cárneos y vegetales (Kramer and Gilbert, 1992).

B. cereus es habitante de la flora intestinal de muchos invertebrados, y el estado natural en ese hábitat parecería ser la forma filamentosa, denominándose “estado intestinal”. Se podrían suponer dos ciclos de vida: en uno coexistirían en una relación simbiótica *B. cereus* con su hospedador invertebrado; en segundo ciclo, no tan frecuente, se produciría cuando las bacterias comenzaran a multiplicarse rápidamente e infectaría a su hospedador (tanto vertebrados como invertebrados) (Jensen et al., 2003). Algunas cepas serían capaces de realizar el ciclo completo en el hospedador invertebrado, ya sea como patógeno o como parte de la flora intestinal (Stenfors Arnesen et al., 2008)

Los esporos son importantes para la diseminación de los bacilos y la resistencia que ofrecen al calor y a los rayos gamma constituyen un grave problema para la industria alimentaria por la contaminación que provocan en sus productos, ya que por sus propiedades hidrofóbicas son capaces de adherirse a distintas superficies inanimadas, muy comunes en las líneas de producción (Husmark and Rönner, 1990; Wiencek et al., 1991). Además la formación de biofilm protege a los esporos y formas vegetativas de la acción de agentes desinfectantes (Stenfors Arnesen et al., 2008)

El estudio de *Bacillus cereus* adquiere importancia por estar implicado en patologías intestinales: cuadro emético y diarreico, y extraintestinales, como endoftalmítis (Beecher and Wong, 1994^a), endocarditis, osteomielitis, infecciones

en la cavidad oral (Kotiranta et al, 1998), septicemias, peritonitis y meningitis (Rowan et al., 2001).

En las infecciones oculares (endofalmitis) este microorganismo es capaz de producir desprendimiento de la retina y necrosis, provocando una pérdida de la visión permanente (Beecher et.al., 1995).

Si bien las infecciones no intestinales se han producido también en pacientes sanos, mayormente han sido afectados los pacientes inmunocomprometidos, adictos o pacientes en convalecencia de una cirugía (Rasko et.al, 2005; Slamti and Lereclus, 2005; Schoeni and Wong Lee, 2005).

En lo que respecta a los toxoinfecciones intestinales, el síndrome emético es asociado con el consumo de alimentos como el arroz, en la mayoría de los casos, pero otros alimentos también están asociados a esta patología, como leche y sus derivados, pastas y fórmulas infantiles (Szabo, R. et al, 1991). Es producido por una toxina preformada, dodecadepsipéptido cíclico de un peso molecular de 1.2 kDa que se denomina cereulide y que está estrechamente relacionado a la valinomicina (Agata et al., 1995^a). Es una mitocondriotoxina (Hägglblom et al., 2002) producida durante la fase estacionaria de crecimiento y resistente a inactivación por calor, tripsina, pepsina o pH extremos y de baja solubilidad en soluciones acuosas (Kramer and Gilbert, 1992; Notermans and Batt, 1998). Es capaz de inhibir las células NK del sistema inmune (Paananen et al., 2002).

La cereulide es producida por un complejo multienzimático no ribosomal (NRPS según sus siglas en inglés: nonribosomal peptide synthetase) que en el género *Bacillus* también sintetiza otros péptidos como gramicidina, bacitracina y surfactina (Horwood et al.,

2004). La secuencia del gen (*ces*) que codifica la maquinaria enzimática que se requiere para la síntesis de cereulide permitió comprobar que incluye los genes para la síntesis de NRPS además de genes que codifican enzimas para la activación e incorporación de monómeros a la cadena peptídica, y genes que codifican otras enzimas (Ehling-Shulz et al., 2005^b). Este gen se encuentra sobre un megaplásmido, similar a pXO1 de *B. anthracis* (Ehling-Shulz et al., 2006).

El cuadro emético se caracteriza por un proceso rápido de náuseas y vómitos (ocasionalmente diarrea) que comienzan 0.5 – 6 hs. después de ingerido el alimento y con una duración de entre 6 y 24 hs (Stenfors Arnesen et al., 2008)

El pequeño tamaño y la baja antigenicidad que tiene la cereulide dificultan su detección por métodos inmunoquímicos. Para poder evaluar el título de cereulide se utilizan ensayos biológicos en los cuales se mide la pérdida de movilidad de espermatozoides de cerdo, ya que la toxina bloquea la fosforilación oxidativa en las mitocondrias (Andersson et al., 1998^b); se determina la vacuolización de las células Hep-2 (Agata et al., 1995^a); o se determina la actividad deshidrogenasa mitocondrial utilizando una sal de tetrazolio (MTT) en células Hep-2 (Finlay et al., 1999). También se ha desarrollado un ensayo que permite determinar la concentración de cereulide por HPLC y espectroscopia de masa, que ha demostrado tener buena correlación con el método biológico (Hägglblom et al., 2002). El descubrimiento de la secuencia del gen *ces* permite utilizar técnicas de hibridación como Southern blotting (Ehling-Shulz et al., 2006) y PCR en tiempo real (Fricker et al., 2007)

El síndrome diarreico asociado a *B. cereus* se produce por la ingestión de

microorganismos contenidos en productos lácteos, vegetales o carnes y la posterior producción de factores exocelulares en el intestino delgado durante la fase exponencial de crecimiento; tiene periodos de incubación de 8 a 16 hs., y se resuelve entre 12 y 24 hs (Kramer and Gilbert, 1992). La dosis de infección se encuentra entre 10^5 y 10^8 células o esporos, pero dosis de 10^3 células también han producido enfermedad (Kramer and Gilbert, 1992). Aunque la afección es generalmente de curso benigno, con diarrea acuosa sin evidencia de invasión de los tejidos o leucocitos en la materia fecal, puede ser particularmente severa en niños de corta edad y en ancianos (Beecher and Wong, 1994^a)

La bibliografía da cuenta de la producción de algunos factores extracelulares que podrían estar relacionados con el síndrome diarreico:

- a. fosfolipasa C, con tres tipos de especificidades diferentes y que podrían estar asociadas al síndrome diarreico: fosfatidilinositol, fosfatidilcolina y esfingomielinasa (Granum and Nissen, 1993; Beecher et al., 1995; Beecher and Wong., 2000)
- b. hemolisina BL (HBL): una enterotoxina tripartita que requiere de los tres componentes (B, L1 y L2) para lograr la máxima actividad (Beecher and Wong, 1994^c; Beecher, and Wong, 2000)
- c. cereolisina O una citolisina tiol activada que se une a colesterol y es sensible al calor (Alouf, 2000; Henderson et al., 1999^f)
- d. enterotoxina no hemolítica (NHE), un complejo de 3 subunidades (Lund and Granum, 1997)
- e. enterotoxina FM, una proteína de 45 kDa producida por el gen entFM localizado en el cromosoma de las cepas de *B. cereus* (Asano, 1997).

- f. enterotoxina S, es una proteína de 45 kDa codificada en el gen entS con una identidad en la secuencia de 97% con entFM. Este gen fue clonado a partir de una cepa de *B. thuringiensis* (Asano, 1997). Resultados posteriores sugirieron que entFM y entS podrían ser considerados un único gen, y que para su análisis son necesarios, al menos, dos pares de primers (Ghelardi et al., 2002).
- g. enterotoxina T (bceT) es un componente simple y con actividad similar a las hemolisinas BL y NHE (Agata et al., 1995^b)
- h. citolisina K (cytK) es una proteína de 34 KDa, necrótica, hemolítica y capaz de formar poros en una bicapa lipídica (Fagerlund et al., 2004). Además es muy tóxica para células de epitelio intestinal humano (Hardy et al., 2001)
- i. hemolisina II que no es inhibida por colesterol y parecería ser similar a una toxina letal para ratón de una cepa de *B. cereus* aislada de una intoxicación alimentaria que causó vómitos en el paciente (Shinagawa et al., 1991)
- j. hemolisina III (Hly-III) que actúa mediante la formación de poros transmembrana (Baida and Kuzmin, 1996)
- k. hemolisina IV (Hly-IV), que muestra un fuerte efecto sobre la membrana plasmática (Beecher and Wong, 2000)
- l. proteasas que podrían tener un rol en las infecciones no intestinales producidas por *B. cereus*. (Kotiranta et al., 2000)

Aislamientos de *Bacillus cereus* provenientes de infecciones usualmente son resistentes a los antibióticos betalactámicos, incluyendo las cefalosporinas de tercera generación (Drobniewski, 1993). Esto está relacionado con la producción de tres diferentes formas de betalactamasas: betalactamasa I, II y III.

Para determinar la presencia de alguno de los factores extracelulares causantes del síndrome diarreico, existen métodos inmunoquímicos como el de TECRA y Oxoid. El test de TECRA determina una proteína de 45 KDa que se corresponde con el componente NHEA de la enterotoxina no hemolítica (NHE), y el test de Oxoid, mediante aglutinación de partículas de látex, detecta el componente L2 de la toxina HBL (Beecher and Wong Lee, 1994^b).

Para estudiar la actividad toxigénica de aislamientos de *Bacillus cereus* se han empleado varios métodos, como por ejemplo, hemoaglutinación (Gorina, 1975); métodos inmunológicos (Beecher and Wong, 1994^b; Buchanam and Schultz, 1992; Buchanam and Schultz, 1994; Day, 1994); ensayos in vivo (Agata, 1995^a; Beecher and Wong, 2000); PCR (Mäntinen and Lindström, 1998); ensayos sobre células eucarióticas en cultivo (Agata et al., 1995^a; Gorina et al., 1975; Jackson, 1993; Lund and Granum, 1997; Mikani et al., 1994; Szabo et al., 1991; Rowan et al., 2007; Wijnands et al., 2007; Virtanen et al., 2008; Moyer et al., 2008)

Asimismo, podrían existir otros factores no conocidos aún, sugiriendo algunos autores que la adhesión de los esporos a los enterocitos podría desempeñar un rol en la virulencia (Andersson et al., 1998^a). Sin embargo la unión de las formas vegetativas al enterocito podría tener también efecto biológico.

Para poder examinar la diversidad del grupo *cereus* son necesarios varios métodos bioquímicos y moleculares, que se complementen unos con otros, como puede ser cultivos microbianos, métodos bioquímicos, inmunológicos y PCR, ya que se deben analizar una gran cantidad de genes y marcadores

cromosomales para poder caracterizar a este microorganismo.

La estrecha relación entre los miembros del grupo *cereus* ha sido establecida a través de técnicas moleculares como hibridación de ADN, por comparación del fragmento de 16S ARNr o del 23S ARNr y por la región espaciadora 16S-23S ARNr (Rasko et al., 2005). También se han utilizado otras técnicas que podrían ayudar a discriminar entre las especies como el análisis de la secuencia de los genes constitutivos (Ko et al., 2004) y de virulencia (Ehling-Schulz et al. 2005), RAPD-PCR (Ghelardi et al., 2002) y ribotipificación (Grift et. al., 2003)

Con respecto a la última técnica mencionada, el punto crítico de este sistema, sobre todo cuando se trata de un grupo tan estrechamente relacionado como el grupo *B. cereus*, es la decisión de cuáles y cuántas enzimas de restricción utilizar (Grift et. al., 2003).

Dado que los miembros del grupo *cereus* poseen una similitud mayor del 99% en la secuencia del 16S ARNr y 23S ARNr, la utilización del ARNr es limitada para diferenciar entre las distintas especies. Entonces una alternativa sería utilizar los genes de virulencia. Para ello un grupo de investigadores han desarrollado un microarreglo que proveería un método específico para la identificación, ya que cada cepa poseería una distribución única de los factores de virulencia (Sergeev et al., 2005). La combinación de PCR y microarreglos provee sensibilidad y especificidad, y permite analizar varios genes de virulencia en un solo ensayo (Sergeev et al., 2005)

El estudio de *B. cereus* ha avanzado notablemente en los últimos años, sobre todo en lo que refiere a la genética del grupo. Diferentes factores extracelulares han sido propuestos para explicar la

virulencia de *B. cereus* pero, hasta el presente, los mecanismos de patogenia no son bien conocidos (Agata et al, 1994; Alouf, 2000; Beecher and Wong, 2000; Beecher and Lee Wong, 1994^a; Lund and Granum, 1997; Stenfors Arnesen et al., 2008). Ciertos autores han propuesto que la capacidad de los esporos de adherirse a los enterocitos podría constituir un factor de virulencia adicional (Andersson et al, 1998^a)

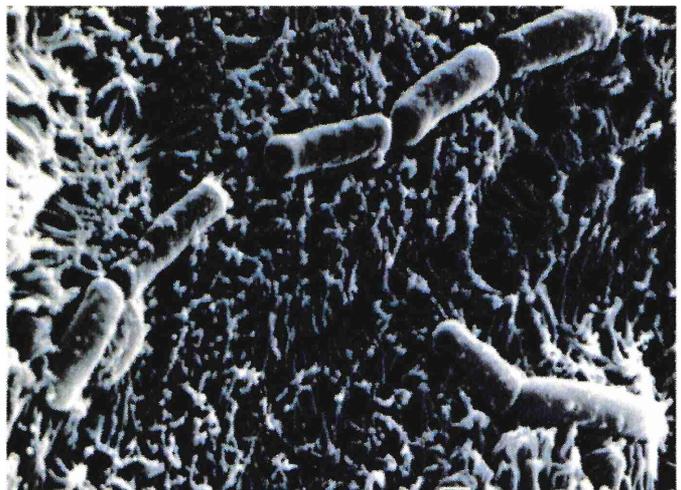
En la presente tesis se intenta aportar al conocimiento sobre los factores relevantes para la virulencia de *B. cereus*. Con este objetivo general

planteado, se abordarán los siguientes objetivos particulares:

1. Determinar la actividad biológica de factores extracelulares de *Bacillus cereus*.
2. Establecer los factores relevantes para la interacción entre *Bacillus cereus* y células de epitelio intestinal humano en cultivo, y sus efectos.
3. Analizar la correlación entre la actividad biológica y la presencia de secuencias de genes que codifican factores de virulencia.



II. OBJETIVOS



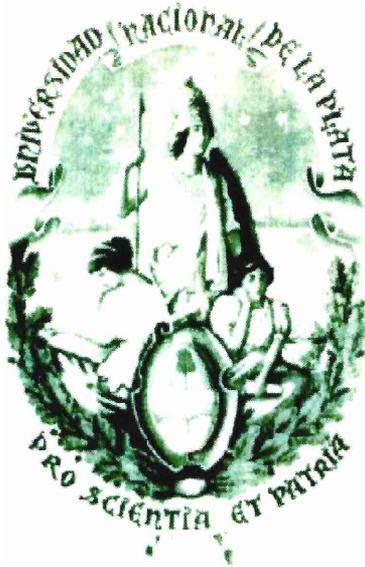
II. OBJETIVOS

II. 1. OBJETIVO GENERAL

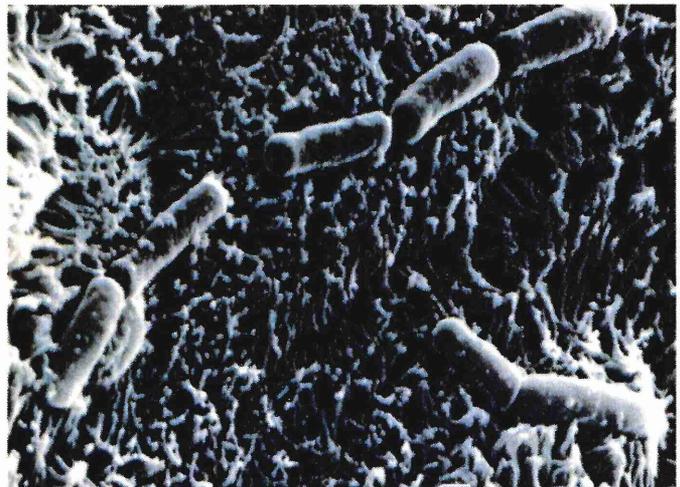
Determinar, *in vitro*, los factores de virulencia relevantes de *Bacillus cereus* como patógeno intestinal.

II. 2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la actividad biológica de factores extracelulares de *Bacillus cereus*.
2. Establecer los factores relevantes para la interacción entre *Bacillus cereus* y células de epitelio intestinal humano en cultivo, y sus efectos.
3. Analizar la correlación entre la actividad biológica y la presencia de secuencias de genes que codifican factores de virulencia.



III. MATERIALES Y METODOS



III. MATERIALES Y MÉTODOS

CEPARIO DE TRABAJO DE *Bacillus cereus*

El cepario de *B. cereus* que se utilizó para realizar esta tesis está compuesto por cepas aisladas en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, por cepas cedidas gentilmente por el Dr. R. Buchanan y el Dr. F. Schultz (T1, T2, E2, Watertown y A7) del US Department of Agriculture, ARS

Eastern Regional Research Center, Microbial Food Safety Research Unit, Philadelphia, USA, y por la cepa B10502 que fue provista por el Laboratorio Central de Salud Pública de la Provincia de Buenos Aires (Tabla 2).

Todas estas cepas se conservaron a -80°C en caldo BHIG adicionado de glicerol al 10%.

Tabla 2: Origen de las cepas utilizadas en los ensayos del presente trabajo de tesis

CEPA	ORIGEN
M2	a
2	b
3	b
M845	b
93	b
112	b
113	b
114	b
123	b
124	b
236	b
253	b
273	b
274	b
313	b
M74	b
B10502	c
12	b
18795	b
ATCC 10876	d
ATCC 13061	d
T1	e
T2	e
E2	e
Watertown	e
A7	e

a: Aislada de leche en polvo. Cátedra de Microbiología. Facultad de Cs. Exactas. UNLP.
 b: Aislada de leche maternizada. Cátedra de Microbiología. Facultad de Cs. Exactas. UNLP.
 c: Aislada de una intoxicación alimentaria. Cedida gentilmente por el Laboratorio Central de Salud Pública. Ministerio de Salud de la Pcia. de Buenos Aires.
 d: Cepa de referencia ATCC
 e: Cedidas gentilmente por el Dr. R. Buchanan y el Dr. F. Schultz del US Department of Agriculture, ARS Eastern Regional Research Center, Microbial Food Safety Research Unit, Philadelphia, USA (Buchanan and Schultz. 1992)

III. 1. ESTUDIO DE LOS FACTORES EXTRACELULARES DE *Bacillus cereus*

OBTENCION DE SOBRENADANTES

Los ensayos para estudiar los factores extracelulares de *B. cereus* se realizaron con sobrenadantes de los cultivos bacterianos que se incubaron en las condiciones correspondientes para cada ensayo.

Antes de obtener los sobrenadantes los cultivos se neutralizaron con NaOH 5 N. Luego se centrifugaron a 900g (Rolco, modelo 2636, Argentina) durante 15 minutos, y los sobrenadantes se filtraron por membrana de nitrocelulosa de 0.45µm.

III. 1. A. DETERMINACIÓN DE ENTEROTOXINA

La capacidad toxigénica de los sobrenadantes de *B. cereus* se evaluó mediante inmunodeterminación del componente NHEA del complejo NHE (ELISA, TECRA), y se procedió de acuerdo a las especificaciones dadas por el fabricante.

Los sobrenadantes se obtuvieron a partir de cultivos en medio BHIG incubados 16 hs a 32°C con agitación.

Los sobrenadantes se guardaron congelados a -20°C, hasta el momento de su uso.

III. 1. B. EFECTO BIOLÓGICO DE LOS SOBRENADANTES

III. 1. B. 1. EFECTO HEMOLÍTICO

La capacidad hemolítica de las cepas de *B. cereus*, se determinó enfrentando los sobrenadantes de las mismas con glóbulos rojos provenientes de sangre humana. Los sobrenadantes se obtuvieron a partir de cultivos en medio BHIG incubados durante 16 hs a 32°C con agitación. A continuación se describe el procedimiento utilizado.

➤ Preparación de la suspensión de glóbulos rojos:

- La sangre se recolectó en EDTA (1mg/ml de concentración final).
- Se centrifugó 5 minutos a 2000 g.
- Se extrajo el plasma y se repuso el volumen con PBS.
- El procedimiento anterior se repitió 3 veces.
- El paquete globular se resuspendió al 4% en PBS.

➤ Capacidad hemolítica

- En una placa de 96 fosas se efectuaron diluciones seriadas del sobrenadante desde 1/2 hasta 1/2000 en BHIG con volumen final de 100 µl y luego se agregaron 50 µl de suspensión de glóbulos rojos. Se incluyeron controles de 0% y 100% de hemólisis. Este último consistió en una suspensión de glóbulos rojos hecha en agua destilada estéril (sustituyendo al sobrenadante).
- Se incubó durante 2 hs a 37°C y 16 hs a 4° C.
- Se efectuó la lectura visual y la determinación de la densidad óptica a 540nm.
- El porcentaje de hemólisis se calculó de la siguiente manera:
 $(A_M/A_{100\%}) \times 100$,
Donde A_M = Absorbancia de la muestra
 $A_{100\%}$ = Absorbancia del

control 100% de hemólisis.

➤ **Experimentos de protección osmótica**

Para determinar el diámetro del poro producido por las toxinas de *B. cereus* en las membranas de los glóbulos rojos, se incubaron muestras de sobrenadantes de cultivos de 16 hs en BHIG de porcentaje de hemólisis conocido, con igual cantidad de soluciones con diferentes osmoprotectores y glóbulos rojos al 4%, 1 hs a 37°C. Luego se

determinó visualmente la presencia de hemólisis.

Las soluciones usadas fueron las siguientes:

Sacarosa: 40 mM

Rafinosa: 40 mM

Polietilenglicol 200: 40mM

Polietilenglicol 400: 40mM

Polietilenglicol 600: 40mM

Polietilenglicol 1000: 33mM

Polietilenglicol 1500: 27.5 mM

Dextrano: 500 mg/L

III. 1. B. 2. EFECTO CITOPÁTICO

➤ **Determinación de la integridad de monocapas de enterocitos humanos en cultivo mediante coloración con cristal violeta**

- Las monocapas de células Caco-2 se lavaron 2 veces con PBS.
- Los sobrenadantes (diluidos o no) se incubaron sobre las monocapas a 37°C durante diferentes intervalos de tiempo.
- Transcurrido ese tiempo, se retiraron los sobrenadantes y las células que permanecieron adheridas se fijaron durante 1 minuto con formol al 2% en PBS, para luego ser coloreadas.
- La coloración se realizó con cristal violeta (0.13%) durante 20 minutos.
- Las células fueron lavadas exhaustivamente con PBS (cuidando de no dañar la monocapa), y se solubilizó el colorante con etanol al 50%.
- Se midió la absorbancia a 650 nm
- Se determinó el porcentaje de desprendimiento:

$$P (\%) = [(A_M - A_P) / (A_C - A_P)] \times 100$$

Donde:

P = Porcentaje de desprendimiento

A_M = Absorbancia de la muestra

A_C = Absorbancia del control (monocapa no expuesta al sobrenadante)

A_P: Absorbancia del plástico (una fosa sin monocapa).

➤ **Estabilidad térmica de factores extracelulares**

- El efecto del calentamiento sobre los sobrenadantes (30 minutos a 100°C) se cuantificó de igual manera que en el ítem anterior..

➤ **Microscopía electrónica de barrido**

Se observó el efecto de los sobrenadantes sobre las células Caco-2, ensayando distintas diluciones de los sobrenadantes y distintos tiempos de incubación.

- Las células Caco-2 fueron cultivadas sobre vidrios en placas de 24 fosas, formando una monocapa.
- Los sobrenadantes se colocaron sobre las células en distintas diluciones (4/5, 3/5, 2/5, 1/5, 0) a 37°C durante distintos tiempos (20 min. y 1 hs.).

- Luego se retiraron las muestras y se lavaron las células 3 veces con PBS.
- Se fijaron con glutaraldehído al 2.5% v/v a 4°C durante 16hs; luego se deshidrataron con series de concentraciones crecientes de etanol, para finalmente efectuarles punto crítico con CO₂ (Modelo CP30, Baltec), cubriéndolas de una capa de oro (Jeol FineCoat Sputter JFC-1100, Jeol Ltd., Akishima Tokio, Japan) y observarlas al microscopio (Jeol JSM-T100, Jeol Ltd., Akishima Tokio, Japan).

➤ **Marcación fluorescente de citoesqueleto**

Para observar el citoesqueleto se prepararon placas con vidrios de 1 cm² (Assistant, Kart Hecht KG, Sondheim, Germany).

La monocapa de células Caco-2 se trató con los sobrenadantes durante 60 minutos. Luego se efectuó la marcación fluorescente (Liévin-Le Moal, 2002) según el siguiente detalle:

- Se lavaron las células 2 veces con PBS.
- Se fijaron con p-formaldehído al 3 % durante 15 minutos.
- Las células se lavaron 3 veces con PBS.
- Se dejaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con PBS-NH₄Cl (50 mM).
- Se retiró la solución anterior y se agregó Tritón X-100 al 0.2% durante 4 minutos.
- Se hicieron dos incubaciones a temperatura ambiente de 10 minutos con PBS y una con PBS-gelatina al 0.2%.
- Se retiró todo el líquido y se agregaron 20 µl de faloidina-FITC (una dilución 1/10 en PBS-gelatina 0.2% de una suspensión de 5 µg/ml). Las muestras se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda y en la oscuridad.
- Luego las células se lavaron 3 veces con PBS.
- Se efectuó una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con PBS-gelatina 0.2 %.
- Las muestras libres de agua se montaron en glicerol 50% en PBS adicionado con 0.1% de azida.
- Cada monocapa se observó en el microscopio de fluorescencia (Leica DMLB equipado con una cámara Leica DC100. Leica Microscopy Systems Ltd. CH Heerbrugg, Switzerland).
- La coloración de bacterias se realizó de la siguiente manera, luego del tratamiento con Tritón X/100:
- Las monocapas fueron incubadas con anticuerpos monoclonales contra ácidos lipoteicoicos mAbs 113D2b3 y 116A3b3 (Granato, D.; et al. 1999) diluidos 1:100 en Albúmina bovina-PBS durante 45 minutos a 22°C.
- Se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo anti-ratón marcado con TRITC (Molecular Probes) que se utilizó como anticuerpo secundario, durante 60 minutos en hielo, y a continuación 30 minutos a 37°C.
- Se realizó la tinción con faloidina-FITC
- Las preparaciones fueron montadas como se indicó anteriormente.
- Cuando fue necesario las muestras se conservaron en la oscuridad a 4°C hasta su observación.
- Para las observaciones se utilizó un microscopio confocal (modelo LSM 510 Zeiss), equipado con láser de argón de 488 nm y láser de helio y neón de 543 nm acoplado con un microscopio Axiovert 100M usando objetivos de aceite Aplanachromat 63X/1.40. La integración de las

imágenes se efectuó usando un software Zeiss bajo Windows NT.

➤ **Medición de la actividad deshidrogenasa mitocondrial**

El ensayo se realizó con sobrenadantes de cepas de *B. cereus* sobre la línea celular Caco-2.

- Las células dispuestas en placas de 24 fosas, constituyendo una monocapa, se lavaron 2 veces con PBS (termostatizado a temperatura ambiente).
- Se agregó 0.5 ml de cada muestra a la fosa correspondiente y se incubó a 37°C durante 1 hora. Se tomaron todas las células y se colocaron en un eppendorf.
- Las células se lavaron 2 veces con 0.5 ml de PBS.
- Se agregó la solución de bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2,1)2,5-difeniltetrazolio (MTT) (concentración final: 0.5 mg/ml en PBS) y se incubó 4 hs a 37°C.
- Luego se centrifugaron las muestras a 14000 g por 1 minuto y se extrajo el color del pellet con 1 ml de HCl (0.1M en isopropanol) y se leyó la absorbancia a 550 nm utilizando una longitud de onda de referencia de 650 nm.
- Se calculó el porcentaje de actividad deshidrogenasa con respecto al control, usando la siguiente fórmula:
 $P = (A_M/A_C) \times 100$
Donde:
 A_M : Absorbancia de la muestra
 A_C : Absorbancia del control.

➤ **Marcacion de fosfatidilserina de la membrana citoplasmática. Diferenciacion entre apoptosis y necrosis.**

❖ **Tinción con Anexina V**

- Se colocaron 0.5 ml de sobrenadante sobre la monocapa de células Caco-2 lavada 2 veces con PBS.
- Se incubó la placa durante 1hs a 37°C y luego se lavó dos veces con binding buffer.
- Se colocaron en cada fosa 100 µl de una dilución 1/10 de binding buffer y 5µl de Anexina V (Pharmingen).
- Luego de incubar la placa 15 minutos a temperatura ambiente, las monocapas se lavaron dos veces con binding buffer y se montaron en glicerol 50%.
- Se examinaron por microscopía de fluorescencia (Leica DMLB equipado con una cámara Leica DC100. Leica Microscopy Systems Ltd. CH Heerbrugg, Switzerland).

❖ **Tinción con Ioduro de propidio**

- Se colocaron 0.5 ml de distintas dosis de sobrenadante de las cepas ensayadas sobre la monocapa de células Caco-2 lavada 2 veces con PBS.
- Se incubó la placa durante 1hs a 37°C y luego se lavó dos veces con binding buffer adicionado con 0.2% de gelatina.
- Luego se colocó 100 ul de solución de ioduro de propidio (10ug/ml de binding buffer).
- Se incubó 15 minutos en hielo.
- Se retiró el líquido y se montaron en glicerol 50% (vol/vol).
- Se examinaron por microscopía de fluorescencia (Leica DMLB equipado con una cámara Leica DC100. Leica Microscopy Systems Ltd. CH Heerbrugg, Switzerland).
- Se calculó el porcentaje de necrosis (PN):
 $PN = CN \times 100/CT$
Donde:
CN: células con núcleo teñido de naranja por fosa
CT: células totales por fosa.

❖ **Determinación de la concentración de proteínas en los sobrenadantes (Bradford, 1976)**

- Las muestras a las cuales se les determinó proteína eran los sobrenadantes de los cultivos con los cuales se determinó necrosis (Ver punto anterior).
- El reactivo para la determinación de proteínas contenía 10 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 disueltos en 5 ml de alcohol. Esta solución se mezcló con 10 ml de ácido fosfórico 85%, se llevó a volumen (100 ml) con agua destilada y se filtró. Luego se agregó 5 ml de hidróxido de sodio 1 M.
- Se realizó una curva de calibración con seroalbúmina utilizando 5

diluciones de una solución stock de 1 mg/ml de tal manera de cubrir el rango 0.1 mg/ml-1 mg/ml.

- En tubo de vidrio se colocaron 20 μ l de muestra y 1 ml de reactivo. Se mezcló cuidadosamente y se incubó a T_{amb} durante 5 min.
- Se leyó la absorbancia a 590 nm en espectrofotómetro.
- Tanto la curva de calibración como la medida de las muestras se realizaron por duplicado.
- Se calculó la concentración de proteínas a partir de la ecuación de la recta de la curva de calibración.

Para cada cepa se graficó el porcentaje de necrosis en función de la concentración de proteínas en el sobrenadante.

III. 2. ESTUDIO DE INFECCIÓN DE CELULAS EPITELIALES EN CULTIVO POR *Bacillus cereus*

➤ Infección de las células Caco-2

Para las técnicas que se describen a continuación, la infección de las células Caco-2 con las cepas de *B. cereus* se realizó de la siguiente manera:

- Los cultivos de las cepas se efectuaron en medio BHIG incubándolos a 32°C en agitación durante 3 hs o 16 hs.
- Luego se centrifugaron a 900 g durante 10 minutos y se resuspendieron en medio DMEM complementado con cloranfenicol (100 μ g/ml).
- Se ajustó la $A_{600nm} = 1$.
- Las monocapas, en placas de 24 fosas, se lavaron 2 veces con PBS termostatzado a temperatura ambiente.
- Se colocaron las suspensiones bacterianas sobre las monocapas, a razón de 1 ml/fosa.
- Se incubaron a 37°C en ambiente de 5% de CO₂ durante 2 hs.
- Luego se continuó con el ensayo correspondiente

III. 2. A. ASOCIACION DE *Bacillus cereus* A CELULAS DE EPITELIO INTESTINAL HUMANO EM CULTIVO

III. 2. A. 1. PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA PARA DETERMINAR ASOCIACION

➤ **Relación A_{600nm} y ufc/ml**

Para determinar la relación de la absorbancia (A_{600nm}) y las unidades formadoras de colonias (ufc/ml) se realizaron las curvas de calibración para cada cepa a 32°C con agitación:

- Se realizó la curva de crecimiento: A_{600nm} vs tiempo y ufc/ml vs tiempo.
- Para la fase de crecimiento exponencial, se realizó la curva A_{600nm} vs log ufc/ml.
- A partir de estas curvas se estima el recuento a partir de la A_{600nm} obtenida.

➤ **Determinación de la dosis bacteriana que desprende la monocapa de enterocitos en cultivo**

- Las cepas se incubaron durante 16 hs en medio BHIG a 32°C.
- Se ajustó la $A_{600nm}=1$.
- Se efectuaron diluciones de los cultivos $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$ y $\frac{1}{64}$.
- Todas las muestras se colocaron por triplicado sobre las células Caco-2 (en placas de 24 fosas) previamente lavadas 2 veces con PBS.
- La placa se incubó a 37°C durante 3 hs en atmósfera de 5% de CO₂.
- Las células se lavaron 3 veces con PBS y fueron teñidas con el

colorante cristal violeta según la técnica descrita en el punto III.1.B.2.

➤ **Determinación de la CIM de cloranfenicol en medio DMEM para cepas de *Bacillus cereus***

- Se utilizaron cultivos en fase estacionaria temprana (16 hs de cultivo a 32°C).
- En una placa de 24 fosas se hicieron diluciones seriadas 1/2 de una solución de cloranfenicol de 200 µg/ml en DMEM hasta llegar a 12.5 µg/ml. Se colocó un control de medio DMEM sin antibiótico.
- A cada fosa se le agregó el mismo volumen de la suspensión bacteriana, resultando con ello que las concentraciones de antibiótico ensayadas fueron de 6.25 µg/ml a 100 µg/ml.
- La placa se incubó durante 3 hs a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂.
- La CIM (Concentración inhibitoria mínima) de determinó como la mínima concentración de antibiótico donde no se observó viraje del indicador del medio DMEM.
- Las muestras fueron sembradas en agar nutritivo para confirmar el efecto bacteriostático.

III. 2. A. 2. CUANTIFICACION DE LA ASOCIACION

- Se utilizaron cultivos de 3 hs y de 16 hs de incubación.
- Se infectó con una concentración de microorganismos estimada mediante el valor de A_{600nm} .
- Las placas se incubaron a 37°C en ambiente de 5% de CO₂ durante 2 hs o 3 hs (según correspondiera).
- Las monocapas se lavaron 3 veces con PBS y se agregó 1 ml de agua destilada estéril, a razón de 1 ml por

fosa (este paso se efectúa para provocar la lisis de las células). Las placas se incubaron durante 1 hs a 37°C.

- Se plaquearon diluciones seriadas en agar nutritivo.

- Todas las placas de agar nutritivo (las del recuento inicial y las del recuento luego de la infección) se incubaron a 32°C durante 16 hs.
- Luego se efectuó el recuento de colonias.

III. 2. A. 3. ESTUDIOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

➤ Microscopia de barrido

- Se prepararon placas con vidrios de 1 cm² (Assistent, Kart Hecht KG, Sondhein, Germany) por fosa para el desarrollo de la monocapa.
- Se realizó la infección según se indicó anteriormente. Para ello se utilizaron cultivos de 3 hs de incubación.
- Se procedió según lo descrito en el punto III. 1. B. 2.

➤ Microscopia de transmisión

- Las células se crecieron sobre membranas de colágeno de 1 cm² (MEMBRACEL, Lab. Celina, Argentina).
- Se realizó la infección según se indicó anteriormente utilizando cultivos de 3 hs de incubación.
- Cada fosa se lavó 3 veces con PBS, y se fijó con glutaraldehído al 2.5% v/v a 4°C durante 16 hs.

- La post-fijación se realizó con tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora a 4°C y posteriormente, las muestras se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes y se incluyeron en resina epoxi.
- Como orientación para la selección de las zonas a observar, se realizaron cortes finos (2 µm) que se colorearon con azul de toluidina y se observaron en el microscopio óptico.
- De las zonas seleccionadas se efectuaron cortes ultrafinos (60 nm) que se montaron en grillas de cobre. Se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y fueron examinados en el microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (Jeol Ltd., Akishima Tokio, Japan) del Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

III. 2. B. INVASIÓN A CÉLULAS CACO-2 POR CEPAS DE *Bacillus cereus*

III. 2. B. 1. PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA PARA DETERMINAR INVASION

➤ Proporción de microorganismos esporulados en cultivos de *Bacillus cereus*

- Se obtuvieron cultivos en fase estacionaria de las cepas a ensayar a 32°C
- A partir de los cultivos anteriores se efectuaron cultivos en medio BHIG

y se distribuyó en 7 tubos para cada cepa.

- Los mismos se incubaron a 32°C con agitación y a distintos tiempos (incluido el tiempo inicial) se tomaron muestras para efectuar recuento de viables y recuento de microorganismos resistentes al tratamiento térmico.

- Recuento de microorganismos viables: el recuento de ufc/ml se efectuó en superficie de agar nutritivo.
 - Recuento de esporas: al retirar el tubo de la incubación se lo colocó en un baño de agua a 60°C durante 30 minutos, luego del cual se efectuó el recuento de bacterias viables en agar nutritivo, en superficie.
 - Las placas de recuento de incubaron a 32°C durante 16 hs.
- **Determinación de la efectividad de la dosis de gentamicina**
- Los cultivos de 3 hs a 32°C de las cepas fueron centrifugados a 900 g durante 10 minutos y luego resuspendidos en PBS
 - Las muestras se estandarizaron mediante medida de la absorbancia a 600 nm de tal manera de obtener 1×10^6 ufc/ml.
 - Se efectuaron los recuentos iniciales de cada cepa en agar nutritivo. Las placas de agar nutritivo se incubaron 16 hs a 32°C.
 - Se adicionó gentamicina a las suspensiones bacterianas de tal manera de obtener una concentración final de 100 µg/ml.
 - Las muestras del punto anterior se incubaron 1 hs a 37°C. Luego se efectuaron los recuentos finales en placas de agar nutritivo que se incubaron 16 hs a 32°C.

III. 2. B. 2. CUANTIFICACION DE LA INVASION

- Para estos ensayos se utilizaron cultivos de 3 hs de incubación y se estimó la concentración de microorganismos mediante medidas de A_{600nm} .
- Se realizó la infección como se indicó anteriormente.
- Las monocapas se lavaron 3 veces con PBS.
- A las fosas destinadas a determinar asociación (2 fosas por cepa), se les agregó 1 ml de agua destilada estéril; y a las fosas destinadas a determinar invasión (2 fosas por cepa) 1 ml de solución de gentamicina de 100 µg/ml de PBS. La placa se incubó durante 1 hs a 37°C.
- A las fosas destinadas para determinar asociación, se les efectuó el recuento en agar nutritivo (AN), en superficie, luego de lisar las células eucarióticas con agua destilada.
- Las fosas que contenían la solución de gentamicina se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron durante 1 hs a 37°C con 1 ml de agua destilada estéril por fosa. Luego se efectuó el recuento de bacterias viables en agar nutritivo.
- Se realizaron los recuentos en superficie de agar nutritivo de las soluciones iniciales.
- Todas las placas de agar nutritivo se incubaron a 32°C durante 16 hs.
- Determinación de esporas: paralelamente al recuento de bacterias invasivas se tomaron 0.5 ml de las mismas fosas y se colocaron durante 30 minutos a 60°C. Luego se efectuó el recuento de bacterias viables, resistentes al tratamiento térmico.
- Con los datos obtenidos se calcularon las bacterias invasivas. Se consideró que la invasión es positiva cuando el número de esporas fué significativamente inferior al número de bacterias protegidas de la gentamicina.

III. 2. B. 3. LOCALIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS INVASIVOS POR MICROSCOPIA

➤ Microscopia confocal

- Se realizó la infección de las células Caco-2 según se describió en III. 2.
- La tinción del citoesqueleto se efectuó como se describe en el punto III. 1 B. 2.

➤ Microscopia de transmisión

Se realizó según lo descrito en el punto III. 2. A. 3.

III. 2. C. FACTORES INVOLUCRADOS EN LA INTERACCIÓN *Bacillus cereus*-ENTEROCITO

III. 2. C. 1. EFECTO DE LA CONCENTRACION MICROBIANA

- Se utilizaron cultivos de 3 hs de crecimiento de las cepas de *B. cereus*.
- Se estandarizó la concentración bacteriana por medida de la A_{600nm} y se efectuaron suspensiones de distinta concentración en medio DMEM con cloranfenicol (100 $\mu\text{g/ml}$).
- El ensayo de asociación se efectuó en células Caco-2 como se describe en el punto III. 2. A. 3.
- Se efectuaron recuentos en superficie en agar nutritivo de las suspensiones bacterianas utilizadas para la infección.
- Se graficó el número de bacterias agregadas (totales) versus el número de bacterias asociadas.

III. 2. C. 2. HIDROFOBICIDAD SUPERFICIAL

- Los cultivos, luego de reactivarse en caldo BHIG durante 16 hs a 32°C, se incubaron en caldo BHIG a 32°C durante 16 hs, con agitación.
- Los cultivos se centrifugaron durante 1 minuto a 14000 g.
- El pellet se resuspendió en 1 ml de PBS, lavándose 2 veces con PBS
- La muestra se colocó en tubo de ensayo y se agregaron 2 ml de buffer PBS.
- Se igualaron todos los cultivos a 0.6 unidades de absorbancia (A_{600nm}).
- Se colocó, en un tubo cónico de vidrio, 2 ml de la suspensión y 0.4 ml de xileno.
- Se incubó a 30°C durante 30 minutos, tapando los tubos con Parafilm.
- Luego se agitó en vortex 120 segundos y se dejó reposar 30 minutos para que se separen las fases.
- Se extrajeron 1.4 ml de la fase inferior y se leyó la A_{600nm} .
- El porcentaje de hidrofobicidad se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% H = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100$$

Donde:

A_i : es la absorbancia de la fase acuosa antes de la extracción
 A_f : es la absorbancia de la fase acuosa luego de la extracción.

III. 2. C. 3. NATURALEZA DE LAS ESTRUCTURAS INVOLUCRADAS EN LA ASOCIACIÓN

- Se utilizaron cultivos de 3 hs de incubación.
- A las suspensiones bacterianas (con $A_{600nm}=1$) se les efectuaron, previamente a la incubación sobre la monocapa de células Caco-2, los siguientes tratamientos:
 - radiación UV hasta no observar colonias luego de sembrar 100 μ l de muestra en superficie de agar nutritivo.
 - calentamiento en baño de agua a 100°C durante 30 minutos.
 - tres lavados con PBS.
 - preincubación 60 minutos a 37°C con tripsina 2.5 mg/ml y quimotripsina 2.5 mg/ml. Luego la enzima se inactivó con 20% de suero fetal bovino y las suspensiones bacterianas se lavaron 2 veces con PBS.
 - preincubación con metaperiodato 50mM durante 30 minutos a T_{amb} . Luego se lavaron 2 veces con PBS.
 - preincubación con LiCl 5M durante 30 minutos a T_{amb} . Luego se lavaron luego 2 veces con PBS.
- Los recuentos de las suspensiones iniciales y de las bacterias asociadas a las células epiteliales se efectuaron mediante el método de Breed (Meynell and Meynell, 1970): se colocaron 10 μ l de la dilución correspondiente en 1 cm^2 delimitado en un portaobjetos. Se efectuó tinción con cristal violeta (5 minutos) y se contaron las bacterias en todos los campos a lo largo del recorrido de un extremo a otro del cuadrado mediante microscopía óptica.
- El número de bacterias asociadas se calculó como ufc/ml de suspensión.

III. 2. C. 4. EFECTO DE FACTORES EXTRACELULARES SOBRE LA ASOCIACION

- Se utilizaron cultivos de 3 hs de incubación de una cepa invasiva (2) y otra no invasiva (B10502).
- Se ajustó la concentración microbiana a $A_{600nm}=2$.
- El sobrenadante del cultivo de la cepa 2 se filtró por membrana de 0.45 μ m y se realizaron diluciones $\frac{1}{2}$.
- Las suspensiones bacterianas en DMEM ($A_{600nm} = 2$), se diluyeron $\frac{1}{2}$ con cada dilución del sobrenadante de la cepa 2 de tal manera que todas las muestras quedaron con $A_{600nm} = 1$ aproximadamente.
- Las muestras de ambas cepas se colocaron por cuadruplicado sobre células Caco-2 lavadas previamente con PBS.
- Se incubaron 2 hs a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂.
- Luego el ensayo se continuó como se describe en el punto III. 2. B. 2.
- Se efectuaron recuentos en superficie en placas de agar nutritivo para obtener los valores iniciales de las muestras.
- La linealidad fue analizada mediante el programa InfoStat (InfoStat 2004).

III. 2. C. 5. EFECTO DEL CALCIO SOBRE LA ASOCIACION

Estos ensayos se efectuaron como se describe en el punto III. 2. B. 2., pero se utilizaron 2 medios de infección:

DMEM sin calcio con y sin agregado de 200 mg/L de CaCl₂.

Antes de efectuar el ensayo las células fueron lavadas 2 veces con

medio DMEM sin calcio y preincubadas 1 hs con el mismo medio.

III. 2. C. 6. EFECTO DEL TIEMPO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR SOBRE LA ASOCIACION

Estos ensayos se efectuaron como se describe en el punto III. 2. B. 2 y se

utilizaron células de distinto tiempo de cultivo, todas del mismo pasaje.

III. 2. D. DETERMINACION DEL DAÑO CELULAR PRODUCIDO A LAS CELULAS CACO-2 POR LA INFECCION DE *Bacillus cereus*.

III. 2. D. 1. ESTUDIO DEL CITOESQUELETO DE LOS ENTEROCITOS

- Se prepararon placas con vidrios de 1 cm² (Assistant, Kart Hecht KG, Sondhein, Germany) por fosa para el desarrollo de la monocapa.
- Se realizó la infección de las células Caco-2.
- Se incubaron 30, 60 o 120 minutos a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Para ello se utilizaron 3 placas diferentes
- Se lavaron 3 veces con PBS.
- infección, se extrajo el medio de cultivo cuidando de no tomar células, se filtró por membrana de
- Se realizó la tinción del citoesqueleto como se describe en el punto III. 1. B. 2.
- También se determinó la intensidad del color verde en las imágenes utilizando el programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).
- Este mismo ensayo también se realizó usando el sobrenadante del medio de infección libre de bacterias. Para esto, luego de la 0.45 um y se incubó durante 2 hs a 37°C en 5% de CO₂ sobre una monocapa de 15 días de incubación.

III. 2. D. 2. EFECTO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR: APOPTOSIS-NECROSIS

- Se prepararon placas con vidrios de 1 cm² (Assistant, Kart Hecht KG, Sondhein, Germany)) por fosa para el desarrollo de la monocapa.
- Se realizó el ensayo de infección.
- Las monocapas se lavaron 2 veces con binding buffer adicionado con gelatina al 2 %.
- De cada fosa se extrajo todo el líquido y se agregaron 100 µl de binding buffer, 5 µl de Anexina V-FITC, 1 µg/ml de yoduro de propidio y 100 µg/ml de RNAsa. Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz.
- Las muestras se lavaron 3 veces con binding buffer y se montaron en portaobjetos sobre glicerol 50 %.
- Se observaron en el microscopio de fluorescencia (Leica DMLB equipado con una cámara Leica DC100. Leica Microscopy Systems Ltd. CH Heerbrugg, Switzerland).

III. 2. E. ESTUDIO DE LA VIAS DE SEÑALIZACION INVOLUCRADAS EN LA INFECCION DE CELULAS CACO-2 POR *Bacillus cereus*

III. 2. E. 1. ESTUDIO DEL CITOESQUELETO DE LAS CELULAS EPITELIALES LUEGO DE LA INFECCION CON *Bacillus cereus* EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE LAS VIAS DE SEÑALIZACION

- Se prepararon placas con vidrios de 1 cm² (Assistent, Kart Hecht KG, Sondhein, Germany) por fosa para el desarrollo de la monocapa.
- Los inhibidores usados fueron los siguientes: genisteína (49.5 ug/ml), filipina III (14.4 ug/ml), ciclodextrina (7.3 ug/ml), calfofostina (0.009 ug/ml), dantroleno (5.8 ug/ml), wortmanina (0.26 ug/ml), nocodazol (5.7 ug/ml), U73122 9.3 ug/ml) y estaurosporina (37 ng/ml).
- El ensayo se realizó como se describió en el punto III. 1. B. 2.
- Las muestras consistían en: cepa, cepa + inhibidor, y DMEM solo.

III. 2. E. 2. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LAS VÍAS DE LOS LÍPIDOS FOSFORILADOS SOBRE LA ADHESION-INVASION DE LA CEPA T1

Este ensayo se efectuó como se describe en el punto III. 2. B. 2 realizando la infección en presencia de los inhibidores.

Las muestras consistían en: cepa, cepa + wortmanina (concentración final: 0.26 ug/ml), cepa + U73122 (concentración final 9.3 ug/ml) y cepa + wortmanina + U73122.

III. 2. E. 3. EFECTO DE INHIBIDORES DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN POR LÍPIDOS FOSFORILADOS SOBRE EL DESPRENDIMIENTO DE ENTEROCITOS LUEGO DE LA INFECCIÓN CON CEPAS DE *Bacillus cereus*

- Los cultivos se resuspendieron en medio DMEM con cloranfenicol para obtener muestras de DO: 2, 1.6, 1.2 y 0.8.
- Las células Caco-2 se lavaron dos veces con PBS.
- Se ensayaron distintas diluciones de la cepa sin inhibidores, las distintas diluciones de la cepa + wortmanina (0.26 ug/ml) o U73122 (9.2 ug/ml) o los dos inhibidores juntos, y DMEM solo.
- Todas estas muestras se colocaron sobre las monocapas, a razón de 1 ml por fosa.
- La placa se incubó a 37°C en ambiente de 5% de CO₂ durante 2 hs.
- Luego las monocapas se lavaron 3 veces con PBS.
- Se efectuó coloración de cristal violeta como se describe en el punto III. 1. B. 2.

III. 3. ANÁLISIS MULTIVARIADO DE FACTORES DE VIRULENCIA

III. 3. A. RIBOTIPIFICACIÓN

La ribotipificación se llevó a cabo siguiendo los métodos standard de un equipo automático RiboPrinter System (Dupont Qualicon, USA) (Bruce, 1996).

Las bacterias fueron crecidas durante 16 hs a 37°C en agar Trypticase Soya (Merck).

Los procesos automáticos incluyen lisis de las células bacterianas y corte del ADN mediante la endonucleasa de restricción EcoRI.

Los fragmentos de ADN fueron hibridados con una sonda de ADN de genes de las subunidades grande y pequeña de rARN de *Escherichia coli*.

La calidad de ADN extraído se controló mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v (Invitrogen Corp., California, USA) usando buffer TAE 1x y bromuro de etidio (0.5 mg/ml).

El agrupamiento se realizó según el coeficiente de Dice que se define como (Priest and Austin, 1993):

III. 3. B. PCR

El ADN cromosomal fue obtenido mediante columnas de purificación de ADN (GFX Genomic Blood DNA Purification Kit, Amersham Biosciences Corp, New Jersey, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En todas las cepas se ensayó la presencia de los genes *sph* (esfingomielinasa), *bceT* (enterotoxina T), *entFM* (enterotoxina FM), *entS* (enterotoxina S), *pipIC* (fosfatidilinositol fosfolipasa C) y componentes de los complejos NHE (enterotoxina no hemolítica) y HBL (hemolisina BL). Los primers y temperaturas de hibridación se encuentran en la tabla 3.

Las amplificaciones del ADN se llevaron a cabo en un equipo de gradiente Eppendorf Mastercycler (Eppendorf-Netheler-Hinz GMBH, Hamburg, Germany). La mezcla de

$$S_D = \frac{2a}{2a+b+c}$$

Donde:

S_D : Coeficiente de Dice

a: Número de resultados positivos en todas las OTU (unidades taxonómicas estudiadas).

b: Número de resultados no coincidentes entre las OTU (positivo para una OTU y negativa para la otra)

c: igual que b pero con los resultados invertidos.

Con los valores obtenidos se construyó el dendrograma utilizando el método del ligamiento promedio (UPGMA).

reacción contenía: buffer PCR, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM de cada uno, *Taq* DNA polymerase 1U (Invitrogen Corp.), primers 1 μM de cada uno y 50 ng de ADN en 10 μl de volumen final.

La amplificación de la PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 3 min, 30 ciclos de: desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación de los primers a la temperatura correspondiente durante 30 s, y extensión del ADN a 72°C durante 30 s. La extensión final se realizó a 72°C durante 5 min.

Las amplificaciones fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v durante 1 hs a 90V usando marcador de PM de 100 a 400 bp (productos Bio-Lógicos, Bernal, Argentina).

Tabla 3: Primers y temperaturas de hibridación utilizados en los estudios de PCR de las cepas de *B. cereus*.

Gen	Primer	Secuencia del primer (5'- 3') ^a	Temperatura de hibridación (°C) ^a
<i>Sph</i>	Ph1 F	CGTGCCGATTTAATTGGGGC	58
	Ph2 F	CAATGTTTTAAACATGGATGCG	
<i>BceT</i>	ETF	TTACATTACCAGGACGTGCTT	56
	ETR	TGTTTGTGATTGTAATTCAGG	
<i>EntFM</i>	ENTA F	ATGAAAAAAGTAATTTGCAGG	52
	ENTB R	TTAGTATGCTTTTGTGTAACC	
<i>EntS</i>	TY123 F	GGTTTAGCAGCAGCTTCTGTAGCTGGCG	60
	TY125 R	GTTTCGTTAGATACAGCAGAACCACC	
<i>PiplC</i>	PC105 F	CGCTATCAATGGACCATGG	57
	PC106 R	GGACTATTCCATGCTGTACC	
<i>NheA</i>	nheA 344S F	TACGCTAAGGAGGGGCA	55
	nheA 843A R	GTTTTTATTGCTTCATCGGCT	
<i>NheB</i>	NheB 1500 S F	CTATCAGCACTTATGGCAG	55
	NheB 2269 A R	ACTCCTAGCGGTGTTCC	
<i>NheC</i>	NheC 2820 S F	CGGTAGTGATTGCTGGG	55
	NheC 3401 S R	CAGCATTCGTACTTGCCAA	
<i>HblA</i>	HblA F	AAGCAATGGAATACAATGGG	56
	HblA R	AGAATCTAAATCATGCCACTGC	
<i>HblB</i>	HblB F	AAGCAATGGAATACAATGGG	58
	HblB R	AATATGTCCCAGTACACCCG	
<i>HblC</i>	HblC F	GATACTAATGTGGCAACTGC	58
	HblC R	TTGAGACTGCTGTCTAGTTG	
<i>HblD</i>	HblD F	ACCGGTAACACTATTCTAGC	58
	HblD R	GAGTCCATATGCTTAGATGC	

Referencias:

^a Ghelardi et al, 2002; Guinebretière et al, 2002. F : forward; R : reverse.

III. 3. C. RELACIÓN ENTRE ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y PRESENCIA DE LOS GENES DE VIRULENCIA

Con los resultados de PCR y actividad biológica (desprendimiento celular durante la infección y modelo de desprendimiento celular) se efectuó un análisis biplot.

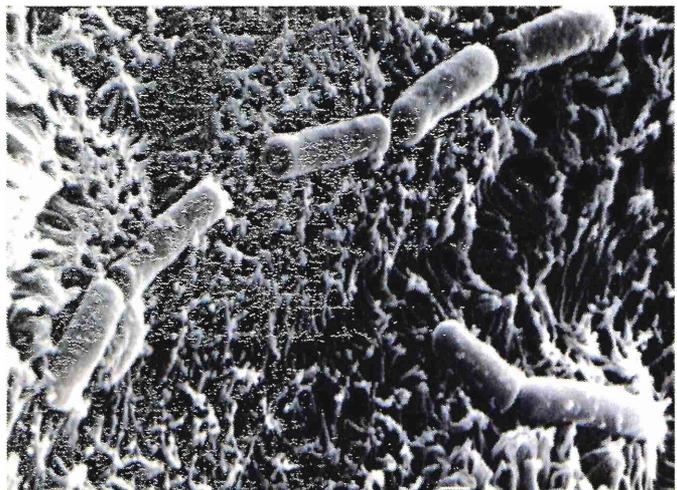
Los resultados de desprendimiento celular durante la infección se codificaron de la siguiente manera: 1 para las cepas que producen desprendimiento y 0 para las cepas que no producen desprendimiento. Los

resultados del modelo de desprendimiento celular por efecto de los factores extracelulares se codificaron como 1 para las cepas de alto desprendimiento celular; 0,5 para las cepas de bajo desprendimiento celular; y 0 para las cepas que no producen desprendimiento.

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa Infostat (InfoStat 2004).

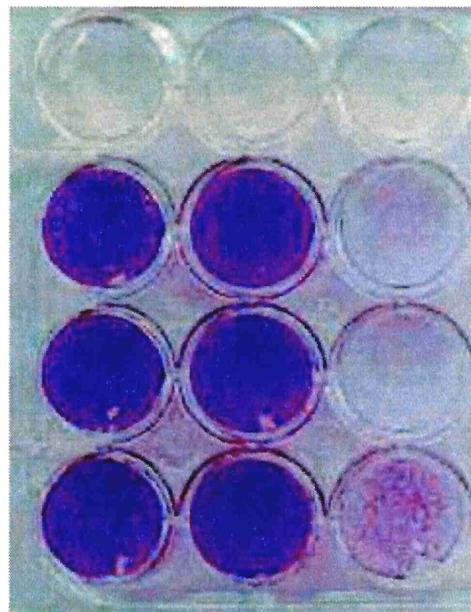


IV. RESULTADOS Y DISCUSION





1. ESTUDIO DE LOS FACTORES EXTRACELULARES de *Bacillus cereus*



IV. RESULTADOS

IV. 1. ESTUDIO DE LOS FACTORES EXTRACELULARES DE *Bacillus cereus*

IV. 1. A. DETERMINACIÓN DE ENTEROTOXINAS

La capacidad toxigénica de cepas de *B. cereus* de este estudio se evaluó mediante ELISA (TECRA) que determina el componente NHEA del complejo NHE (Fagerlund et al., 2007)

Las determinaciones realizadas en los sobrenadantes de los cultivos en BHIG en fase estacionaria dieron

resultado positivo para todas las cepas del presente estudio.

Al medir la absorbancia resultante luego de efectuar el ensayo (Figura 8) todas las cepas dan un resultado igual o mayor al control positivo, a excepción de las cepas 313 y 93 que dan valores menores, pero igualmente resultan positivas

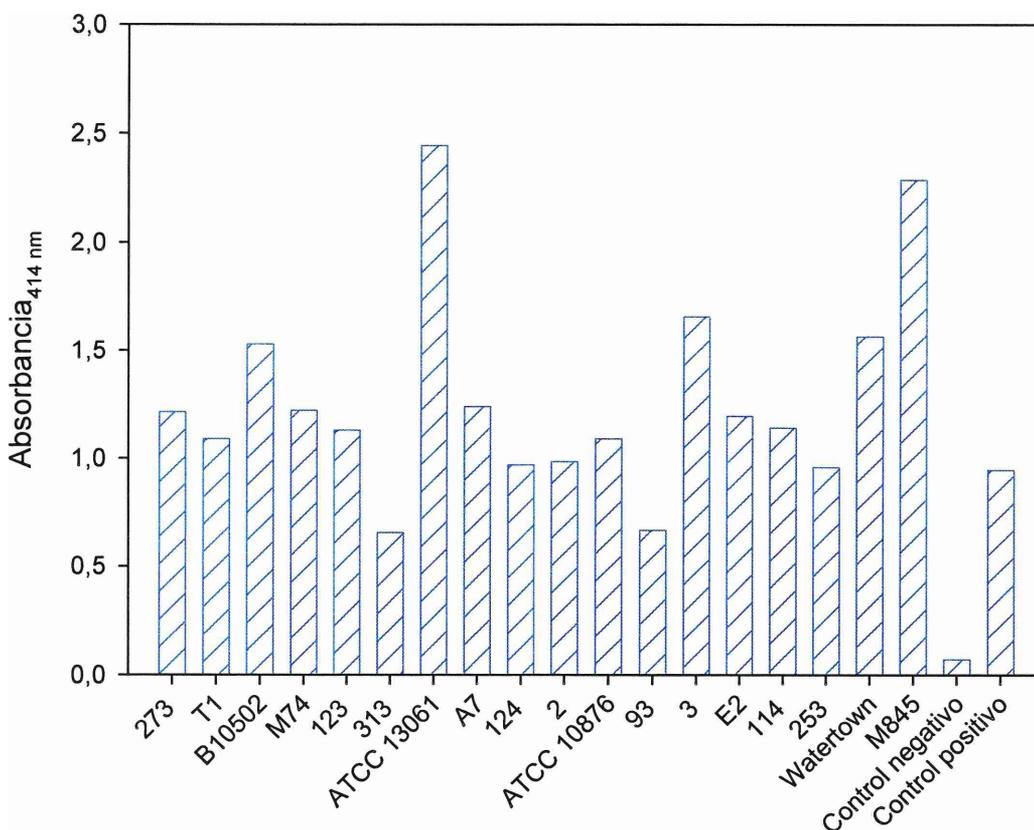


Figura 8: Absorbancia resultante luego de realizar el test de ELISA (TECRA) a los sobrenadantes de las cepas de *B. cereus*

IV. 1. B. EFECTO BIOLÓGICO DE LOS FACTORES EXTRACELULARES DE *Bacillus cereus*

IV. 1. B 1. EFECTO HEMOLÍTICO

➤ Capacidad hemolítica

Los sobrenadantes de las cepas de *B. cereus* obtenidos a partir de cultivos en BHIG luego de 16 hs de incubación a 32°C, resultaron ser todos hemolíticos frente a glóbulos rojos de origen humano (100% de hemólisis para todas las cepas). De hecho una de las propiedades que definen al grupo *B. cereus* y que fue utilizada para la selección de las cepas utilizadas en esta tesis es su capacidad hemolítica en ágar sangre.

➤ Experimentos de protección osmótica

Dado que algunos factores de virulencia de *B. cereus* pertenecen al grupo de las toxinas formadoras de poro, se quiso estimar el tamaño de poro producido por estas en las membranas de los glóbulos rojos de origen humano.

Para ello se utilizaron soluciones de distinta osmolaridad que se corresponden cada una con un determinado radio de difusión hidrodinámico. Este se define como el radio de una esfera rígida no cargada la cual presenta el mismo comportamiento hidrodinámico de un soluto en solución incluyendo las moléculas de agua de hidratación, que al encontrarse estrechamente unidas al soluto, también participan en el cambio de la viscosidad de la solución (Schultz and Solomon, 1961).

El radio hidrodinámico (Rh) de los solutos está dado por la siguiente ecuación, que tiene en cuenta la relación de viscosidad de Einstein y el tamaño

del soluto, que es muy similar al del solvente (Schultz and Solomon, 1961; Scherrer and Gerhardt, 1971; Armstrong et al., 2004):

$$Rh = \left[\frac{3 [\eta] M}{10\pi N} \right]^{1/3} \text{ (cm)}$$

Donde:

Rh: radio hidrodinámico

η : la viscosidad intrínseca del polímero en solución (ml/g)

M: peso molecular del polímero (gr/mol)

N: número de Avogadro

Los Rh correspondientes a cada solución son los siguientes: sacarosa, 0.46 nm; PEG 200, 0.56 nm; rafinosa, 0.57 nm; PEG 400, 0.68 nm; PEG 600, 0.80 nm; PEG 1000, 1.00 nm; PEG 1500, 1.2 nm (Scherrer and Gerhardt, 1971).

Luego de incubar el sobrenadante de la cepa M2 obtenido de cultivos en BHIG cosechado en fase estacionaria no hubo protección frente a la hemólisis con ninguno de los compuestos ensayados (100 % de hemólisis); las muestras con los distintos protectores osmóticos presentaban la misma hemólisis que la muestra sin protectores.

Idéntico resultado presentó la misma cepa, M2, cuando se ensayó la hemólisis con una solución de dextrano (PM: $3.8 \cdot 10^6$ Da) de 500 mg/L con un radio de difusión hidrodinámico de 4.5 nm aproximadamente (Scherrer and Gerhardt, 1971).

IV. 1. B. 2. EFECTO CITOPÁTICO

➤ Efecto sobre la integridad de monocapas de enterocitos humanos en cultivo

Los sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos de 16 hs a 32°C de las cepas de *B. cereus* que fueron incubados sobre células de epitelio intestinal humano de la línea Caco-2 durante 1 hs a 37°C revelaron una acción citopática que condujo al desprendimiento celular

(Figura 9). Excepto para las cepas B10502 y 93, que no produjeron desprendimiento significativo, en el resto de las cepas se observó desprendimiento. El control utilizado fue medio de cultivo BHIG que no produce alteraciones en las células. Es importante señalar que sobrenadantes neutralizados de lactobacilos y bifidobacterias no produjeron desprendimiento celular.

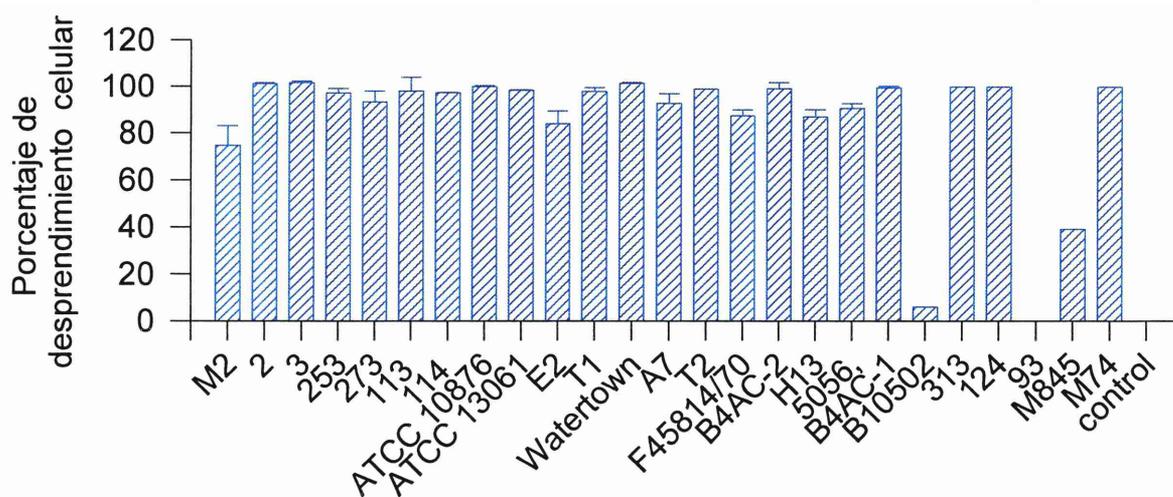


Figura 9: Desprendimiento de la monocapa de Caco-2 luego de 1hs de co-incubación a 37°C con los sobrenadantes de cultivos de 16 hs de *B. cereus*. Experimento representativo de 3 ensayos independientes. Las barras indican la desviación standard.

El estudio de las curvas de dosis-respuesta permitió analizar el efecto que producían diferentes concentraciones de los sobrenadantes de cultivos de 16 hs de incubación de las cepas de *B. cereus* sobre el desprendimiento celular. De este análisis se definieron tres tipos de curvas: cepas que producen un desprendimiento total de las células para al menos dos diluciones seriadas, por ejemplo la cepa 3 (Figura 10 A), que fueron denominadas de “desprendimiento alto”; cepas cuya

capacidad de desprendimiento celular es dependiente de la dilución aún a altas concentraciones del sobrenadante, como por ejemplo la cepa T2 (Figura 10 B), denominadas de “desprendimiento bajo”; y cepas que no producen desprendimiento celular, por ejemplo la cepa B10502 (Figura 10 C). Al analizar el comportamiento de cada cepa las mismas se pueden clasificar en alguno de los tres grupos mencionados anteriormente (Tabla 4).

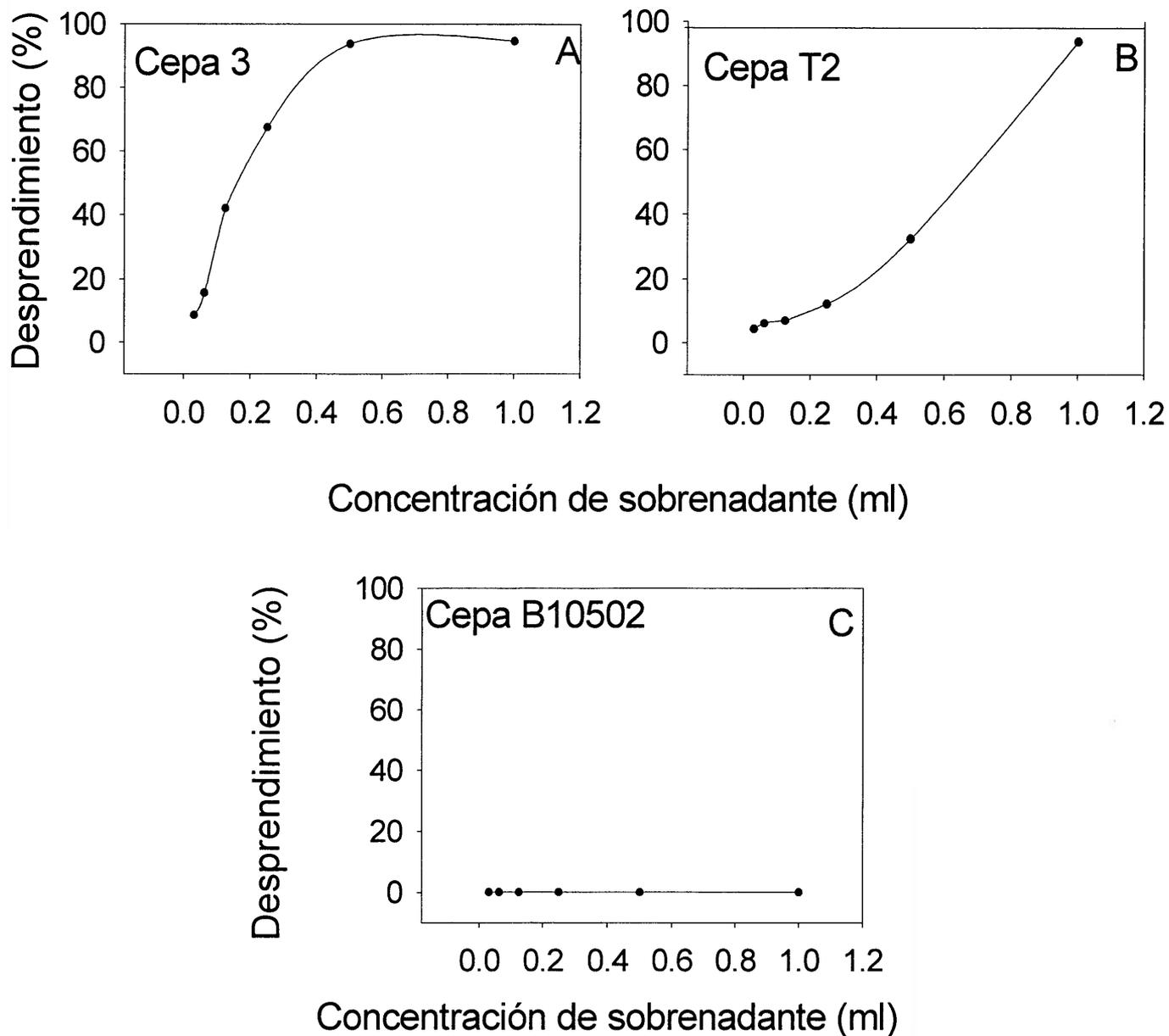


Figura 10: Curvas dosis-respuesta de desprendimiento celular producido por sobrenadantes de *B. cereus* de cultivos de 16 hs luego de 1 hs. de incubación sobre células Caco-2. En el gráfico se muestran ejemplos de los tres modelos encontrados: desprendimiento alto (A), desprendimiento bajo (B) y sin desprendimiento (C). Experimento representativo de 3 ensayos independientes.

Tabla 4: Modelo de desprendimiento de los sobrenadantes de cultivos de 16 hs a 32°C de las cepas de *B. cereus* luego de 1 hs de incubación con células Caco-2. (DA: desprendimiento alto; DB: desprendimiento bajo; NDp.: no desprende).

CEPAS	MODELO DE DESPRENDIMIENTO
M2	DB
2	DA
3	DA
T2	DB
253	DA
273	DA
ATCC 10876	DA
ATCC 13061	DA
B10502	ND
T1	DA
E2	DA
Watertown	DA
113	DA
114	DB
313	DB
124	DA
93	ND
M845	DB
M74	DA

➤ Estabilidad térmica de los factores extracelulares

El tratamiento térmico afectó la acción tóxica de los sobrenadantes sobre la línea Caco-2 para todas las cepas ensayadas (Figura 11). En el caso de las cepas M2 la inactivación fue parcial ya que si bien el efecto fue mucho menor que en las muestras sin tratar, las muestras tratadas térmicamente produjeron el desprendimiento de un cierto porcentaje de células. En cambio para las cepas 113, 2, 253, 273 y T2 esta inactivación parece ser total, ya que en todos los casos las monocapas se observaban intactas. Para las cepas 113, 2, 273 y T2 se observan valores negativos de desprendimiento: esto se debe a que se obtuvieron valores de absorbancia más

altos que el control, ya que las monocapas presentaron una mayor capacidad de retención del colorante respecto de la monocapa tratada sólo con BHIG, pero esto no representó una diferencia significativa respecto al control ($p > 0.05$).

En este tipo de ensayos, como en todos los ensayos biológicos que emplean células, existe una variabilidad inter-experimento, lo que a veces resulta en barras de error muy grandes cuando se promedian 2 o más experimentos. Este es uno de los motivos por los cuales, en la mayoría de los gráficos se ha colocado un experimento representativo de los resultados obtenidos.

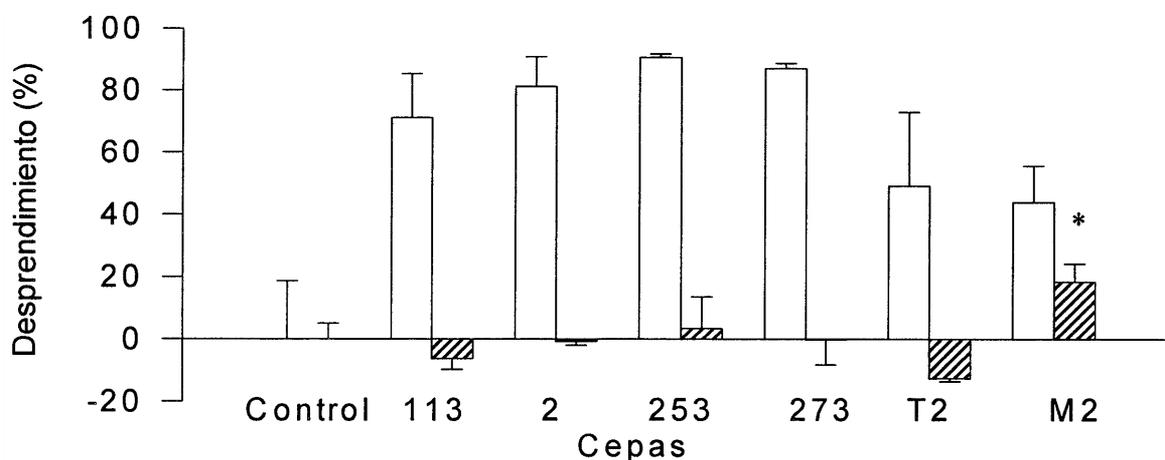


Figura 11: Efecto del calentamiento (30 minutos a 100°C) sobre la actividad biológica de los sobrenadantes de cultivos de 16 hs de incubación. Experimento representativo de 3 experimentos independientes. Las barras indican desviación standard. *: $p < 0.05$ respecto al control.

Referencias:  SN s/tratamiento térmico
 SN c/tratamiento térmico

➤ **Observación mediante Microscopía Electrónica de barrido (MEB)**

Para la cepa M2 se corroboró el efecto que producen sus factores extracelulares sobre las células mediante la observación por MEB de diferentes muestras. Los ensayos se

efectuaron a la misma temperatura que en los ensayos de desprendimiento celular pero a tiempos menores para poder observar la condición en la que se hallan las células antes de desprenderse. Las imágenes demuestran un marcado efecto citopático cuando las células son tratadas durante 20 minutos con 0.5 ml de sobrenadante (Figura 12 A).

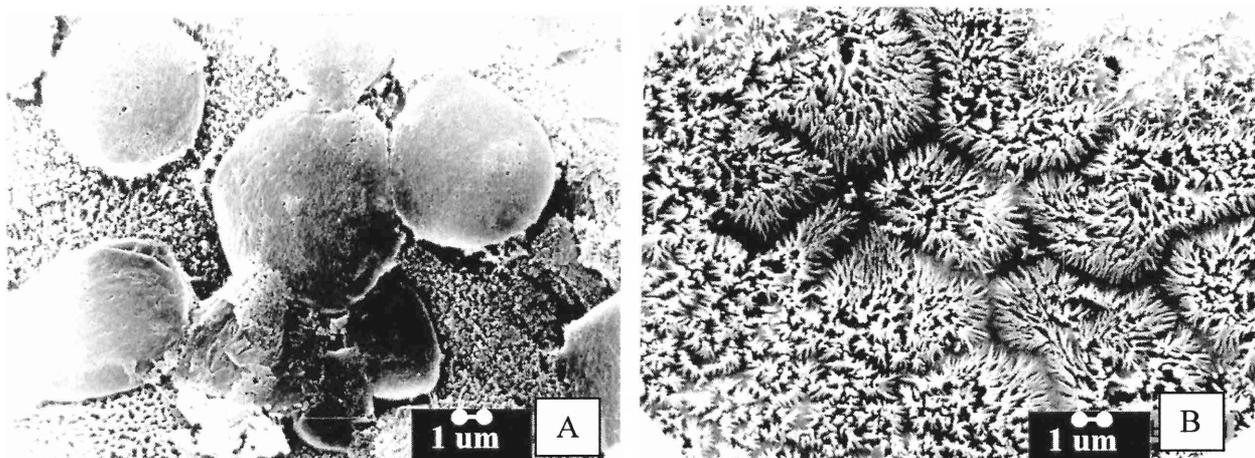


Figura 12: Microscopía electrónica de barrido, de células Caco-2 tratadas durante 20 minutos con sobrenadante de la cepa M2 (A), y con medio de cultivo BHIG (B). ●● : 1 μm

El control, efectuado coincubando las monocapas con BHIG, muestra las típicas microvellosidades de las células diferenciadas (Figura 12 B). Esto contrasta con las células incubadas con los sobrenadantes de cultivos de la cepa

➤ **Efecto del sobrenadante sobre el citoesqueleto de las células eucarióticas**

En los ensayos que se llevaron a cabo para determinar si los factores extracelulares de *B. cereus* eran capaces de alterar de alguna forma el citoesqueleto, se observó que los sobrenadantes de los cultivos de 16 hs de incubación pueden afectar la red de actina, ya que provocaron una desorganización de la misma en las células Caco-2, en relación al control, luego de 1 hs de tratamiento (Figura 13). En las células tratadas con BHIG sin factores bacterianos (Figura 13 A) puede observarse la monocapa uniforme, con la F-actina localizada en los bordes y en la superficie apical, asociada a las microvellosidades. Otra particularidad presenta el plano basolateral de las mismas células (Figura 13 B) donde se observan las líneas de stress.

En cambio, en las células tratadas con los sobrenadantes se observan ciertas diferencias. Por ejemplo en el plano apical de las células (Figura 13 C) puede observarse en algunas de ellas la falta la fluorescencia característica de la tinción de la F-actina, lo que resulta en zonas oscuras. Otro detalle que se observa es la forma redondeada de ciertas células; y en aquellas que conservaron las microvellosidades, éstas se observan con menor nitidez. La observación del plano basolateral de las mismas células demuestra una marcación muy fuerte de la F-actina en la periferia (Figura 13 D).

M2, donde existen zonas donde las microvellosidades han desaparecido y los enterocitos se observan redondeados. Esta morfología sería un estadio previo al desprendimiento celular.

Cuando observamos otra muestra, también tratada con sobrenadante (Figura 13 E) se observan las mismas características descritas anteriormente, con las zonas oscuras, sin tinción de la F-actina y la pérdida de la forma característica de una célula epitelial.

En la última muestra observada desde el plano apical, se encuentran células que tienen disminuido la concentración de F-actina y otras donde se la observa con distribución normal (Figura 13 F).

Cuando se analizan imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de enterocitos tratados de igual manera, también se observan células redondeadas con la parte central oscura, y los bordes intensamente teñidos (Figura 14 B). Si bien ambas cepas provocan daño (cepas 2 y M2), existe una diferencia notable en la proporción en que lo producen: en el caso de la cepa M2 (Figura 14 C) el daño es menor. El control (Figura 14 A) presenta las células en una monocapa uniforme, con la F-actina en los bordes y en el ribete en cepillo.

El análisis de imágenes resultantes de la proyección de los planos focales obtenidas mediante microscopía confocal, nos permitió confirmar que las zonas centrales de las células donde no se observaba fluorescencia verde correspondía a regiones sin F-actina y no estaban originadas por problemas de enfoque en la microscopía de fluorescencia convencional.

En la galería de imágenes (Figura 15) donde se observan todos los planos focales se pudo observar que en el control (Figura 15 A) la F-actina se

distribuye en menos planos que en las células tratadas con el sobrenadante de la cepa 2 (Figura 15 B). Además en el control se observó la fluorescencia homogéneamente distribuida en los bordes, en los primeros planos, y en el ribete en cepillo, en los planos tomados a mayor distancia desde el polo basolateral (Figura 15 A). En el caso de

las células tratadas con el sobrenadante de la cepa 2, la fluorescencia se encuentra distribuida en mayor número de planos focales que el control. Esto indicaría una distribución irregular de la red de actina lo cual está de acuerdo con lo observado en la Figura 14 que muestra una proyección de planos focales.

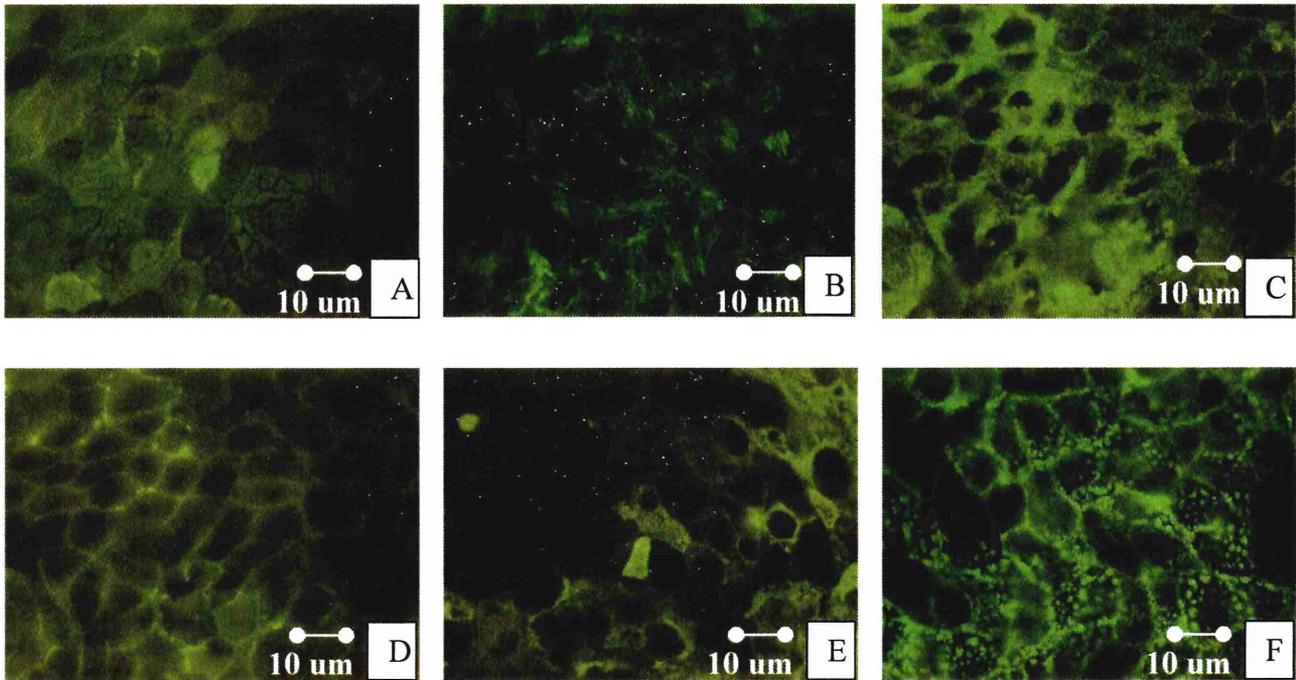


Figura 13: Tinción del citoesqueleto de células Caco-2 tratadas con sobrenadantes de cultivos de *B. cereus*. Control plano apical (A), control plano basolateral (B), cepa 253 plano apical (C), cepa 253 plano basolateral (D), cepa 2 plano apical (E), cepa 3 plano apical (F). ●—● : 10 µm. Experimento representativo de 3 ensayos independientes

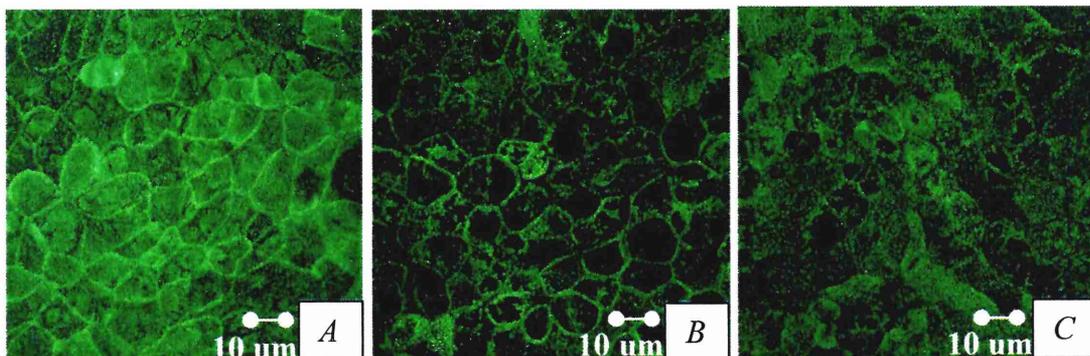


Figura 14: Proyección de planos focales de microscopía confocal de células Caco-2 tratadas con sobrenadantes de cultivos de *B. cereus* y luego teñidas con faloidina. Células incubadas con BHIG (A), células incubadas con sobrenadante de la cepa 2 (B) y células incubadas con el sobrenadante de la cepa M2 (C). ●—●: 10 µm Experimento representativo de 3 ensayos independientes

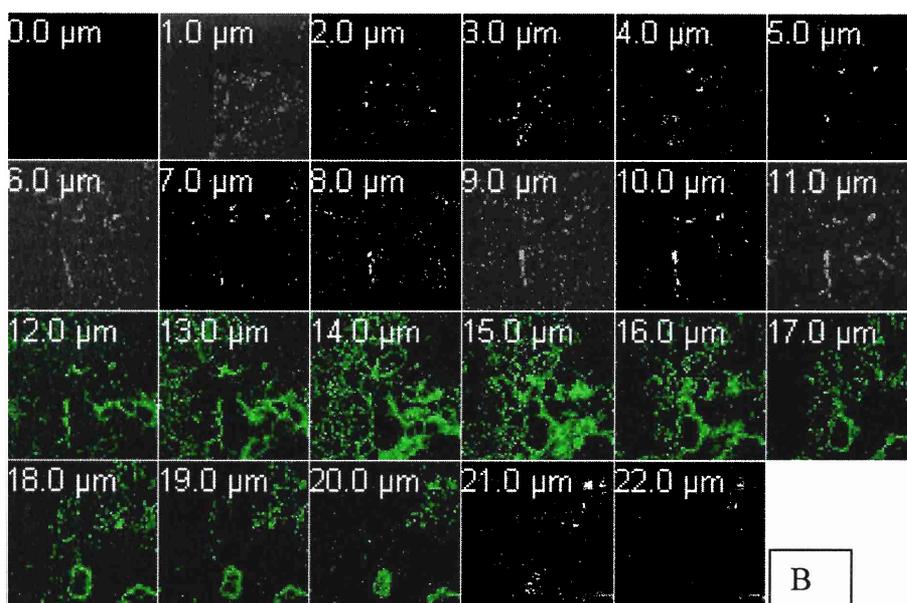
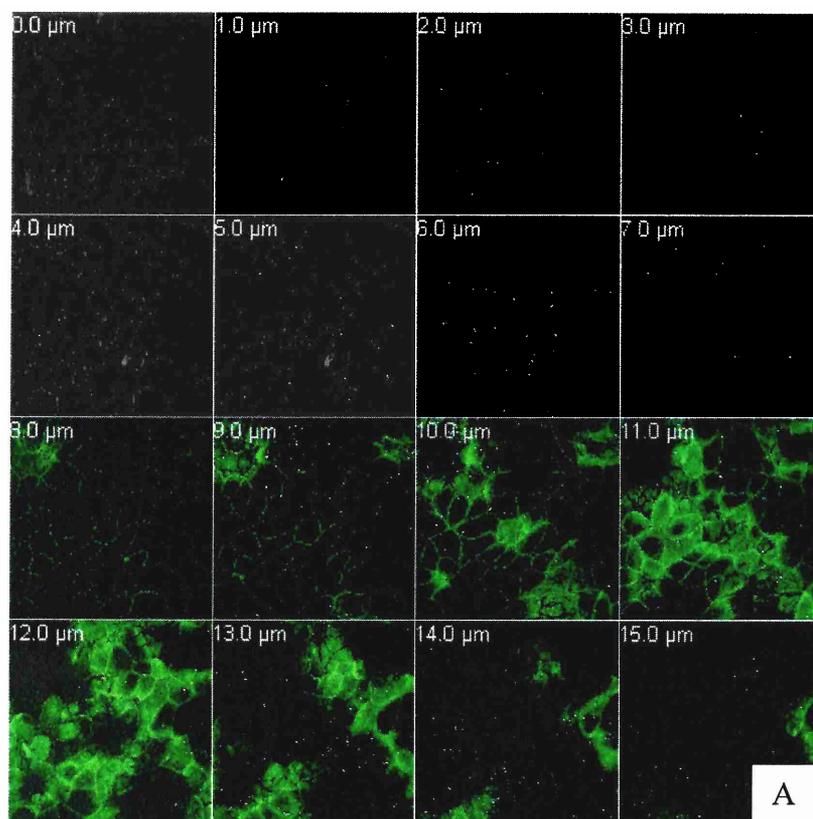


Figura 15. Galería de imágenes de microscopía confocal de células Caco-2 tratadas con sobrenadante de la cepa 2 de *B. cereus* (B) y con medio BHIG (A). La tinción se realizó con faloidina-FITC. Experimento representativo de 3 experimentos independientes.

➤ **Actividad deshidrogenasa mitocondrial**

La medición de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial es considerada un indicador de la viabilidad, y en este estudio se utilizó para cuantificar la acción de los sobrenadantes sobre las células Caco-2. El bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2,1) 2,5-difeniltetrazolio (MTT) es una sal de tetrazolio soluble en agua, amarilla, que se convierte a formazan, insoluble, de color púrpura, por efecto de la actividad deshidrogenasa mitocondrial.

En estos ensayos se utilizaron sobrenadantes de 16 cepas de *B. cereus* obtenidos a partir de cultivos a 32°C en caldo BHIG en fase estacionaria y coinubados durante 1hs a 37°C con las células Caco-2.

Del total de cepas ensayadas, 15 disminuyeron la actividad deshidrogenasa y solo la cepa T2 no afectó el parámetro medido (Figura 16).

Las cepas que más efecto produjeron sobre la actividad de la enzima de las células Caco-2 disminuyeron el porcentaje alrededor del 90% respecto del control como es el caso de las cepas Watertown, A7, F45814/70, B4AC-2 y B4AC-1 (Figura 16). Descontando la cepa T2, que como ya dijimos no afectó la respuesta enzimática (aunque sí dió lugar a desprendimiento), la cepa que menos efecto produjo fue la 273 que solo disminuyó la actividad enzimática un 13%, observándose por lo tanto un 77% de actividad residual (Figura 16). Para medir la actividad enzimática de todas las células, y no tener el sesgo de medir sólo los enterocitos que no se desprendían, luego de la incubación con los sobrenadantes, se desprendieron todas las células y se continuó el ensayo con el total de las células.

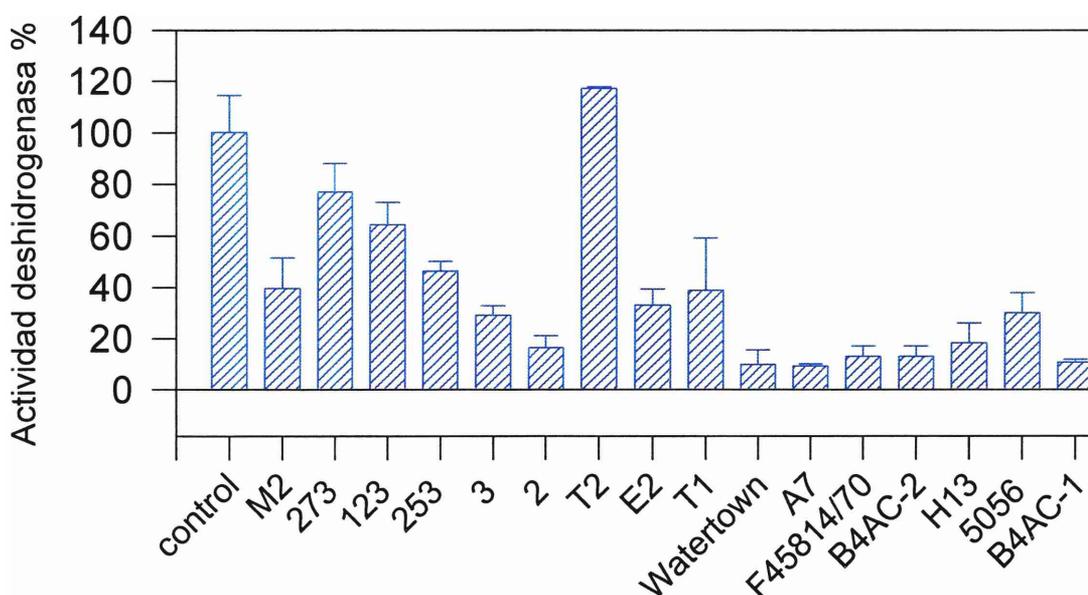


Figura 16: Medida del efecto sobre la actividad deshidrogenasa mitocondrial de las células Caco-2 de la coincubación con sobrenadantes de cultivos en BHIG de cepas de *B. cereus* durante 1 hs a 37°C. Las barras indican desviación standard. Experimento representativo de 3 ensayos independientes.

Este método también se usó para determinar el efecto que producía la coincubación de los sobrenadantes de la cepa M2, con la monocapa de Caco-2, durante distintos intervalos de tiempo. De esta manera se pudo observar que la actividad deshidrogenasa es afectada

desde cortos periodos de tiempo, logrando disminuir la actividad enzimática en un 50% a los 30 minutos de incubación. Al cabo de 1 hs la actividad remanente es un 25% de la actividad del control (Figura 17).

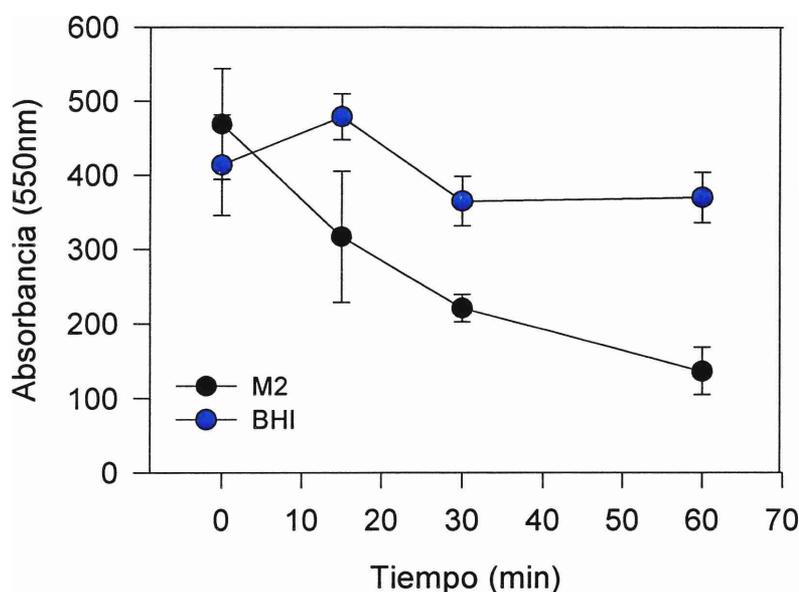


Figura 17: Cinética de la actividad deshidrogenasa mitocondrial de las células Caco-2 con sobrenadantes filtrados de la cepa M2 provenientes de cultivos de 16 hs a 32°C. Las barras indican desviación standard.

➤ **Marcación de fosfatidilserina de la membrana citoplasmática. Diferenciación entre apoptosis y necrosis**

Uno de los eventos tempranos de la apoptosis es la traslocación de la fosfatidilserina desde el interior de la membrana celular hacia el exterior, quedando expuesta al medio extracelular. Una de las maneras de poder observar este fenómeno es mediante anexina V, una proteína con afinidad por los fosfolípidos, en especial la fosfatidilserina (PS). Si la Anexina V se halla conjugada con un fluorocromo,

como FITC, permite la observación de este fenómeno por microscopía de fluorescencia (Vermes et al., 1995).

Las células Caco-2 tratadas con Anexina V-FITC que previamente fueron incubadas con los sobrenadantes filtrados de los cultivos de las cepas M2, T2 y 273 muestran una fluorescencia verde, indicador de la unión de la proteína con fosfatidilserina (Figura 18).

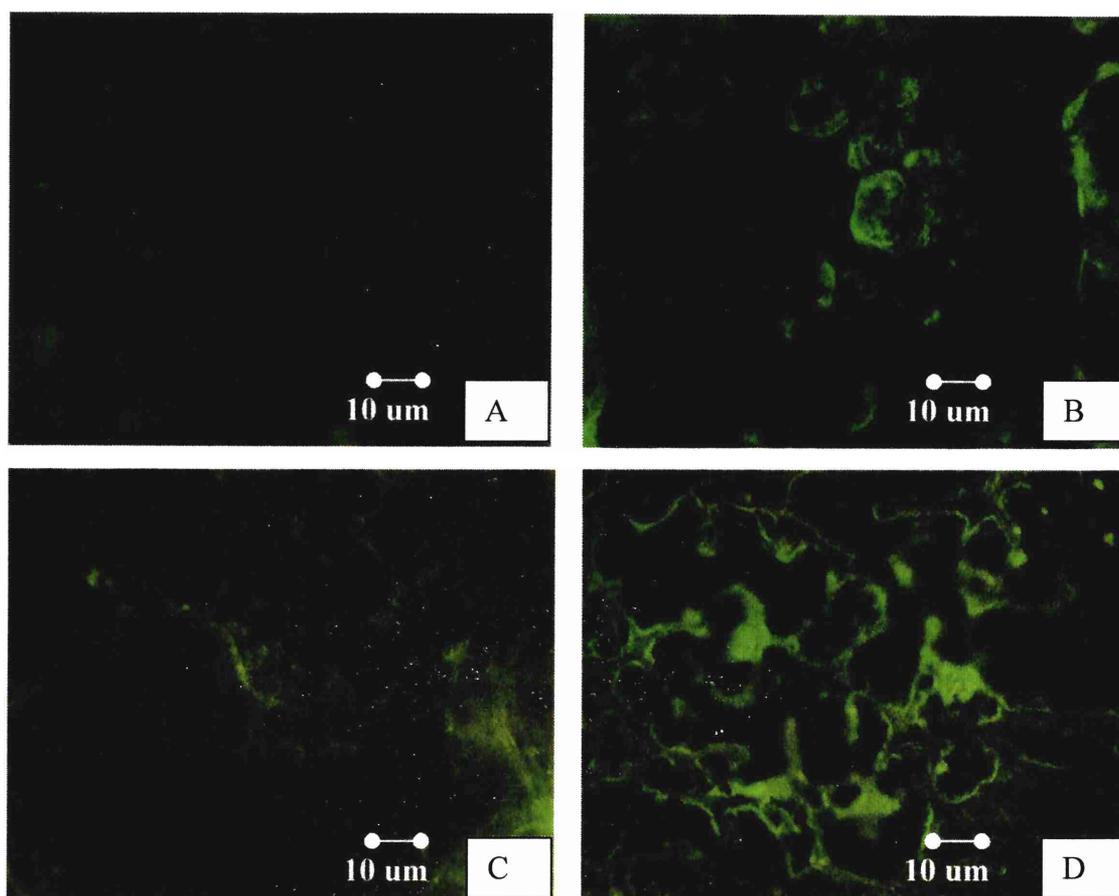


Figura 18: Teñido de células Caco2 con Anexina V-FITC. Las células incubadas por 1hs con BHIG (A), sobrenadante filtrado de la cepa T2 (B), M2 (C) y 273 (D) Experimento representativo de 3 ensayos independientes. ●—●: 10 µm

En control tratado con BHIG (Figura 18 A) muestra la mayoría de las células sin tinción fluorescente. En cambio las células tratadas con los sobrenadantes provenientes de las distintas cepas: T2 (Figura 18 B), M2 (Figura 18 C) y 273 (Figura 18 D) están en su mayoría teñidas de verde.

Esto podría indicar la inducción de eventos tempranos relacionados con vías de apoptosis, o eventos tardíos relacionados con ambas vías, necrosis y apoptosis, ya que la Anexina V también se une a la región interna de la membrana en las etapas tardías de la necrosis. Como este método no es suficiente para definir el proceso seguido por la célula, se teñieron las células tratadas con yoduro de propidio.

Estos ensayos demostraron que el sobrenadante de todas las cepas produce necrosis (Figura 19). El control no presenta los núcleos teñidos de naranja (Figura 18 A). En cambio las 3 cepas que se muestran poseen su membrana dañada lo que permitió el ingreso del yoduro de propidio: cepa T2 (Figura 19 B), cepa M2 (Figura 19 C) y cepa B10502 (Figura 19 D).

Al tratar las células con diferentes dosis de los sobrenadantes, pudo observarse que el efecto es dependiente de la cepa (Figura 20). Se muestran ejemplos del comportamiento que presentaron las cepas: respuesta lineal (cepas T2 y 273); y respuesta con rango de concentraciones de proteínas en el que no se evidencia necrosis (cepa M2, 253 y 114).

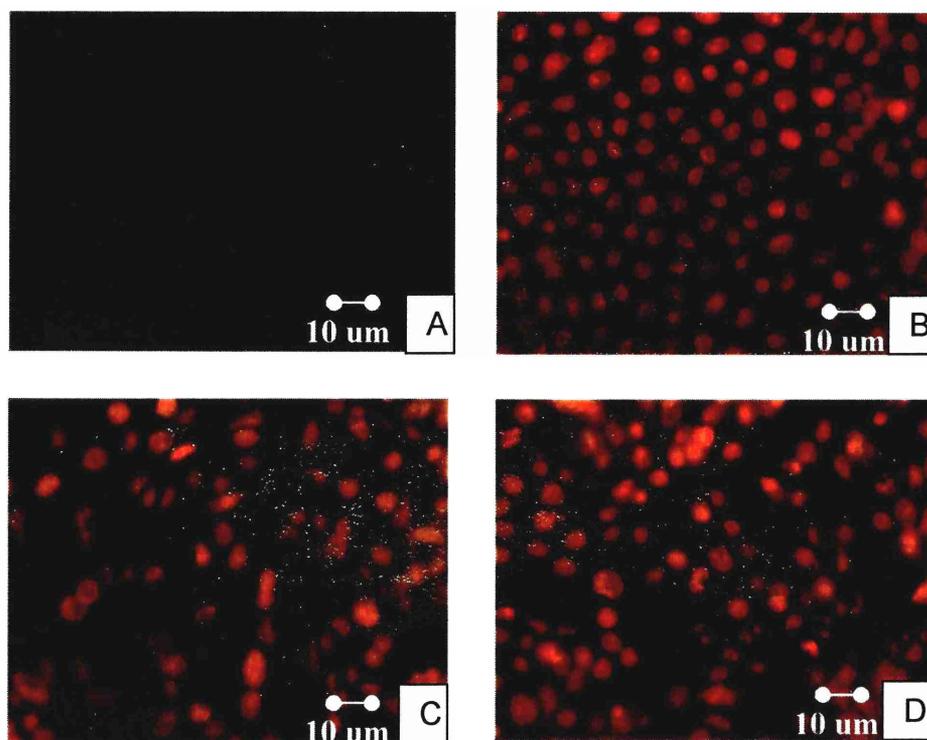


Figura 19: Células Caco-2 teñidas con ioduro de propidio luego de ser tratadas con los sobrenadantes de cultivos en BHIG de las cepas T2 (B), M2 (C) y B 10502 (D). El control (A) se trató con BHIG. Experimento representativo de 3 ensayos independientes. ●—●: 10 μm

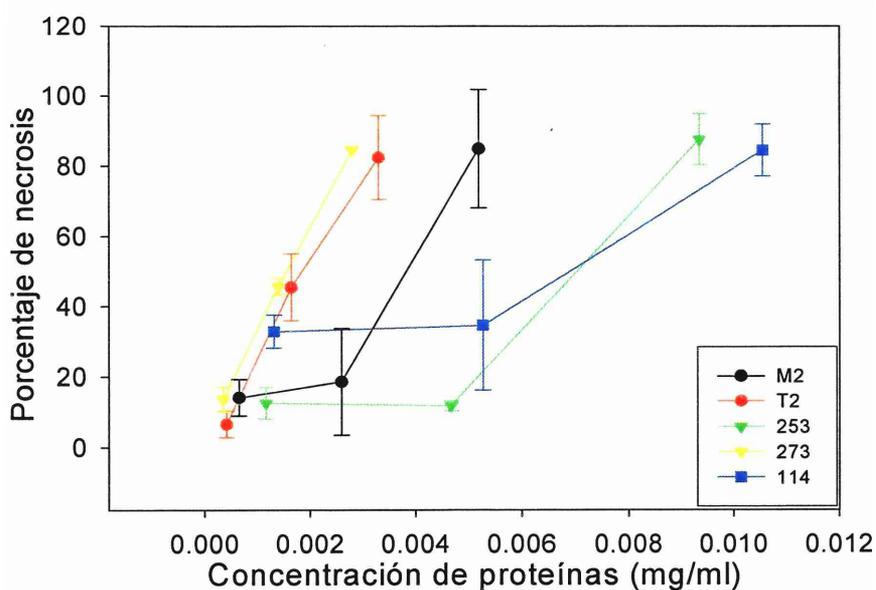


Figura 20: Relación entre la concentración de proteína agregada con el sobrenadante y el porcentaje de necrosis, luego de 1 hs de tratamiento, de las células Caco-2 para cepas de *Bacillus cereus* cultivadas en medio BHIG a 32°C durante 16 hs. Las barras indican desviación standard. Experimento representativo de 2 ensayos independientes

IV. DISCUSIÓN

V. 1. ESTUDIO DE LOS FACTORES EXTRACELULARES DE *Bacillus cereus*

Las bacterias patógenas pueden producir efectos sobre las células eucarióticas, tanto en su anatomía como función, por liberación de factores extracelulares y/o por interacción directa.

Hay microorganismos de alta relevancia, en el campo de la salud humana y la seguridad alimentaria, por las toxinas que producen. Algunos ejemplos son *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y *Vibrio cholerae*.

B. cereus secreta una amplia variedad de toxinas y enzimas que podrían provocar daño a las células eucarióticas. Estas constituyen una gran proporción de las proteínas secretadas por este microorganismo, y entre ellas se encuentran proteasas, fosfolipasa C, hemolisinas y otros factores extracelulares.

Algunos de los factores de *B. cereus* implicados en episodios de síndrome diarreico son la hemolisina BL (HBL), la enterotoxina no hemolítica (NHE) y la citotoxina K (CytK) (Beecher and Macmillan, 1991; Lund and Granum, 1997; Lund et al., 2000).

HBL y NHE son complejos proteicos de 3 componentes (Beecher and Macmillan, 1991; Lund and Granum, 1997). El complejo HBL está formado por las proteínas B, L1 y L2 (Beecher et al., 1995) y el complejo NHE está formado por las proteínas NheA, NheB y NheC (Schoeni and Wong, 2005).

HBL produce un poro en la membrana de los glóbulos rojos, lo que determina la lisis del eritrocito. El poro lo forman los 3 componentes, luego de unirse cada uno en forma independiente (Beecher and Wong, 1997).

Recientemente se ha determinado que el complejo NHE es hemolítico y que el efecto lítico sería también por la

formación de poros en la membrana lipídica (Fagerlund et al., 2008). La denominación de “no hemolítico” le fue otorgada en su momento por la baja capacidad de hemólisis que tiene si se lo compara con el complejo HBL (Stenfors Arnesen et al., 2008).

La citotoxina K es una toxina proteica que, además de formar poros en bicapas lipídicas, es citotóxica para las células Vero y Caco-2. Pertenece al grupo de las toxinas formadoras de poro con plegamiento barril β cuyos exponentes más conocidos son la toxina α de *S. aureus* y la toxina C de *C. perfringens* (Hardy et al., 2001). Estos investigadores proponen que la actividad citotóxica de cytK sobre Caco-2 se debe a su habilidad de formar poros; esta capacidad, que la distinguiría de la toxina C de *C. perfringens* (con la que está estrechamente relacionada) podría ser explicada por las diferencias entre la secuencia de aminoácidos entre ambas toxinas (Hardy et al., 2001).

Los tres factores descriptos (NHE, HBL y CytK) se hallan bajo el control de PlcR, un regulador pleiotrópico, dependiente de un sistema de quórum-sensing (Oshtad et al., 1999; Slamti and Lereclus, 2005; Stenfors Arnesen et al., 2008).

Otros factores citotóxicos de *B. cereus*, serían producidos independientemente del control de PlcR (Moyer, et al. 2008). Un ejemplo estaría dado por el factor HlyII (perteneciente al grupo de las toxinas formadoras de poro barril β) que se encontraría regulado por FUR (del inglés: Ferric Uptake Regulator), y por un regulador transcripcional, HlyIIR (Budarina et al., 2004; Stenfors Arnesen et al., 2008). Las proteasas serían otros de los

factores independientes de PlcR (Callegan et al., 2003).

Existen reactivos comerciales para la determinación de algunos factores extracelulares de *B. cereus* que reaccionan con diferentes moléculas. El test de Oxoid detecta el componente L₂ del complejo HBL que muestra alta actividad en ensayos de permeabilidad vascular; y el test de TECRA detecta el componente NHEA del complejo NHE (Beecher and Wong, 1994^b).

El factor termoestable de *B. cereus* es la toxina emética que se denomina cereulide (Agata et al., 1994). Produce vacuolización de las células Int 407, Hep-2, Vero y MA-104, y redondeo en las dos primeras líneas (Szabo et al., 1991). La dosis efectiva de toxina emética es diferente para cada línea celular, así como el tiempo de respuesta (Szabo et al., 1991). Esta toxina no es hemolítica (Mikami et al., 1994). Dado su bajo peso molecular y baja antigenicidad, los ensayos para detectarla pueden resultar laboriosos y complicados. Se ha desarrollado un método colorímetro que resulta fácil de realizar, y que utiliza el bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2,1) 2,5-difeniltetrazolio (MTT) sal soluble en agua, amarilla, que se convierte a formazan, insoluble, de color púrpura, por metabolización celular (Finlay et al., 1999).

Cereulide actúa como un ionóforo de cationes y en particular de K⁺, por lo que es capaz de inhibir la actividad mitocondrial (Teplova et al., 2006; Virtanen et al., 2008). Hasta el momento cereulide es el único ionóforo de potasio encontrado en *B. cereus* (Virtanen et al., 2008).

La esfingomielinasa sería otro factor termoestable que además posee actividad hemolítica (Granum, 1994)

En los ensayos que se presentan en este trabajo de tesis, se ha demostrado que cuando se tratan las monocapas de Caco-2 con los sobrenadantes de *B.*

cereus, se afecta profundamente la morfología celular con el consiguiente desprendimiento de la monocapa (Figura 9). Este efecto no lo producen los sobrenadantes filtrados de cepas no patógenas como *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.*, por lo tanto, si bien esto no descarta la posibilidad de que estén actuando factores no específicos, se podría asegurar que no es un mecanismo general de daño que produciría cualquier sobrenadante bacteriano.

La acción citopática se mantuvo parcialmente en presencia de suero fetal bovino. Este resultado nos permitiría descartar a las proteasas como únicas responsables del daño, ya que las proteínas presentes en el suero inactivarían su acción. De la misma manera podríamos suponer que la acción de cereolisina O no explicaría el total del efecto observado. Esta toxina es una citolisina activada por tiol, perteneciente al grupo de las toxinas formadoras de grandes poros, que se une al colesterol de las membranas (Rappuoli and Pizza, 2000); en este caso se uniría al colesterol del suero, lo que impediría su unión al colesterol presente en la membrana de los enterocitos.

En experimentos de dosis-respuesta, las cepas mostraron 3 modelos de desprendimiento (Figura 10). Las cepas que no desprenden forman un grupo (NDp), y las cepas que desprenden los hacen de dos modos diferentes: DA (desprendimiento alto) y DB (desprendimiento bajo). Esto podría tener relación con la composición los factores extracelulares y su concentración, inherente a cada cepa y con un efecto de sinergismo y cooperativismo. En *B. cereus*, el nivel de virulencia observado en diferentes cepas es muy variable (Stenfors Arnesen et al., 2008) y los factores complejos, como HBL necesitan una relación determinada entre sus

componentes para producir su efecto máximo (Beecher and Wong, 1994^a). Justamente este efecto concertado, es lo que explica la hemólisis discontinúa en agar sangre que produce este factor (Beecher and Wong, 1994^a).

Otros factores extracelulares proteicos de *B. cereus* como HlyII a determinadas concentraciones muestran un periodo de latencia antes de producir hemólisis en glóbulos rojos de origen humano (Andreeva et al., 2007). Esto tendría relación con el mecanismo de formación del poro, específicamente con el paso de apertura del poro. La oligomerización es un proceso cooperativo, que a bajas dosis de proteína demandaría más tiempo (Andreeva et al., 2007).

En nuestros resultados, en las cepas de desprendimiento bajo (Figura 10 B) a dosis de sobrenadante bajas no hay efecto citotóxico, condición que se revierte a dosis mayores. La composición de los factores extracelulares de estas cepas podría estar dada por una mezcla de factores citotóxicos para células Caco-2 que podrían considerarse dentro de un modelo de respuesta sigmoideo. Esto puede explicarse si la unión de los primeros ligandos (o toxinas) cambia la conformación de los receptores de manera que aumenta la afinidad de los mismos por la toxina.

En las cepas de desprendimiento alto, los sobrenadantes responderían a un modelo de respuesta tipo asintótico. A baja concentraciones del sobrenadante, el desprendimiento es proporcional a la cantidad de factores extracelulares agregada y luego, a concentraciones más altas, el efecto es independiente de la concentración del sobrenadante por saturación de receptores. En las cepas estudiadas la relación es proporcional hasta que se alcanza el efecto máximo, o sea 100% de desprendimiento celular, por lo que el agregado posterior de factores

extracelulares redundaría en un aplanamiento de la curva.

En este trabajo también mostramos el daño que sufre la superficie del enterocito, con pérdida de las microvellosidades (Figura 12). Este efecto pudo ser observado a tiempos cortos (20 minutos) y podría ser un estadio previo al desprendimiento, que según nuestros resultados se produce luego de 1 hora de incubación con los factores extracelulares. Estos hallazgos correlacionan con la disminución de la actividad deshidrogenasa mitocondrial (Figura 16).

Los factores extracelulares de *B. cereus* fueron capaces de desorganizar el citoesqueleto de las células Caco-2 (Figura 13, 14 y 15). Una posible hipótesis sería que este efecto se deba a la actividad de la fosfolipasa C que desorganiza las membranas de las células eucarióticas por hidrólisis de fosfolípidos, llegando inclusive a alterar la unión entre las células (Henderson et al., 1999^f).

La suposición de que las fosfolipasas estén implicadas en el daño observado estaría avalada por los resultados que se encontraron cuando se caracterizaron las cepas, ya que todas tuvieron actividad lecitinasasa (Apéndice I, Tabla 16). Esta actividad enzimática está relacionada con la presencia de fosfolipasa C en *B. cereus* (Kim, 2008; Callegan, 1999).

El desprendimiento celular y el daño al citoesqueleto se relacionan mediante una compleja red de señalización intracelular, que involucra integrinas. Estas son proteínas cuya función es unir la célula a la matriz extracelular (Henderson et al, 1999^b). Las integrinas agrupan proteínas de citoesqueleto para producir sitios de adhesión focal donde se localiza la actina. En este proceso intervienen las proteínas Rho (Henderson et al, 1999^c). Asimismo, las integrinas están involucradas en vías de señalización intracelular a través de la

kinasa de adhesión focal (FAK), que a su vez activará proteínas Raf y Ras (Henderson et al, 1999°).

Los sobrenadantes, al alterar la unión de las células, estarían afectando a las integrinas, y en consecuencia, alterando las vías de señalización implicadas en la polimerización y despolimerización del citoesqueleto.

Hay que considerar que, dada la cantidad de factores que coexisten en los sobrenadantes de cultivos de *B. cereus*, el efecto observado puede ser debido a la interacción de 2 o más toxinas. Por consiguiente, las dificultades para establecer los factores etiológicos responsables del síndrome diarreico producido por *B. cereus*, pueden ser un reflejo del carácter multifactorial del efecto biológico, donde varios factores contribuyen al daño celular observado (Stenfors Arnesen et al., 2008).

Otra hipótesis que puede proponerse para explicar los resultados encontrados, es la posibilidad que estén involucradas toxinas formadoras de poro.

Se sabe que, ciertos factores, como HBL, NHE, CytK y HlyII son capaces de formar poros en las membranas de células eucarióticas (Beecher and Wong, 1997; Fagerlund et al., 2008; Hardy et al., 2001; Andreeva et al., 2007). Además ya se ha demostrado la citotoxicidad de CytK y NHE en células Caco-2 (Hardy et al., 2001; Fagerlund et al., 2008). Otro factor que podría estar involucrado es la cereolisina O, una toxina formadora de grandes poros (Rappuoli and Pizza, 2000).

La formación de grandes poros en la membrana de la célula eucariótica permite la salida de solutos y macromoléculas que llevan a la muerte celular (Rappuoli and Pizza, 2000). Esto podría relacionarse con la necrosis de las células Caco-2 luego del tratamiento durante 1 hora con los sobrenadantes de las cepas de *B. cereus* (Figura 18).

Dado los resultados que descartan la apoptosis como posible vía de muerte celular, podría ser que la unión de la anexina con fosfatidilserina (PS), que permite observar la fluorescencia verde (Figura 17), ocurra en la cara interna de la membrana plasmática y no por una translocación de la PS. Esto sería debido a un aumento de la permeabilidad de la membrana.

Todas las cepas utilizadas en esta tesis son hemolíticas, pero cuando se incubaron los eritrocitos con los sobrenadantes de las cepas estudiadas en presencia de diferentes protectores osmóticos, no se encontró un efecto inhibitorio. Este resultado podría indicar que estamos ante la presencia de factores formadores de poro mayores que 4,5 nm (radio correspondiente al dextrano).

Para el complejo NHE se halla descrito que la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) de las células Vero se previene con polietilenglicol (PEG) 8000 (radio aproximado de 4 nm) (Fagerlund et al., 2008). Otros factores, entre los que se encuentra la cereolisina O de *B. cereus*, pueden llegar a formar canales de hasta 35 nm de diámetro (o sea un radio aproximado de 17 nm) (Rappuoli and Pizza, 2000).

Si consideramos el carácter multifactorial de los efectos biológicos de las cepas estudiadas, es posible que existan en paralelo varios mecanismos de acción. Por lo tanto, también sería posible que la anulación de uno de ellos (como sería la formación de poros en la membrana de los glóbulos rojos), no fuera suficiente para anular el efecto (hemólisis en este caso en particular).

Según la bibliografía, en la endoftalmitis producida por *B. cereus* se ha demostrado que el complejo HBL contribuye a la virulencia pero no es el único responsable (Beecher et al., 1995) y que las cepas mutantes respecto a un solo factor (HBL, PC-PLC o PI-PLC) producen un grado de destrucción

similar en la retina que las cepas salvajes (Callegan et al., 2008). Otros investigadores, utilizando toxinas purificadas, han observado protección osmótica (Zitzer et al., 1995; Beecher and Wong, 1997; Andreeva et al., 2007).

Podría ser posible, además, que dada la complejidad que presentan los factores extracelulares en *B. cereus*, la utilización de una única línea celular o un solo método de evaluación de daño no permita observar todos los efectos biológicos que esas cepas pueden producir. En el caso de la citotoxina CytK de *B. cereus*, Hardy y colaboradores en el año 2001, encontraron que las cantidades de proteína necesarias para inhibir el 50% de la síntesis de proteínas en las células Caco-2 eran cinco veces más bajas que para producir el mismo efecto en las células Vero (Hardy et al., 2001). Para el complejo HBL la hemólisis depende del origen de los glóbulos rojos, y PC-PLC (fosfatidilcolina fosfolipasa C) y esfingomielinasa no lisan glóbulos rojos de origen humano y de cerdo, y sí lisan glóbulos rojos de cordero (Beecher and Wong, 2000).

En los experimentos realizados para el presente trabajo de tesis, cuando ensayamos sobrenadantes de la cepa T2, los mismos desprendieron la monocapa de las células Caco-2 (Figura 9). Estos resultados son coincidentes con los que obtuvieron otros investigadores, con la misma cepa, con las células CHO (Buchanan and Schultz, 1994).

Los factores extracelulares de esta misma cepa (T2) no afectaron la actividad deshidrogenasa mitocondrial (Figura 15) aunque se utilizaron las mismas células que para los ensayos de desprendimiento.

Esta cepa podría ser un ejemplo de la complejidad de las interacciones involucradas en la virulencia de *B. cereus*, los resultados obtenidos deben analizarse con mucho cuidado.

La línea celular Caco-2 constituye un modelo de células epiteliales de intestino humano ampliamente aceptado, que permite determinar interacciones huésped-patógeno típicas de tracto intestinal humano. Aún así, hay ciertas actividades que no se pueden detectar con estas células. En nuestro grupo de trabajo se estudió el efecto de sobrenadantes de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), encontrándose que éstos no afectaron la integridad de la monocapa de células Caco-2; en cambio sí produjeron efectos citopáticos sobre monocapas de células Hep-2 (A. Hugo, comunicación personal 2008).

Para las cepas estudiadas, luego de tratar los sobrenadantes 30 minutos a 100°C, la actividad biológica remanente de la cepa M2 haría suponer la presencia de factores resistentes al calor, como podría ser cereulide. También podría estar ocurriendo que el modelo utilizado no sea capaz de detectar la totalidad del efecto de todos los componentes de los sobrenadantes.

Para aquellas cepas donde la actividad biológica de los sobrenadantes fue eliminada por completo por el tratamiento térmico, se han observado diferencias en la retención de cristal violeta en las células adheridas a la placa. Este efecto fue dependiente de la cepa. Esto podría ser el resultado de una alteración en la permeabilidad de las membranas provocada por los factores extracelulares pero que no es suficiente como para provocar el desprendimiento de la monocapa. Se puede relacionar con lo que ocurre con el sobrenadante de la cepa B10502 que no provoca desprendimiento de la monocapa de las células Caco-2 (Figura 9) en las condiciones ensayadas, pero permite el ingreso del yoduro de propidio en las mismas células (Figura 18), lo que indicaría una alteración en la membrana.

Hasta aquí hemos considerado ciertos factores de *B. cereus* que, según la bibliografía, integrarían el grupo de toxinas formadoras de poros.

Otro tipo de toxinas son las toxinas binarias (toxinas tipo AB). Muchas bacterias Gram (+), formadoras de esporos, producen toxinas de este tipo (Barth, 2004). El componente B se une a la superficie de la célula blanco y actúa como plataforma para el ingreso al citosol del componente A que tiene actividad enzimática. Posteriormente, se produce la interferencia de las funciones normales de la célula (Barth, 2004). Dentro de las toxinas que actúan de esta manera se encuentra la toxina diftérica, la exotoxina A de *P. aeruginosa*, la toxina Shiga y dentro del grupo *B. cereus sensu lato*, la toxina de *B. anthracis* (Gordon and Leppla, 1994).

La toxina producida por *B. anthracis* es de tipo A₂B y está formada por un ligando de superficie llamado antígeno protector (PA), y dos subunidades enzimáticas: factor letal (LF) y factor de edema (EF), que son responsables de la modificación enzimática de sustratos en el citosol (Shannon, 2003). El LF posee actividad enzimática sobre MAPKK, específicamente MEK1 (Kurzchalia, 2003).

Algunos autores postulan que el factor NHE podría comportarse como una toxina tipo AB (Lund and Granum, 1997; Stenfors Arnesen et al., 2008).

Si bien la expresión de los tres componentes del complejo NHE no fue estudiada en este trabajo de tesis, todas las cepas fueron positivas para el componente NHEA (Test de TECRA), aunque con distinto nivel. La presencia de este factor en todas las cepas sería un resultado esperado, ya que se postula que el complejo NHE es el factor tóxico mecanismo se postula para la estreptolisina O de *Streptococcus pyogenes* (Madden et al., 2001).

dominante en *B. cereus* (Fagerlund et al., 2008; Ramarao and Lereclus, 2006). En cuanto al carácter cepa-dependiente de los niveles de NHEA, otros investigadores han encontrado que el grado de citotoxicidad del complejo NHE varía entre las cepas, y esta variación se debería a pequeñas diferencias estructurales entre las proteínas (Lund and Granum, 1997). Esta característica también estaría de acuerdo con la variación del nivel de virulencia entre las cepas (Stenfors Arnesen et al., 2008).

Resumiendo las hipótesis postuladas hasta el momento, los efectos citotóxicos producidos por los sobrenadantes de las cepas de *B. cereus* son compatibles con la acción concomitante de varios factores en paralelo, que involucrarían factores con actividad enzimática, toxinas formadoras de poro y eventualmente, toxinas tipo AB como el complejo NHE. Es evidente que estos factores podrían coexistir con otros aún no conocidos.

La desorganización que provocan en la membrana del hospedador las toxinas formadoras de poros, aumenta la permeabilidad de tal manera, que la última consecuencia es la muerte de la célula. Las consecuencias primarias de este aumento en la permeabilidad son la liberación de citoquinas, activación de proteasas intracelulares y a veces, inducción de apoptosis (Rappuoli and Pizza, 2000).

Este tipo de toxinas sólo actúa sobre la superficie de la célula; pero así como facilitan la salida de solutos del hospedador podrían mediar el ingreso de otros factores extracelulares que, actuando sobre receptores intracelulares, desencadenen vías de señalización intracelular. Este

Las toxinas bacterianas actúan en todos los niveles de la transducción de señales. Por ejemplo, alteran la conformación de proteínas unidas a

GTP, inducen la producción de moléculas tales como AMPc, IP₃ y DAG y afectan vías de señalización intracelular, ya sea por modificar pequeñas proteínas unidas a GTP como Rho, Rac, Cdc42 o por modificar kinasas, como MAPKK1 (Rappuoli and Pizza, 2000).

Son necesarios estudios posteriores para determinar cuál o cuáles son las vías de señalización activadas por el complejo sistema que constituyen los sobrenadantes de las cepas de *B. cereus*.

En el contexto de las infecciones intestinales, las investigaciones sobre este microorganismo son importantes ya que puede producir las enterotoxinas en el intestino, luego de que el hospedador ingiere las bacterias en estado vegetativo o esporos con los alimentos.

Los microorganismos desarrollan mecanismos para lograr instalarse en los distintos nichos

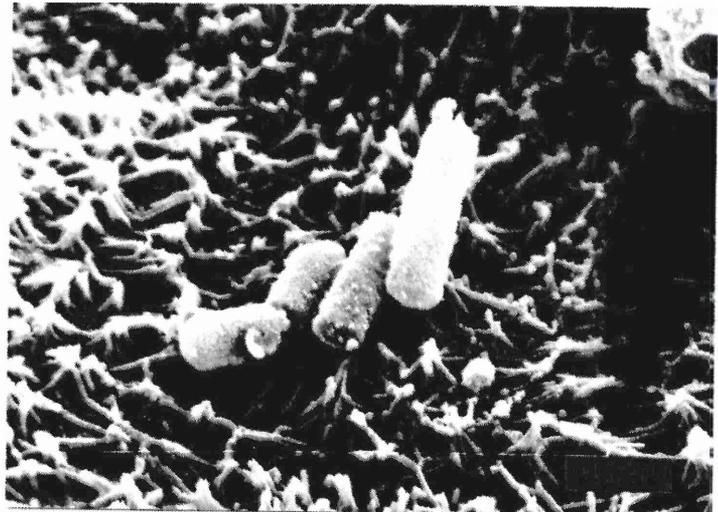
específicos (Finlay and Falkow, 1997), aunque no se hallan definidos el origen y naturaleza de la presión selectiva que ha permitido a los microorganismos refinar sus estrategias de interacción con el hospedador (Williams and Clarke, 1998).

En este marco, los resultados de la presente sección, muestran que los factores extracelulares de *B. cereus* son capaces de producir profundos cambios en los enterocitos humanos en cultivo. Se evidencian diferencias entre la actividad biológica de distintas cepas las cuales hacen suponer que la virulencia de las mismas depende de la naturaleza y del balance de los factores producidos.

Con el objeto de completar el panorama, en la siguiente sección se abordará el estudio de la interacción directa entre las bacterias y los enterocitos.



2. ESTUDIO DE INFECCIÓN DE CELULAS EPITELIALES EN CULTIVO POR *Bacillus cereus*



IV. RESULTADOS

IV. 2. ESTUDIO DE INFECCIÓN DE CELULAS EPITELIALES EN CULTIVO
POR *Bacillus cereus*IV. 2. A. ASOCIACION DE *Bacillus cereus* A CELULAS DE EPITELIO
INTESTINAL HUMANO EM CULTIVOIV. 2. A. 1. PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA PARA DETERMINAR
ASOCIACION

➤ Determinación de la dosis bacteriana

Para estudiar la interacción bacteria-célula eucariótica se usó medio DMEM ya que es un medio óptimo para los enterocitos.

Con el objeto de controlar la cantidad de microorganismos inoculados se determinó la relación entre absorbancia y número de microorganismos realizando las curvas de calibración entre $A_{600\text{ nm}}$ y ufc/ml durante la fase exponencial de crecimiento. Como ejemplo se muestra la cepa 2 (Figura 21).

Suspensiones de microorganismos cosechados en fase estacionaria (16 hs de cultivo) se incubaron con las células durante 3 hs a 37°C en 5% de CO₂. Luego de este tiempo se observaba un viraje del indicador del medio DMEM al color amarillo y desprendimiento de la monocapa (Figura 22).

Tanto para la cepa 2 como para la cepa M2 se observa un alto porcentaje de desprendimiento de la monocapa con las suspensiones con $A_{600\text{ nm}}=1$ como para una dilución ½ de la misma suspensión (Figura 22). Para diluciones sucesivas el desprendimiento disminuye y a partir de la $A_{600\text{ nm}}=0.125$ la monocapa permanece prácticamente intacta para ambas cepas (Figura 25). Puede observarse un valor negativo de desprendimiento para la cepa 2 para $A_{600\text{ nm}}=0.06$; esto puede deberse a que las células infectadas, por alguna causa, tienen una permeabilidad distinta al cristal violeta que las células control, lo que provoca que algunas fosas presenten un color mayor que otras y por lo tanto un valor más alto de absorbancia que el control. Como se dijo se observaban signos de actividad evidenciados por acidificación del medio DMEM.

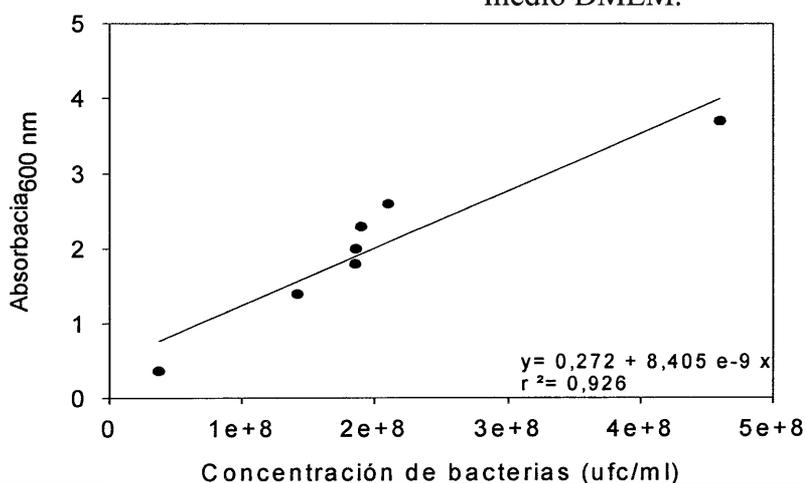


Figura 21: Relación entre los valores de $A_{600\text{ nm}}$ y ufc/ml para cultivos en fase exponencial de la cepa 2 crecidos a 32°C con agitación.

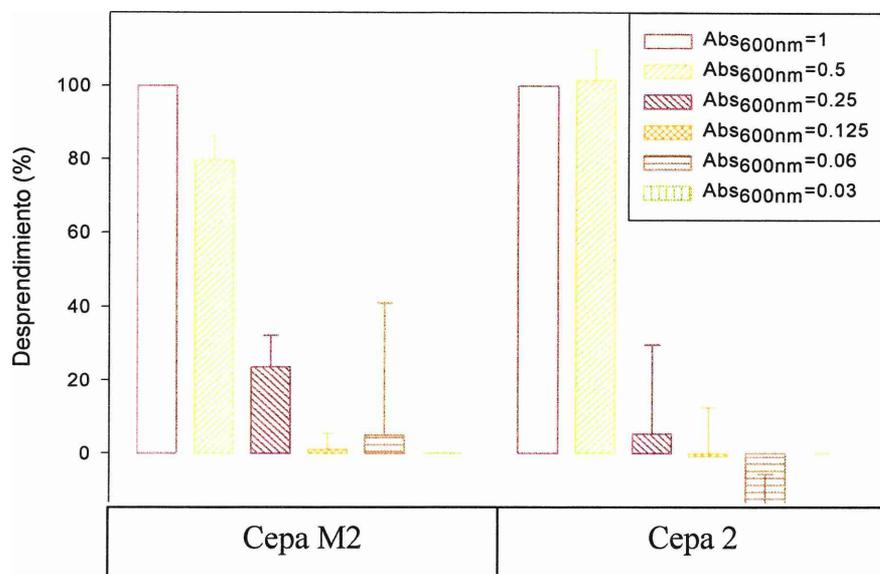


Figura 22: Desprendimiento de células Caco-2 coincubadas en medio DMEM sin antibiótico 3 hs a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ con suspensiones de las cepas 2 y M2 de *Bacillus cereus* provenientes de cultivos de 16 hs. Una A_{600 nm}= 1 equivale a 1 x 10⁸ ufc/ml. Las referencias indican las distintas concentraciones de microorganismos (A_{600 nm}). Las barras indican la desviación standard. Ensayo representativo de 3 experimentos independientes.

➤ Determinación de la CIM de cloranfenicol en medio DMEM para cepas de *Bacillus cereus*

Para subsanar el inconveniente que podía producir el desprendimiento de la monocapa durante los ensayos de infección, se decidió usar un antibiótico.

El antimicrobiano (y la dosis elegida del mismo) debía evitar la proliferación microbiana pero aún permitir cierta actividad metabólica de las bacterias para que pudieran llevar a cabo la interacción con las células eucarióticas.

Para ello se eligió el cloranfenicol, un antibiótico que ejerce su acción por inhibir la síntesis de proteínas en las bacterias, por unión reversible a la subunidad ribosómica 50 S. Es

principalmente bacteriostático, aunque puede ser bactericida con algunas especies microbianas. Dado su mecanismo de acción, también puede inhibir la síntesis proteica en mitocondrias de células eucarióticas.

Para elegir la dosis de antibiótico que se utilizaría en los ensayos de infección, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM*) de cloranfenicol en medio DMEM para cada una de las cepas a ensayar provenientes de cultivos en fase estacionaria temprana (Tabla 5).

*: Es importante aclarar que la determinación de esta CIM se efectuó con un protocolo experimental *ad hoc* teniendo en mente el sistema en estudio. Los valores obtenidos no se corresponden con datos de susceptibilidad desde el punto de vista terapéutico.

Estos valores se obtuvieron a partir del cambio de color del indicador del medio DMEM luego de la incubación durante 3 hs a 37°C en 5% de CO₂. En este punto cabe destacar que el cambio de color del indicador no fue tan intenso como el observado en presencia de las células Caco-2. El efecto bacteriostático se comprobó para cada una de las cepas para todas las diluciones, ya que no hubo cambios en el número de microorganismos viables luego del recuento de las fosas con antibiótico respecto del control sin antibiótico.

A partir de los datos obtenidos se eligió trabajar con una dosis de 100µg/ml de cloranfenicol en DMEM porque era una dilución por encima del máximo valor obtenido para la CIM (y evitar una falta de efecto del antibiótico si en algún ensayo la concentración bacteriana era levemente mayor para la cepa 114). Estos resultados están de acuerdo a los datos que se encuentran en bibliografía para inhibir la síntesis de proteínas en *B. cereus* (Periago et al., 2002).

Cepas	CIM (ug/ml)
M2	< 6.25
2	25
3	12.5
T2	12.5
253	12.5
273	12.5
113	25
114	50
ATCC 10876	< 6.25
ATCC 13061	6.25
E2	25
T1	25

Tabla 5: Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cloranfenicol para las cepas de *B. cereus* (provenientes de cultivos de 16 hs) en medio DMEM con una dosis inicial de 1×10^8 ufc/ml, incubado 3 hs en atmósfera de 5% de CO₂ a 37° C . El valor de la CIM corresponde a la mínima concentración de antibiótico para la cual no hubo cambio de color del indicador.se determinó por cambio de color del indicador del medio.

IV. 2. A. 2. CUANTIFICACION DE LA ASOCIACION

B. cereus es considerado tradicionalmente un microorganismo no invasivo. Sin embargo, dado que uno de los objetivos del presente trabajo, fue determinar si algunas cepas podían llegar a internalizar en enterocitos, empleamos el término asociación para abarcar tanto las bacterias que se adhieren a la superficie externa de los enterocitos como aquellas bacterias que logran internalizarse.

Teniendo en cuenta esta definición, se determinó la asociación de las cepas de *Bacillus cereus* a células Caco-2 en medio DMEM adicionado con 100 µg/ml de cloranfenicol, durante 3 hs a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. La infección se realizó con cultivos

bacterianos en fase exponencial o estacionaria, con un recuento inicial de 1×10^8 ufc/ml, lo que representó una multiplicidad de infección (MDI) de 100.

Las bacterias provenientes de cultivos de 16 hs (fase estacionaria) dieron valores de asociación entre 6.39 unidades log de ufc/ml para la cepa ATCC 10876 entre los más elevados, y 5.34 unidades log de ufc/ml para la cepa A7 como valor más bajo (Tabla 6).

Algunas cepas tuvieron un comportamiento muy diferente cuando se trataba de cultivos en fase exponencial (cultivos de 3 hs), ya que si bien los ensayos se realizaron en presencia de cloranfenicol, se observó

IV.2. Resultados

actividad biológica para ciertas cepas, como por ejemplo las cepas ATCC 10876, ATCC 13061, T1, Watertown, A7 y B 10502 que provocaron el desprendimiento de la monocapa (Tabla 6). Este resultado impidió la determinación de valores cuantitativos de asociación al cabo de 3 hs de infección, por lo que se redujo el tiempo de incubación a 2 hs. Bajo estas condiciones de incubación no se observó desprendimiento con ninguna de las cepas ensayadas. Las cepas que menores valores de asociación

mostraron fueron la ATCC 13061 y la cepa A7 con valores de 5.61 y 5.59 unidades log de ufc/ml. En el otro extremo se hallan las cepas 2 y ATCC 10876 con valores de 6.40 y 6.50 log de ufc/ml de adhesión (Tabla 6).

Tabla 6: Valores de asociación a células Caco-2 de suspensiones bacterianas provenientes de cultivos de 3 hs y 16 hs de las cepas de *Bacillus cereus* incubadas 2 hs ó 3 hs con las células epiteliales a 37°C en 5% de CO₂ en medio DMEM adicionado con 100 µg/ml de cloranfenicol. Las células se infectaron con 1 x 10⁸ ufc/ml lo que representa una MDI= 100

Cepa	Asociación a células Caco-2 (log ufc/ml ± sd)		
	Cultivos de 3 hs		Cultivo de 16 hs
	2 hs de infección	3 hs de infección	3 hs de infección
M2	6.23 ± 0.30	5.94 ± 0.01	5.73 ± 0.18
2	6.40 ± 0.01	6.45 ± 0.01	5.75 ± 0.75
3	5.93 ± 0.30	5.62 ± 1.00	5.76 ± 0.07
T2	5.77 ± 0.44	5.99 ± 0.07	5.91 ± 0.10
253	6.23 ± 0.28	6.16 ± 0.01	5.81 ± 0.12
273	5.71 ± 0.01	5.50 ± 0.56	5.28 ± 0.47
113	5.84 ± 0.03	5.66 ± 0.03	5.81 ± 0.07
114	6.37 ± 0.42	5.42 ± 1.44	6.13 ± 0.21
ATCC10876	6.50 ± 0.01	Despr. Celular	6.39 ± 0.18
ATCC13061	5.61 ± 0.18	Despr. Celular	5.51 ± 0.04
E2	5.81 ± 0.16	6.19 ± 0.17	5.97 ± 0.03
T1	6.34 ± 0.29	Despr. Celular	6.27 ± 0.02
Watertown	Nd	Despr. Celular	5.53 ± 0.08
A7	5.59 ± 0.29	Despr. Celular	5.34 ± 0.13
B10502	5.69 ± 0.30	Despr. Celular	nd

Despr. Celular = Desprendimiento de la monocapa de enterocitos.
sd = Desviación standard.

IV. 2. A. 3. ESTUDIOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

➤ Microscopia de barrido

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido permiten observar diferentes efectos sobre las células epiteliales y diferentes modelos de interacción eucariote-procariote.

Las células epiteliales Caco-2 sin infectar (solo incubadas con medio DMEM) muestran una superficie uniforme, con la morfología típica de células epiteliales intestinales, con un ribete en cepillo altamente ordenado, con el patrón descrito como “alfombra gruesa” (thick carpet pattern) (Pinto et al., 1983) (Figura 23 A).

Cuando las células se infectan con diferentes cepas de *B. cereus*, se observa un estrecho contacto entre las bacterias y el ribete en cepillo. Un ejemplo claro lo muestra la cepa M2 (Figura 23 B) donde se observa la monocapa con la morfología descrita como “tipo flor” (flower-like pattern) (Pinto et al., 1983) y sobre la superficie de los bacilos, se visualizan estructuras compatibles con la presencia de restos de enterocitos.

Si bien no hemos confirmado el origen de dichos restos, los mismos no se observan en las bacterias adheridas al vidrio (Figura 24), lo que podría indicar que los mismos son restos de las células eucarióticas o formaciones bacterianas desencadenadas por el contacto con los enterocitos.

Otro ejemplo de interacción lo muestra la cepa 2 (Figura 23 C) donde el ribete en cepillo parece haber disminuido su densidad donde se

encuentran las bacterias. Esta cepa también posee las estructuras superficiales descritas para la cepa M2.

En la imagen correspondiente a la cepa T1 (Figura 23 D) se observan diferentes fenómenos, debido a la interacción célula-bacteria y por efecto de la preparación de la muestra para su observación. Las grietas entre célula y célula se deberían a la deshidratación de la muestra por medio del método de punto crítico.

La interacción bacteria-enterocito provoca el mismo efecto que las cepas M2 y 2, ya que se encuentran estructuras sobre la superficie de los bacilos, de aspecto similar a los hallados sobre las otras cepas. Estas estructuras se hallan en gran cantidad también sobre la superficie celular, y en algunos casos envuelven a los bacilos. Gran parte de la superficie celular está desprovista de microvellosidades y cubierta de acúmulos de estructuras redondeadas, de origen desconocido. Podrían provenir de las células epiteliales o de las bacterias.

La cepa 273 (Figura 23 E) no da lugar a estructuras similares a las presentadas por las cepas anteriores sobre su superficie y la monocapa presenta la morfología descrita como “tipo flor”, en estrecho contacto con las bacterias.

La cepa 3 (Figura 23 F) también presenta, sobre la superficie de los bacilos, las estructuras ya descritas para las cepas M2, 2 y T1;

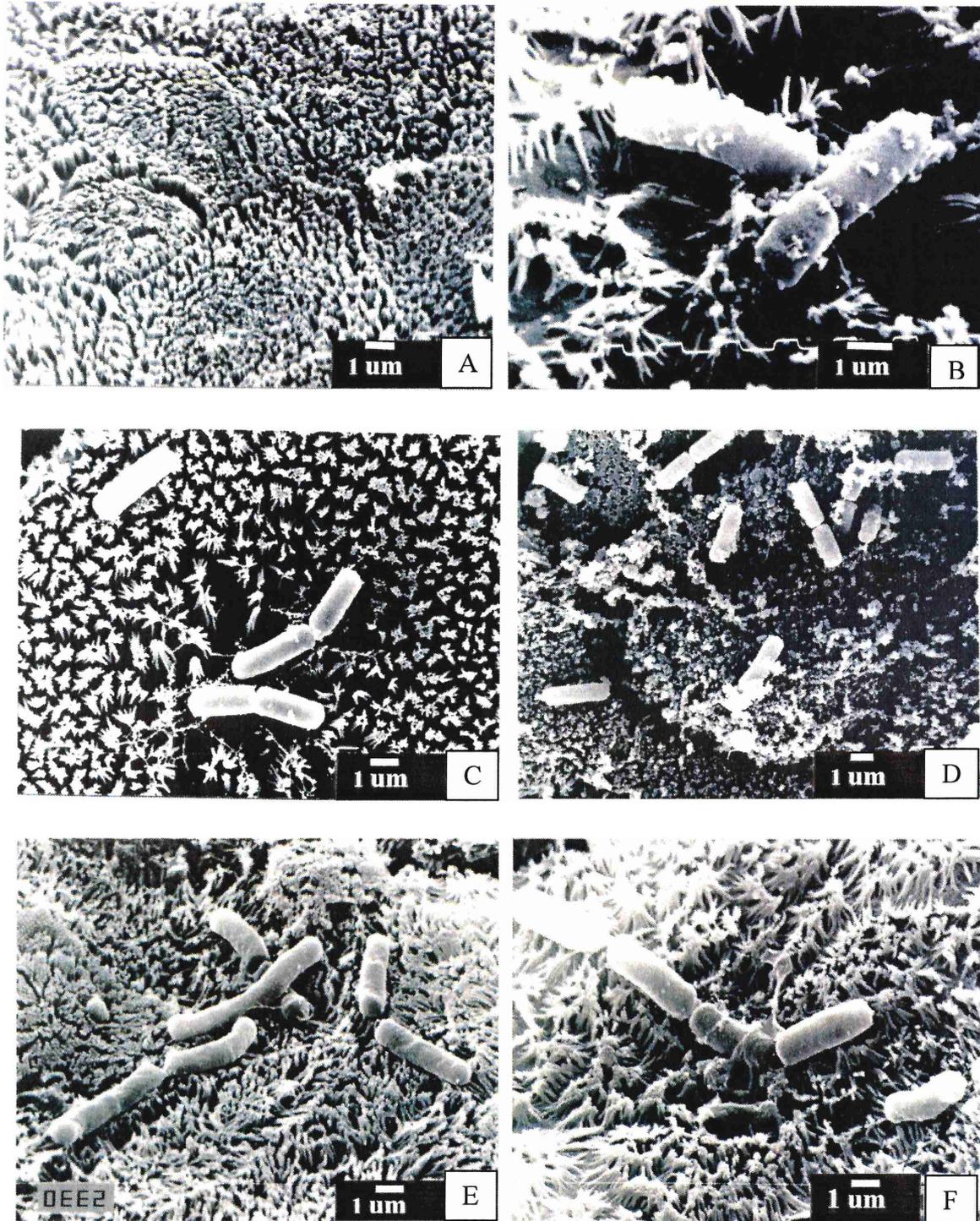


Figura 23: Microscopía electrónica de barrido de cepas de *Bacillus cereus* asociadas a células epiteliales en cultivo. Los ensayos se efectuaron con microorganismos provenientes de cultivos en fase exponencial incubándolos 2 hs con las células epiteliales con una dosis inicial de 1×10^8 ufc/ml: M2 (B), 2 (C), T1 (D), 273 (E) y 3 (F). El control (A) se incubó con medio DMEM. Las barras indican el tamaño.

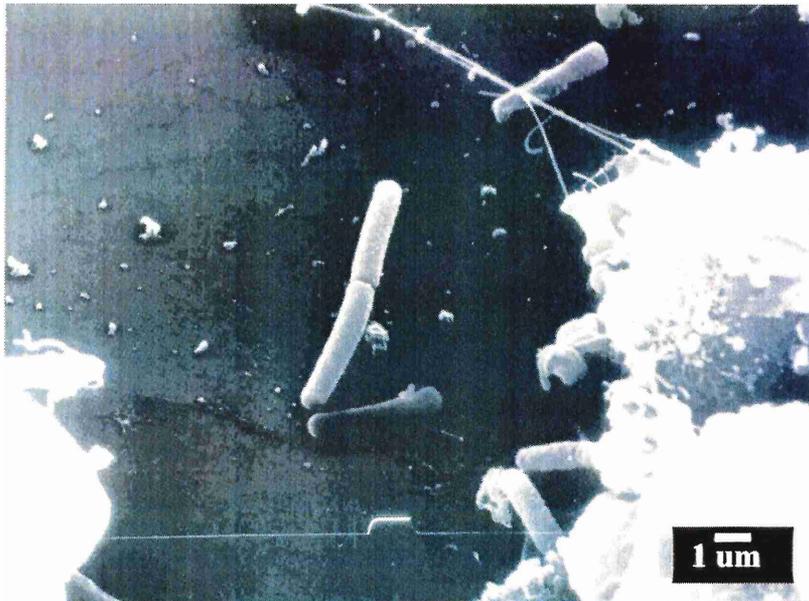


Figura 24: Microscopía electrónica de barrido *Bacillus cereus* en una región libre de células. Los ensayos se efectuaron con cultivos en fase exponencial incubándolos 2 hs con las células epiteliales a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. La barra indica el tamaño.

▪ MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN

El estudio de la asociación de cepas de *Bacillus cereus* a células Caco-2 mediante microscopía electrónica de transmisión se efectuó con microorganismos resuspendidos en medio DMEM con 100 µg/ml de cloranfenicol. Todas las muestras se incubaron durante 2hs a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂.

Para elegir las muestras a observar mediante microscopía de transmisión, primeramente se analizaron cortes (2µm) mediante microscopía óptica y coloración con azul de toluidina.

Como se puede evidenciar en las imágenes (Figura 25) en el control (Figura 25 A) se observa la monocapa

de células epiteliales sobre el soporte que se utilizó, una membrana de colágeno. Estas conservan las microvellosidades de la zona apical. En las otras dos imágenes se aprecia claramente, tanto a la cepa 2 (Figura 25 B) como a la cepa T1 (Figura 25 C) asociadas a la zona apical, ubicadas en distintas posiciones, en acúmulos o sueltas. Aparentemente el ribete en cepillo ha desaparecido.

En la cepa T1 puede observarse a los bacilos ubicados debajo de la monocapa epitelial, entre ésta y la membrana de colágeno (Figura 25 C).

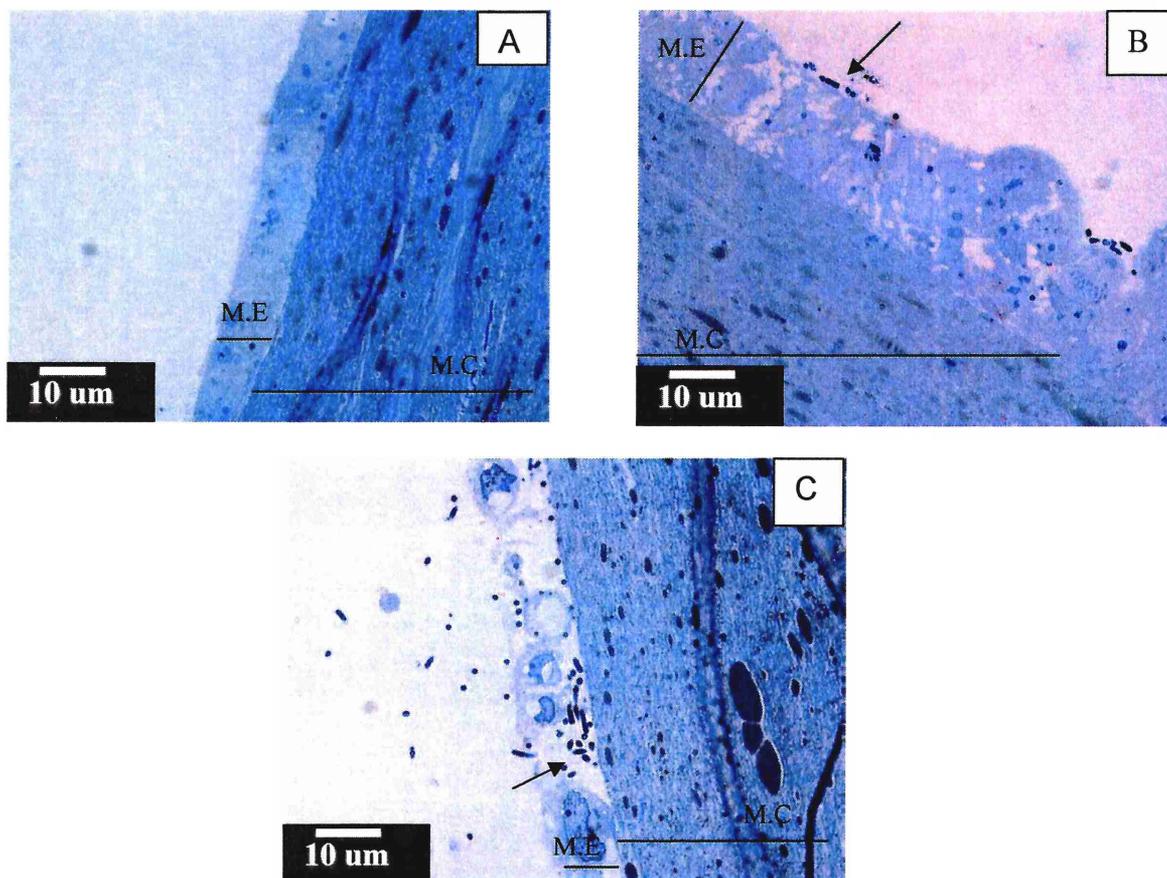


Figura 25: Observación mediante microscopía óptica de cortes (2 µm) coloreados con azul de toluidina para la microscopía de transmisión. Las cepas 2 (B) y T1 (C) fueron resuspendidas en medio DMEM con 100µg/ml de cloranfenicol e incubadas 2 hs a 37°C en 5% de CO₂ con las células Caco-2 que fueron crecidas sobre membrana de colágeno. El control (A) sin bacterias se incubó en las mismas condiciones. Las barras indican la monocapa epitelial (M.E.) y la membrana de colágeno (M.C.). Las flechas indican bacilos. La barra blanca indica tamaño.

La observación de las muestras mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 26) permitió establecer con más detalles la interacción de las cepas de *B. cereus* con las células epiteliales, Caco-2.

El control (Figura 26 A) muestra microvellosidades largas en la zona apical de las células. En cambio, las células infectadas con la cepa 2 (Figura 26 B, C y D) presentan microvellosidades más cortas y desorganizadas que están indicando un daño celular (indicado con una flecha

blanca en las imágenes). Estas microvellosidades pueden observarse de diferentes formas y tamaños sobre el dominio apical y en contacto con las bacterias. En algún caso el acortamiento es tal, que se ven restos celulares pequeños (Figura 26 B flecha blanca); éstos podrían corresponderse con lo observado mediante microscopía electrónica de barrido (Figura 23), donde se hallaban estructuras compatibles con la presencia de restos de enterocitos, tanto en relación con las bacterias como con las células. En otra

imagen (Figura 26 C flecha blanca) en la zona de mayor concentración bacteriana el ribete en cepillo a sufrido daños más drásticos que en las zonas donde los bacilos se hallan más alejados. Se observan estructuras de variadas formas y tamaños, desprendimientos celulares en contacto con las bacterias (Figura 26 D flecha negra). En todos los casos el acortamiento del ribete en cepillo colocaliza con las zonas donde hay microorganismos.

En las células infectadas hay una importante cantidad de vacuolas, lo que podría estar indicando estadios tempranos de necrosis (Figura 26 B y C flecha doble blanca).

La cepa estudiada presenta una estructura externa que podría ser la capa-S (Figura 26 D flecha doble negra), ya que posee similares características a la observada para la capa-S de otras bacterias (Garrote et al., 2004).

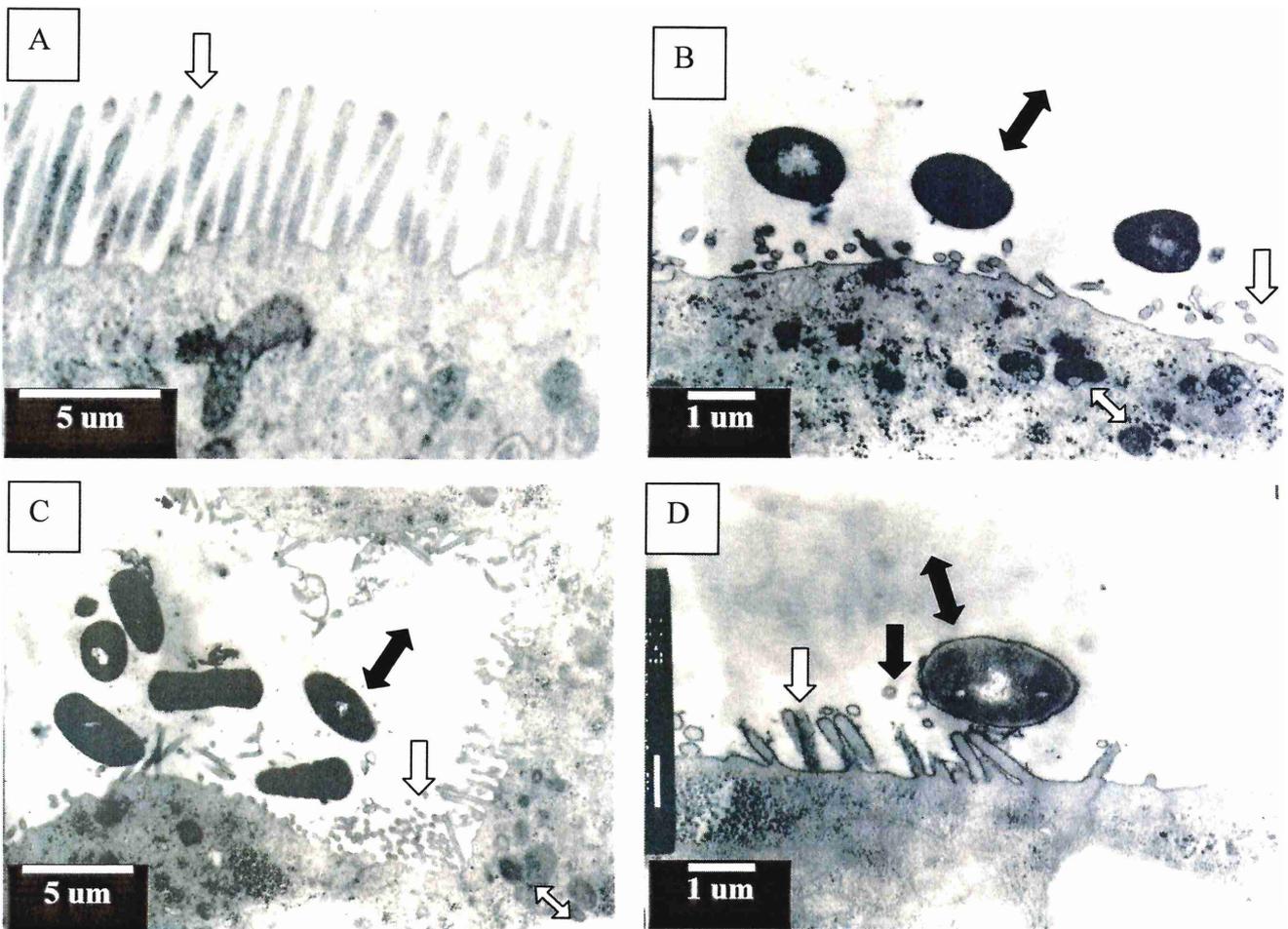


Figura 26: Microscopía Electrónica de Transmisión de células Caco-2 infectadas con *B. cereus* (cepa 2). Los microorganismos fueron resuspendidas en medio DMEM con 100µg/ml de cloranfenicol y las células Caco-2 fueron crecidas sobre una membrana de colágeno. La infección se realizó a 37°C en atmósfera 5% de CO₂ durante 2 hs. La figura (A) muestra el control sin infectar. Las figuras (B, C y D) corresponden a imágenes de monocapas infectadas con la cepa 2. Las flechas blancas y negras indican ribete en cepillo, las flechas dobles negras señalan bacterias y las flechas dobles blancas indican vacuolas. Las barras blancas indican tamaño.

IV. 2. B. INVASIÓN DE CÉLULAS CACO-2 POR CEPAS DE *Bacillus cereus*

IV. 2. B. 1. PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA PARA DETERMINAR INVASION

La determinación cuantitativa de las bacterias internalizadas en las células infectadas se puede realizar mediante el ensayo de protección con un antibiótico aminoglucósido (Guignot et al., 2001)

En el presente trabajo se usó gentamicina (100 ug/ml), ya que es bactericida pero no puede penetrar la membrana plasmática, por lo tanto luego de que ejerce su acción sobre las bacterias externas, permite recuperar los microorganismos que se hallan en el interior de las células.

Para que esta consideración respecto al uso del antibiótico sea válida, hay que trabajar con bacterias sensibles al mismo y verificar la efectividad de la dosis.

Teniendo en cuenta que *B. cereus* puede esporular y que el antibiótico no será efectivo contra esporos, tuvo que determinarse la proporción de esporos en distintas condiciones.

Por lo tanto, se validaron los experimentos teniendo en cuenta el tiempo de cultivo en el cual la cantidad de esporos fuera mínima y se ensayó el efecto bactericida de la gentamicina sobre una concentración bacteriana equivalente al número de bacterias asociadas (1×10^6 ufc/ml). Para determinar el efecto del tiempo de cultivo sobre la proporción de esporos se efectuó la cinética de esporulación de las cepas en caldo BHIG a 32°C con agitación. Para las cepas ensayadas se efectuó en paralelo la curva de crecimiento y la curva de esporulación, que se obtuvo luego de un tratamiento

de las suspensiones bacterianas a 60°C durante 30 minutos en cada punto.

Como puede observarse en la figura 27, las cepas estudiadas muestran un crecimiento exponencial hasta aproximadamente las 5 hs de cultivo. Durante ese período, la cantidad de esporos disminuye (cepas M2, 2 y ATCC 10876) o permanece constante (cepas T1 y B10502). Posteriormente se verifica un aumento en la proporción de esporos. Estos resultados indican que las menores proporciones de esporos se encuentran en los cultivos de 3hs (Figura 27).

Determinada la edad de los cultivos para la cual el número de esporos es mínimo, se efectuó el segundo punto de la validación, que era determinar la efectividad de 100 µg/ml de gentamicina frente a un cultivo de 1×10^6 ufc/ml.

Las 5 cepas estudiadas, luego del tratamiento con el antibiótico 1 hs a 37°C, disminuyeron su carga de viables alrededor de 3 órdenes logarítmicos con respecto a los valores iniciales (Tabla 7).

De esta manera si los valores de sobrevivientes que obteníamos en los ensayos de infección luego del tratamiento con gentamicina se sitúan por encima de los sobrevivientes al tratamiento térmico y a los sobrevivientes en el ensayo de validación del tratamiento con antibiótico (Tabla 7), podríamos decir que hay una población bacteriana en localizaciones intracelulares o paracelulares.

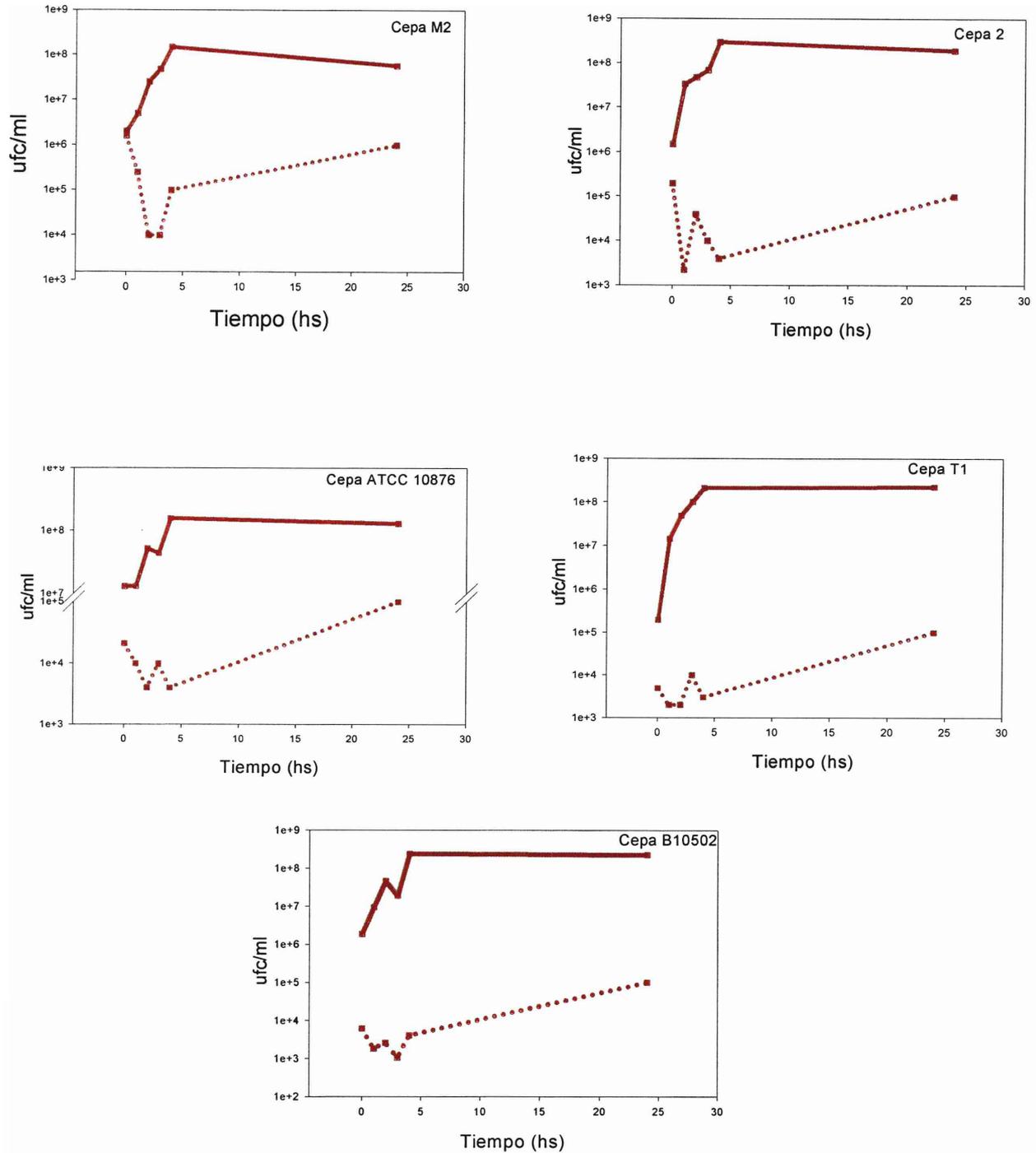


Figura 27: Curvas de crecimiento (—) de las cepas M2, 2, ATCC 10876, T1 y B10502 en medio BHI a 32°C con agitación. Las curvas de esporos (.....) se determinaron tratando una fracción de las muestras correspondientes a cada punto de la curva de crecimiento durante 30 minutos a 60°C. Experimento representativo de 2 experimentos independientes.

Tabla 7: Disminución del número de sobrevivientes de cepas de *B. cereus* luego de que una suspensión bacteriana proveniente de un cultivo de 3 hs con 1×10^6 ufc/ml, fuera tratada durante 1 hs a 37°C con 100 ug/ml de gentamicina.

Cepas	Bacterias iniciales (ufc/ml)	Sobrevivientes a la gentamicina (ufc/ml)	Unidades logarítmicas reducidas
M2	5.22×10^5	1.99×10^2	3.42
2	5.15×10^5	2.51×10^2	3.31
ATCC 10876	6.13×10^5	6.31×10^2	2.99
T1	5.45×10^5	5.25×10^2	3.02
B10502	5.95×10^5	1.17×10^3	2.70

IV. 2. B. 2. CUANTIFICACION DE LA INVASION

La invasión se determinó con dosis iniciales de 1×10^8 ufc/ml y de 2×10^8 ufc/ml. El criterio utilizado para determinar invasión fue que debían existir diferencias significativas entre los valores obtenidos luego del tratamiento con gentamicina y los valores obtenidos luego del tratamiento térmico.

Como con la dosis más alta las monocapas se desprendieron (Figura 28), se efectuó la determinación de las bacterias invasivas sobre las células en suspensión.

Los resultados obtenidos muestran una tendencia a mayor internalización con dosis iniciales de 2×10^8 ufc/ml (Tabla 8).

Teniendo en cuenta el criterio para determinar invasión, la cepa B10502 se considera no invasiva dado que no hay diferencias entre los sobrevivientes en las muestras tratadas con gentamicina y los sobrevivientes del tratamiento térmico (Tabla 8). En cambio las cepas M2, 2, ATCC 10876 y T1 se consideran invasivas ya que los valores de bacterias internalizadas están significativamente por encima de la cantidad de bacterias que resisten al tratamiento térmico.

En general, la cantidad de bacterias internalizadas se halla dos órdenes de magnitud por debajo de las bacterias asociadas.

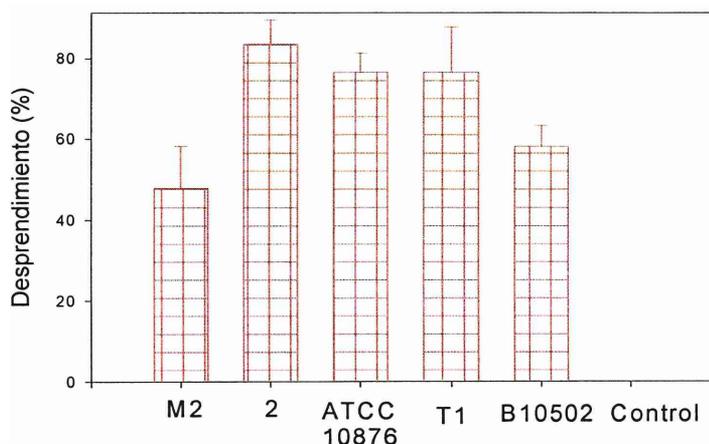


Figura 28: Efecto sobre la integridad de la monocapa de células Caco-2 luego de la infección con *B. cereus* durante 2 hs a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ con una dosis de 2×10^8 ufc/ml en medio DMEM adicionado con 100 µg/ml de cloranfenicol. Experimento representativo de 2 experimentos independientes.

Tabla 8: Estudio comparativo de la invasión a células Caco-2 de cepas de *B. cereus* con dosis iniciales de 1×10^8 ufc/ml y 2×10^8 ufc/ml resuspendidas en medio DMEM con $100 \mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol e incubadas durante 2 hs a 37°C en atmósfera de 5% de CO_2 . Las bacterias internalizadas se determinaron mediante el ensayo de protección con gentamicina. Los valores expresan log ufc/ml y entre paréntesis se halla el porcentaje de internalización

Cepas	Dosis inicial					
	1×10^8 ufc/ml			2×10^8 ufc/ml		
	Asociadas	Tratamiento con gentamicina	Tratamiento térmico	Asociadas	Tratamiento con gentamicina	Tratamiento térmico
M2	6.17 ± 0.34	$3.86 \pm 0.19^*$ (0.67)	2.90 ± 0.34	6.84 ± 0.00	$4.16 \pm 0.01^{**}$ (0.21)	3.01 ± 0.02
2	6.44 ± 0.35	$4.86 \pm 0.25^{**}$ (2.62)	1.40 ± 0.38	7.26 ± 0.05	$5.58 \pm 0.1^{**}$ (2.11)	2.78 ± 0.04
ATCC 10876	5.60 ± 0.08	$2.65 \pm 0.14^*$ (0.08)	1.90 ± 0.54	6.80 ± 0.03	$3.56 \pm 0.02^{**}$ (0.05)	2.48 ± 0.04
T1	6.26 ± 0.35	$4.80 \pm 0.28^{**}$ (3.51)	1.42 ± 0.22	7.04 ± 0.10	$6.10 \pm 0.07^{**}$ (11.48)	3.12 ± 0.03
B10502	5.77 ± 0.36	1.72 ± 0.59 (0.008)	<1.1	5.49 ± 0.05	2.37 ± 0.14 (0.07)	2.00 ± 0.01

Los asteriscos indican diferencias significativas entre los sobrevivientes al tratamiento con gentamicina y los sobrevivientes al tratamiento térmico:

*: $p \leq 0.05$

** : $p \leq 0.01$

IV. 2. B. 3. LOCALIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS INVASIVOS POR MICROSCOPIA

Con el objeto de indagar acerca de la localización de las bacterias internalizadas, se efectuaron estudios por microscopía confocal y microscopía electrónica de transmisión.

En los análisis efectuados por microscopía confocal, la cepa 2 fue teñida con anticuerpos monoclonales 113D2b3 y 116A3b3 que reconocen ácidos lipoteicoicos (Granato et al., 1999). En el control puede observarse que la F-actina se halla asociada al ribete en cepillo (Figura 29 A). Se obtuvieron resultados consistentes con los datos obtenidos mediante el ensayo de protección con gentamicina: en una proyección de imágenes se observa a las bacterias teñidas de rojo (Figura 29 B) y ubicadas en planos intermedios entre el

dominio basolateral y el dominio apical (Figura 29 C y D).

Mediante microscopía de transmisión puede observarse que las bacterias se hallan en zonas protegidas de la acción bactericida de la gentamicina. Se encontraron bacilos en una ubicación basolateral en la unión entre dos células (Figura 30 A). Asimismo, se observan imágenes compatibles con la ubicación de los microorganismos dentro de vacuolas (Figura 30 B). En ambos casos puede observarse el daño provocado al ribete en cepillo ya que ha desaparecido completamente en alguna zona o se encuentra desorganizado. Este efecto es consistente con lo mostrado en la Sección IV. 2. A. 3.

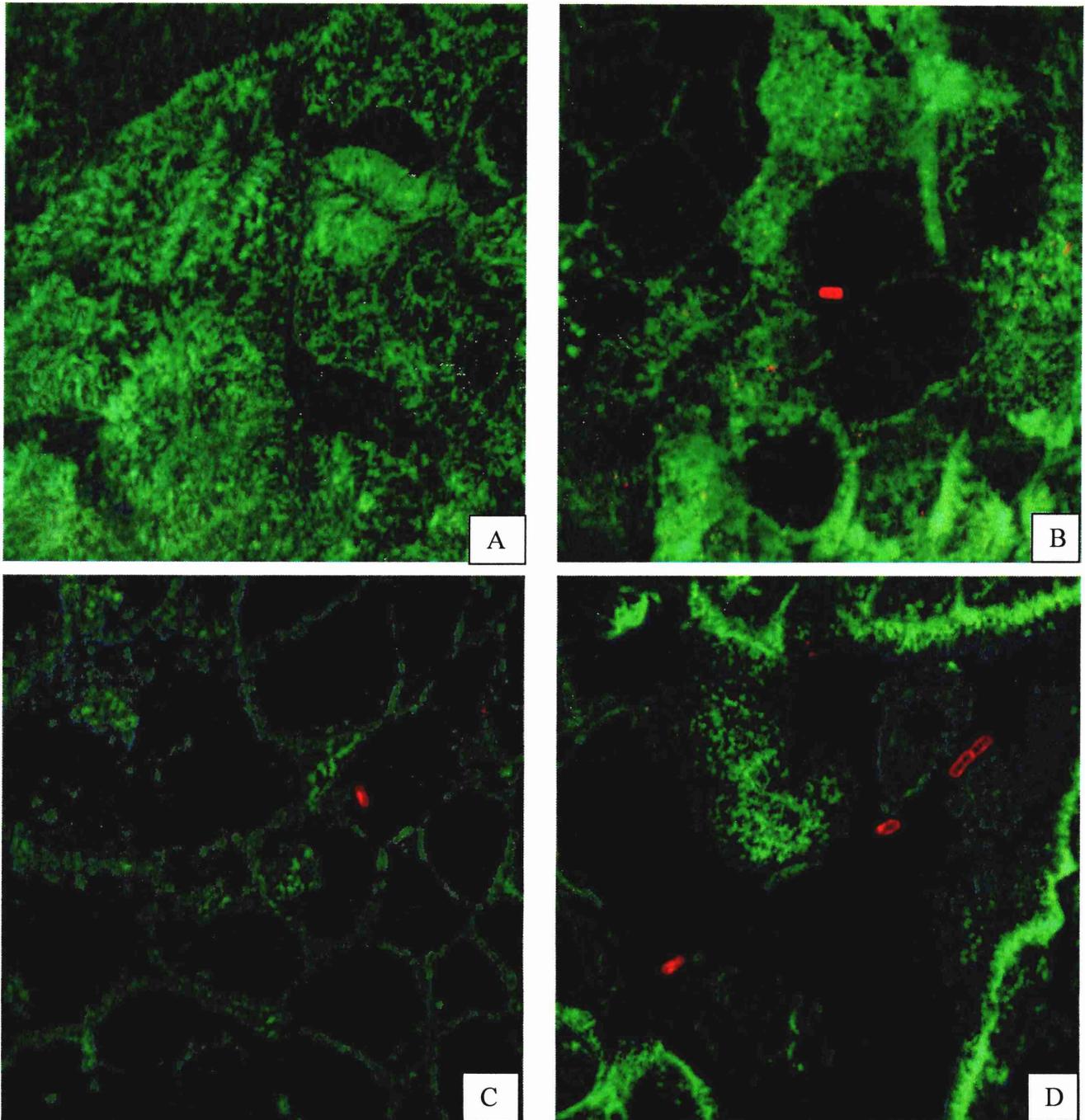


Figura 29: Microscopía confocal de células Caco-2 infectadas con la cepa 2. La bacteria fue marcada con anticuerpos monoclonales 113D2b3 y 116A3b3 que reconocen ácidos lipoteicoicos y como anticuerpo secundario anti-ratón marcado con TRITC. En una proyección de las imágenes los bacilos teñidos de rojo (B); en un plano interno (C) y en el borde apical (D). El control de las células sin infectar se observa en A.

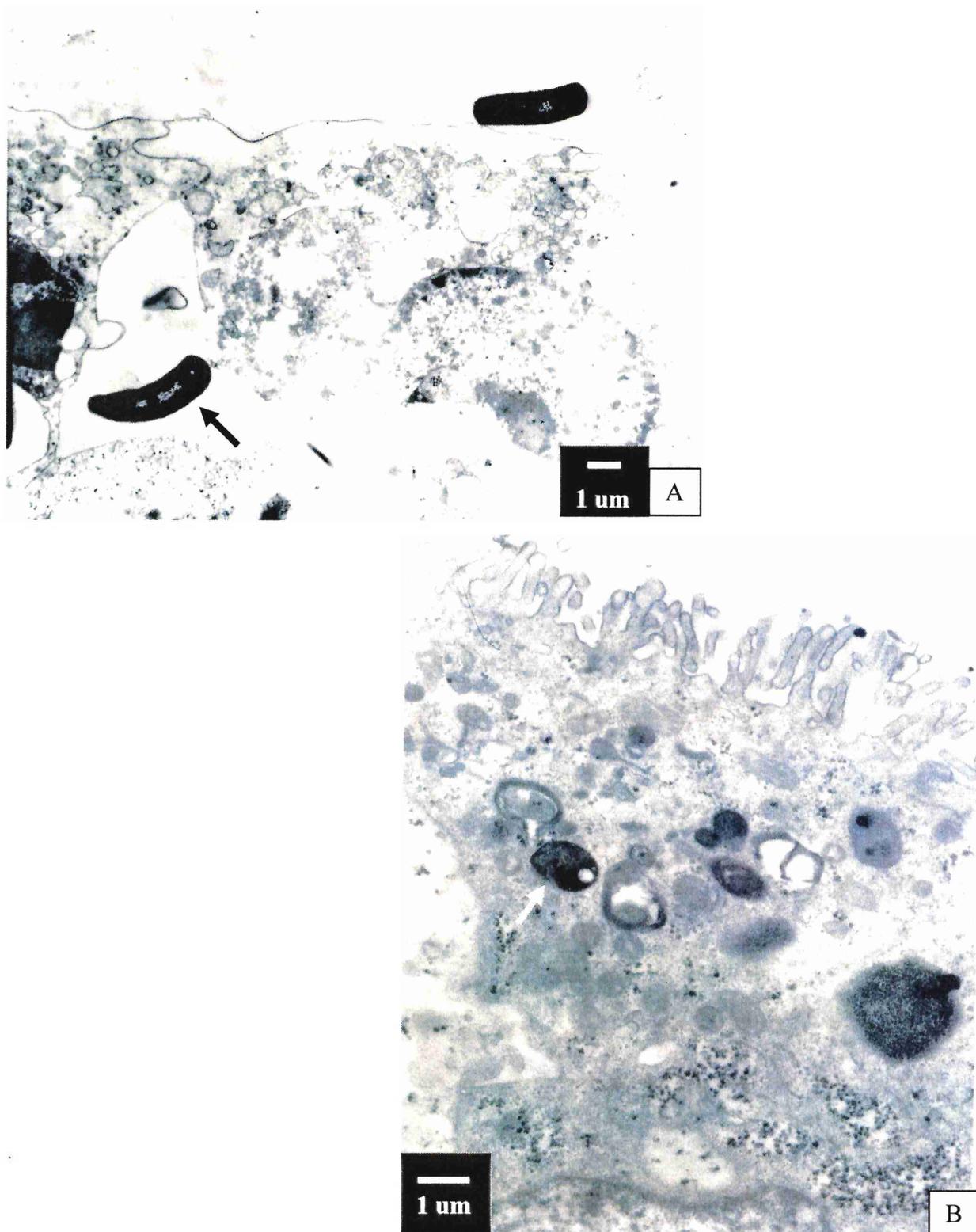


Figura 30: Microscopía electrónica de transmisión de células Caco-2 infectadas con *B. cereus* en medio DMEM con 100 ug/ml de cloranfenicol e incubadas 2 hs a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ con células Caco-2 crecidas sobre una membrana de colágeno. (A) cepa T1 ubicada en la zona basolateral (flecha negra) y (B) cepa 2 ubicada intracelularmente (flecha blanca). Las barras blancas indican tamaño.

IV. 2. C. FACTORES INVOLUCRADOS EN LA INTERACCION *B. cereus*-ENTEROCITO

IV. 2. C. 1. EFECTO DE LA CONCENTRACION MICROBIANA

Teniendo en cuenta que la dosis de infección es un factor altamente relevante en la interacción procariote-eucariote, se ensayaron diferentes concentraciones de bacterias infectantes. Para ello se utilizaron cultivos de las cepas de *Bacillus cereus* en fase exponencial y se encontró que la asociación a las células Caco-2 presentaban un comportamiento del tipo que se muestra en la figura 31. Esta curva corresponde a la cepa 2, y puede observarse que la misma es altamente dependiente de la dosis en la primera parte de la curva, para luego saturarse a partir de un determinado valor de bacterias iniciales agregadas. De esta manera los resultados de asociación obtenidos pueden mostrarse como porcentajes o valores absolutos (ucf/ml); pero para ello hay que tener en

cuenta la zona de la curva en la cual se está trabajando para poder comparar los resultados de diferentes cepas o tratamientos. Si lo que nos interesa observar son los valores absolutos de asociación, trabajar en la zona de saturación nos permite comparar resultados entre diferentes cepas aunque existan pequeñas variaciones en las bacterias agregadas sobre la monocapa.

Así, tanto los valores correspondientes a los resultados obtenidos con los cultivos en fase estacionaria como los obtenidos en fase exponencial se muestran en la tabla 8 en valores absolutos, expresados en unidades log lo que permite comparar resultados entre ambas fases de crecimiento.

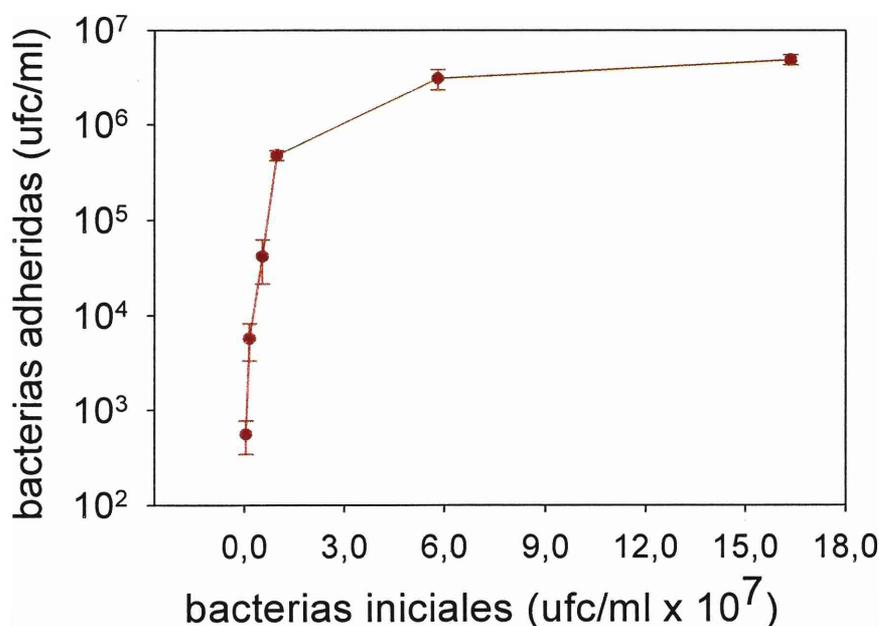


Figura 31: Curva de asociación a células Caco-2 de una suspensión de la cepa 2 proveniente de un cultivo de 3 hs e incubada 2 hs a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ en medio DMEM con 100 µg/ml de cloranfenicol. Las bacterias asociadas se muestran en función de las bacterias iniciales. Las barras indican desviación standard. Experimento representativo de 3 experimentos independientes.

IV. 2. C. 2. HIDROFOBICIDAD SUPERFICIAL

La asociación es un proceso que requiere el contacto entre las superficies celulares, tanto de las bacterias como de los enterocitos y por lo tanto las características físicas y químicas de las mismas afectan la interacción. La determinación de la hidrofobicidad superficial se usa para estudiar las características mencionadas anteriormente (Geertsema-Doornbusch et al., 1993).

El estudio de la hidrofobicidad de la superficie bacteriana permitiría estimar parte de las fuerzas atractivas que tendrían lugar en la asociación de la bacteria a los enterocitos. En estudios efectuados con cepas de *Bifidobacterium* se descubrió que valores altos de hidrofobicidad se

correspondían con cepas adherentes (Pérez et al., 1998).

Los valores de hidrofobicidad superficial obtenidos con *B. cereus* dieron resultados que fueron dependientes de las cepas (Figura 32). La mayoría de las cepas tiene valores por debajo del 50%; sólo lo superan levemente la cepa 313 (51 %) y la cepa 3 (64 %). Tres cepas (T1, ATCC 10876 y B10502) dieron 0% de hidrofobicidad. A diferencia de lo que ocurre con *Bifidobacterium* (Pérez et al., 1998), las variaciones de hidrofobicidad porcentual no correlacionan con cambios de asociación (Figura 33). Mediante un análisis de regresión se obtiene un $r^2 = 0.2657$, lo que demuestra que no existe correlación entre las variables estudiadas.

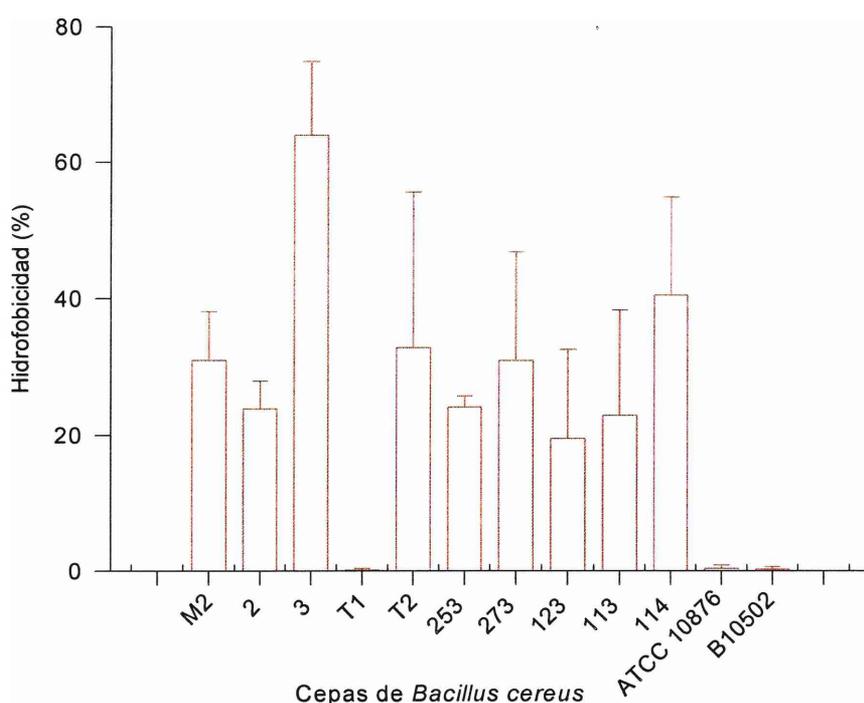


Figura 32: Hidrofobicidad superficial de cepas de *Bacillus cereus* provenientes de cultivos de 16 hs a 37°C en medio BHI. Se utilizó xileno como solvente de extracción. Experimento promedio de 3 experimentos independientes. Las barras indican desviación standard.

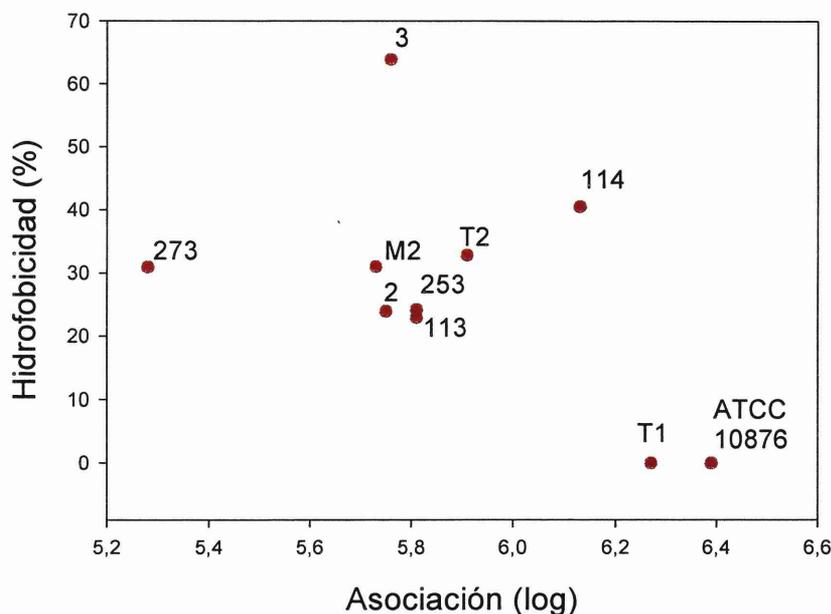


Figura 33: Relación entre la asociación y la hidrofobicidad superficial de las cepas de *B. cereus* para cultivos de 16 hs de incubación.

IV. 2. C. 3. NATURALEZA DE LAS ESTRUCTURAS INVOLUCRADAS EN LA ASOCIACIÓN

A fin de caracterizar la naturaleza de las estructuras que podrían intervenir en la asociación de *B. cereus* a enterocitos, las bacterias fueron tratadas con radiación ultravioleta (60 min: tiempo suficiente para no recuperar u.f.c.), 3 lavados con PBS, calor (30 minutos a 100°C), tripsina (2.5 mg/ml), quimotripsina (2.5 mg/ml), metaperiodato (50 mM) y cloruro de litio (5M). Luego de los correspondientes tratamientos se coincubaron las bacterias con las células epiteliales durante 2 hs a 37°C en atmósfera 5% de CO₂ / 95% aire y se obtuvieron los valores de asociación por microscopía.

Los resultados se muestran en la figura 34 y se resumen en la tabla 9.

El tratamiento de las cepas con UV hasta no observar microorganismos viables (ufc<10) afecta significativamente la asociación de todas las cepas respecto del control (Figura 34 A). Todo lo contrario ocurre al tratarlas con enzimas proteolíticas

(Figura 34 E) o al someterlas a un calentamiento a 60°C durante 30 minutos (Figura 34 B).

El lavado de las bacterias afecta la asociación de manera cepa dependiente, ya que de las 5 cepas ensayadas, 3 presentaron diferencias significativas respecto a su propio control ($p < 0.05$) (Figura 34 C), indicando que podría estar implicado material débilmente unido (Crow and Gopal, 1995).

Para determinar si existían moléculas de carbohidratos que tuvieran participación en la asociación se trataron las cepas con metaperiodato 50 mM. Las cepas ensayadas (Figura 34 D) no presentaron diferencias significativas con el control, lo que podría indicar que no participarían moléculas de carbohidratos en la asociación de las cepas a células Caco-2 (Bibiloni et al., 1999).

Finalmente el tratamiento con LiCl 5 M durante 30 minutos a temperatura ambiente, previamente a la coincubación de las bacterias con las

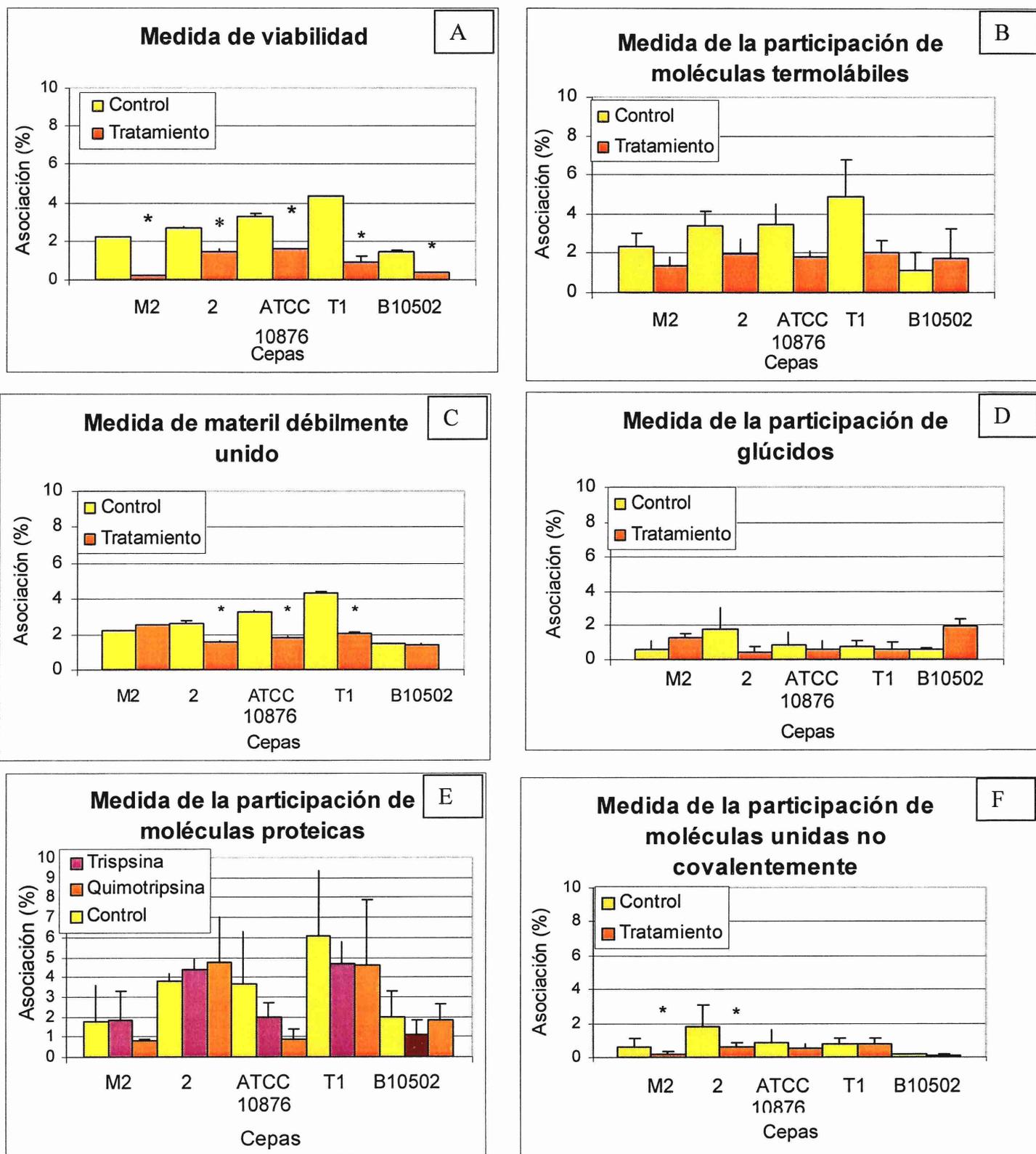


Figura 34: Efecto de distintos tratamientos sobre la asociación de *B. cereus* a células de epitelio intestinal humano en cultivo. A (U.V. durante 60 min.); B (calentamiento 100°C durante 30 min.); C (lavado de los cultivos 3 veces con PBS); D (incubación 30 min. A T_{amb} con metaperiodato 50mM); E (incubación 60 min. a 37°C con tripsina 2.5 mg/ml o quimotripsina 2.5mg/ml); F (incubación 30 min. Con LiCl 5M). Experimento representativo de 3 experimentos independientes. Las barras indican desviación Standard (en los casos en que no se observa es porque tiene un tamaño menor a la línea). * = p < 0.05.

IV. 2. Resultados

células epiteliales, permitiría determinar la participación de moléculas unidas no covalentemente a la pared celular de las bacterias (Bibiloni et al., 1999). Las cepas M2 y 2 presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con el control de bacterias sin tratar, observándose una disminución en los valores de asociación luego del tratamiento con el agente caotrópico (Figura 34 F)).

Resumiendo los resultados encontrados (Tabla 9) se podría considerar que la asociación de *B. cereus* a células Caco-2 dependería de la viabilidad (tratamiento con U.V) y no estarían implicadas moléculas de origen proteico (tratamiento con tripsina y quimotripsina), de origen glucídico

(tratamiento con metaperiodato) ni termolábiles (tratamiento con calor).

Respecto a la participación de material débilmente unido (lavado de las cepas) o moléculas no unidas covalentemente (tratamiento con LiCl), sería dependiente de la cepa, ya que presentaron diferencias significativas las cepas 2, ATCC 10876 y T1, y las cepas M2 y 2, respectivamente.

Tabla 9: Estudio de factores involucrados en la asociación de *B. cereus* a enterocitos humanos en cultivo en medio DMEM con 100µg/ml de cloranfenicol y coincubadas 2 hs a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂.

Cepas	Tratamientos					
	U.V.	Lavado	Calor	Enzimas	m-periodato	LiCl
M2	+	-	-	-	-	+
2	+	+	-	-	-	+
ATCC 10876	+	+	-	-	-	-
T1	+	+	-	-	-	-
B10502	+	-	-	-	-	-

Referencias:

+ : el tratamiento afectó significativamente la adhesión de la cepa.

- : el tratamiento no afectó significativamente la adhesión de la cepa.

U.V.: Radiación ultravioleta 60 min. Medida de la viabilidad

Lavado: Lavado 3 veces con PBS. Medida de material débilmente unido.

Calor: Tratamiento durante 30 minutos a 100°C. Medida de la participación de moléculas termolábiles en la asociación.

Enzimas: Tratamiento de las cepas con tripsina (2.5 mg/ml) y quimotripsina (2.5 mg/ml). Medida de la participación de moléculas proteicas en la asociación.

Metaperiodato: Tratamiento de las cepas con metaperiodato (50 mM).

Medida de la participación de glúcidos en la asociación.

LiCl: Tratamiento de las cepas con LiCl (5M). Medida de la participación de moléculas no unidas covalentemente.

Nota: todos los tratamientos se efectuaron previo a la infección.

IV. 2. C. 4. EFECTO DE FACTORES EXTRACELULARES SOBRE LA ASOCIACION

Entre los factores que median la asociación pueden hallarse compuestos solubles producidos por los microorganismos. Si supusiéramos que los mismos son liberados al medio de cultivo por la bacteria, y que no son específicos de cada cepa, estos podrían influir en la interacción de otras cepas con los enterocitos.

Sobre esta hipótesis se llevaron a cabo ensayos con dos cepas: una invasiva, la cepa 2, y otra no invasiva, la cepa B10502. Ambas se coincubaron con las células Caco-2 en medio DMEM adicionado con 100 µg/ml de cloranfenicol en distintas diluciones del sobrenadante de la cepa invasiva (cepa 2).

Los resultados obtenidos muestran que para la cepa 2 el efecto de sus

propios factores extracelulares sobre la adhesión es de tipo dosis-respuesta ($p < 0.05$) (Figura 35 A). Lo mismo ocurre al observar el efecto sobre la invasión: existe una relación lineal entre la cantidad de sobrenadante agregado y los valores de invasión obtenidos ($p < 0.05$) (Figura 35 B).

En el caso de la cepa B10502, el agregado de factores exocelulares de la cepa 2 aumenta la adhesión respecto al control respondiendo a una relación dosis-respuesta ($p < 0.05$) (Figura 36 A). En cambio la presencia de factores extracelulares de la cepa 2 no modifica el carácter no invasivo de la cepa B 10502 (Figura 36 B).

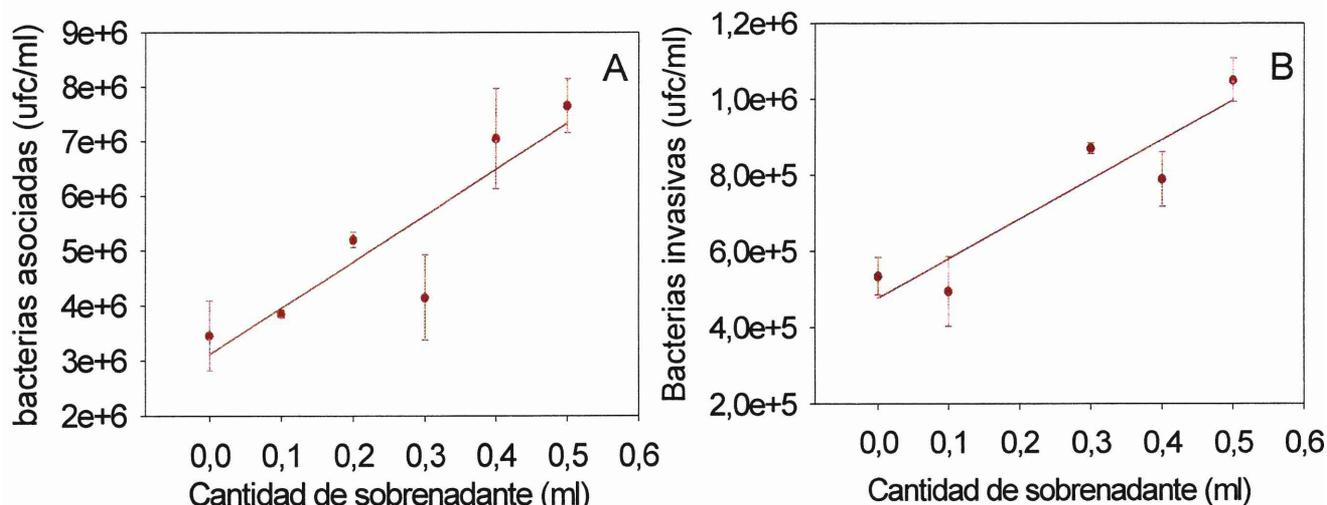


Figura 35: Estudio del efecto de distintas dosis del sobrenadante de la cepa 2 sobre la asociación (A) e invasión (B) a células Caco-2 de una suspensión de la misma cepa proveniente de un cultivo en fase exponencial. La infección se realizó en medio DMEM adicionado con 100µg/ml de cloranfenicol durante 2 hs a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Las barras indican desviación standard. Experimento representativo de 3 experimentos independientes. * = $p < 0.05$.

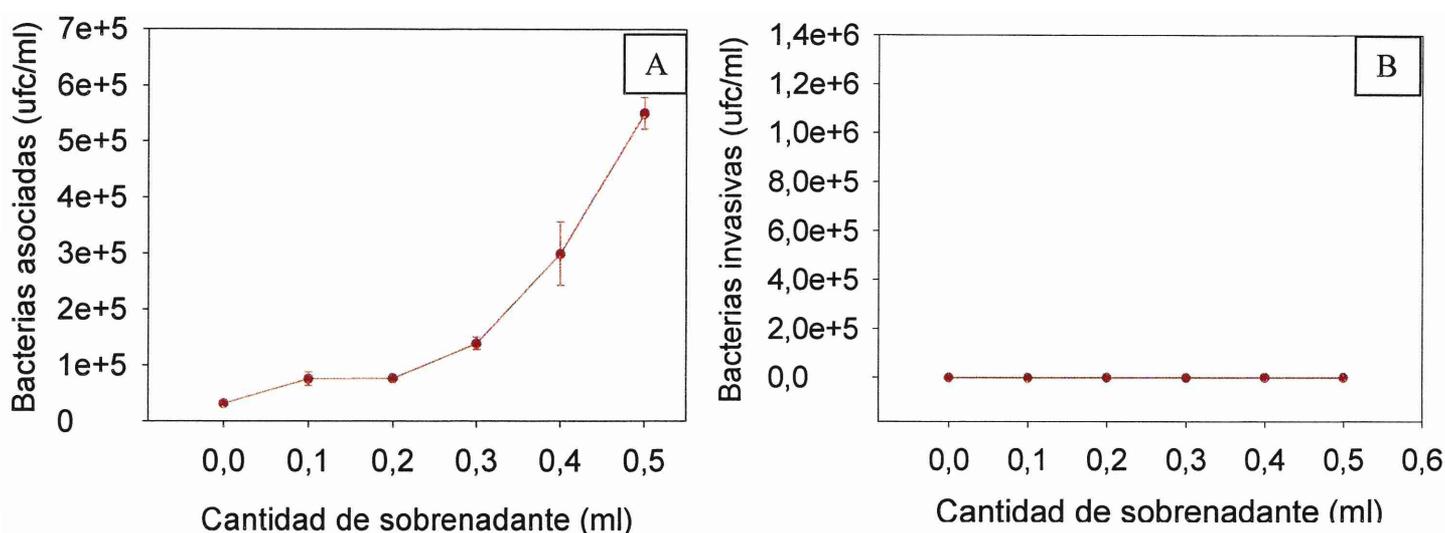


Figura 36: Estudio del efecto de distintas dosis del sobrenadante de la cepa 2 sobre la asociación (A) e invasión (B) a células Caco-2 de un cultivo de la cepa B10502 en fase exponencial resuspendido en medio DMEM adicionado con 100µg/ml de cloranfenicol y coincubado con las células 2 hs a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Las barras indican desviación standard. Experimento representativo de 3 experimentos independientes.

IV. 2. C. 5. EFECTO DEL CALCIO SOBRE LA ASOCIACION

El calcio es importante en varios procesos de las células eucarióticas, como por ejemplo la exocitosis, fertilización, proliferación, regulación de la polimerización de los microfilamentos de actina y la estabilización de las uniones estrechas (Dramsí and Cossart, 2003). Además puede contrarrestar la carga negativa de las superficies celulares favoreciendo la interacción de los microorganismos con las células eucarióticas (Henderson et al., 1999^d) Teniendo en cuenta estos datos, los ensayos de asociación en medio DMEM sin calcio podrían dar información acerca de los sitios de interacción de las cepas de *B. cereus* con los enterocitos.

Para estos ensayos se utilizó medio DMEM sin calcio, y medio DMEM sin calcio al cual se le adicionó calcio. En todos los casos las células se preincubaron 1 hs con el medio correspondiente luego de ser lavadas

con medio DMEM sin calcio. Luego se incubaron con cada cepa en los dos tipos de medios, según correspondía.

Las cepas utilizadas fueron la 2 y T1, que eran las que presentaron mayores valores de invasión para una dosis inicial de 1×10^8 ufc/ml (Tabla 8). Para ambas cepas, 2 y T1, puede observarse que la ausencia de calcio no afectó la cantidad de bacterias asociadas a la monocapa de Caco-2 (Figura 37 A y B).

Para la cepa 2 la asociación se halla en un valor promedio de 8×10^6 ufc/ml en los dos tipos de medios (Figura 37 A) y para la cepa T1 se halla en un valor medio de 5×10^6 ufc/ml (Figura 37 B).

En cambio, se observa un cambio significativo de la invasión en el medio sin calcio (Figura 37 C y D). En ambas cepas el número de bacterias que invaden es significativamente mayor en medio DMEM sin calcio, que en el otro medio ($p < 0.05$). En medio DMEM sin

IV. 2. Resultados

calcio la cepa 2 invade del orden de 7×10^5 ufc/fosa, respecto a 1×10^5 ufc/fosa para el medio con calcio (Figura 37 C); y la cepa T1 presenta el mismo comportamiento: invade 6 veces más en

el medios sin calcio que en el medio con calcio, con valores de 6×10^5 ufc/fosa y 1×10^5 ufc/fosa respectivamente (Figura 37 D).

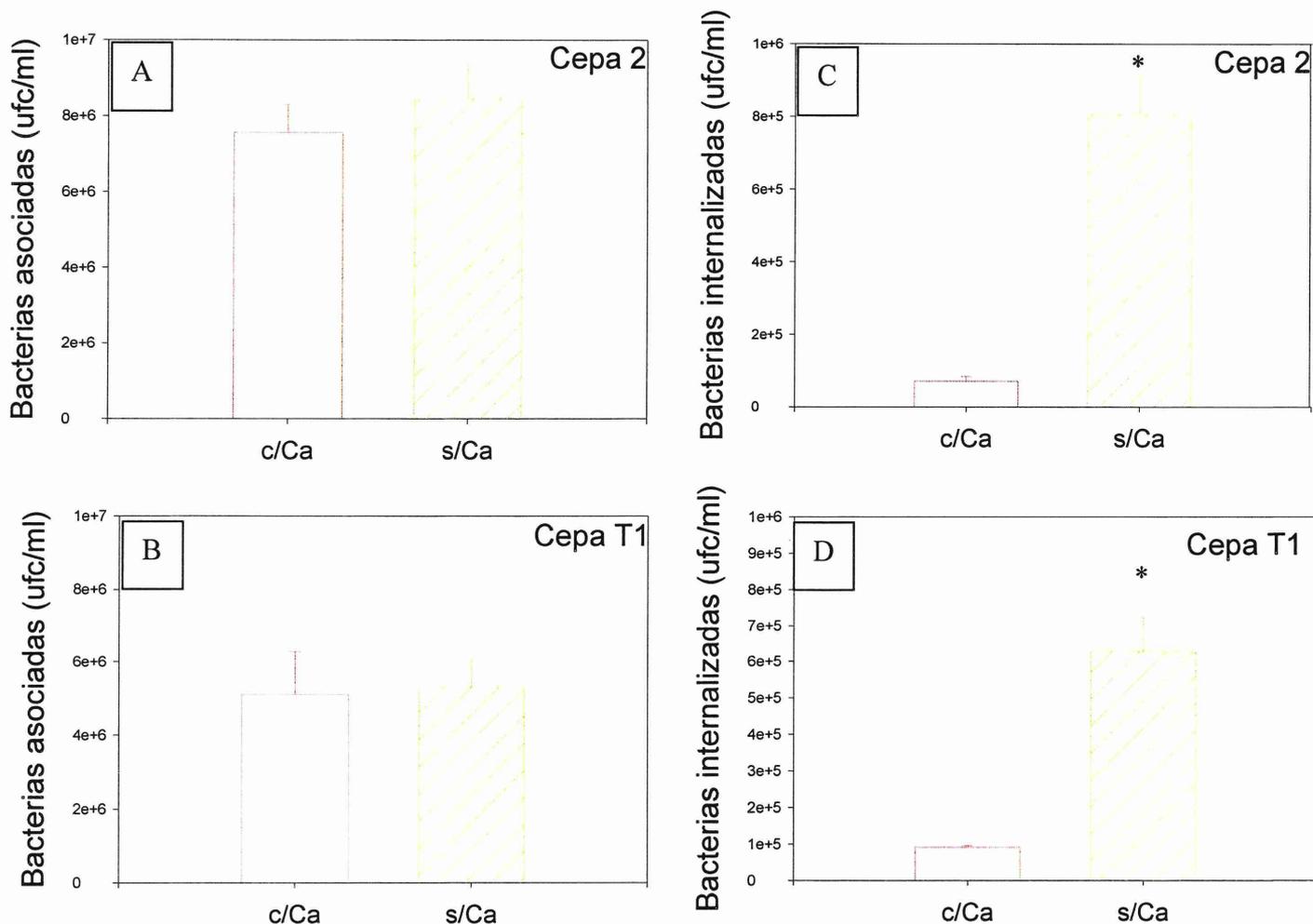


Figura 37: Efecto del calcio sobre la adhesión de la cepa 2 (A) y la cepa T1 (B) e invasión de las cepas 2 (C) y T1 (D) a células Caco-2 coincubadas 2 hs a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Experimento representativo de 3 experimentos independientes. Las barras indican desviación standard.

* = $p < 0.05$.

IV. 2. C. 6. EFECTO DEL TIEMPO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR SOBRE LA ASOCIACION

Dado que la expresión de moléculas en la superficie de las células depende del estado de diferenciación, se estudió la asociación e invasión de las cepas 2 y

T1 (invasivas) a células Caco-2 de distinto tiempo de cultivo.

En ambas cepas, la asociación presenta el mismo comportamiento (Figura 38 A y B): un alto número de

IV. 2. Resultados

bacterias adheridas a células de 4 días de cultivo, para volver a los valores obtenidos en ensayos anteriores en el resto de los puntos (9 días, 15 días y 21 días).

En cuanto a la invasión, también se observa el mismo comportamiento en ambas cepas (Figura 38 C y D): el número de bacterias que invaden es alto para el primer punto, células de 4 días y

luego desciende a valores del orden de 2×10^5 ufc/ml a 4×10^5 ufc/ml para la cepa 2 (Figura 38 C) y 4×10^5 ufc/ml para la cepa T1 (Figura 38 D). Esta última cepa para células de 9 y 15 días, muestra valores con una tendencia a menor invasión comparadas con células de 21 días, aunque, debido a la dispersión de los resultados, la diferencia no es significativa.

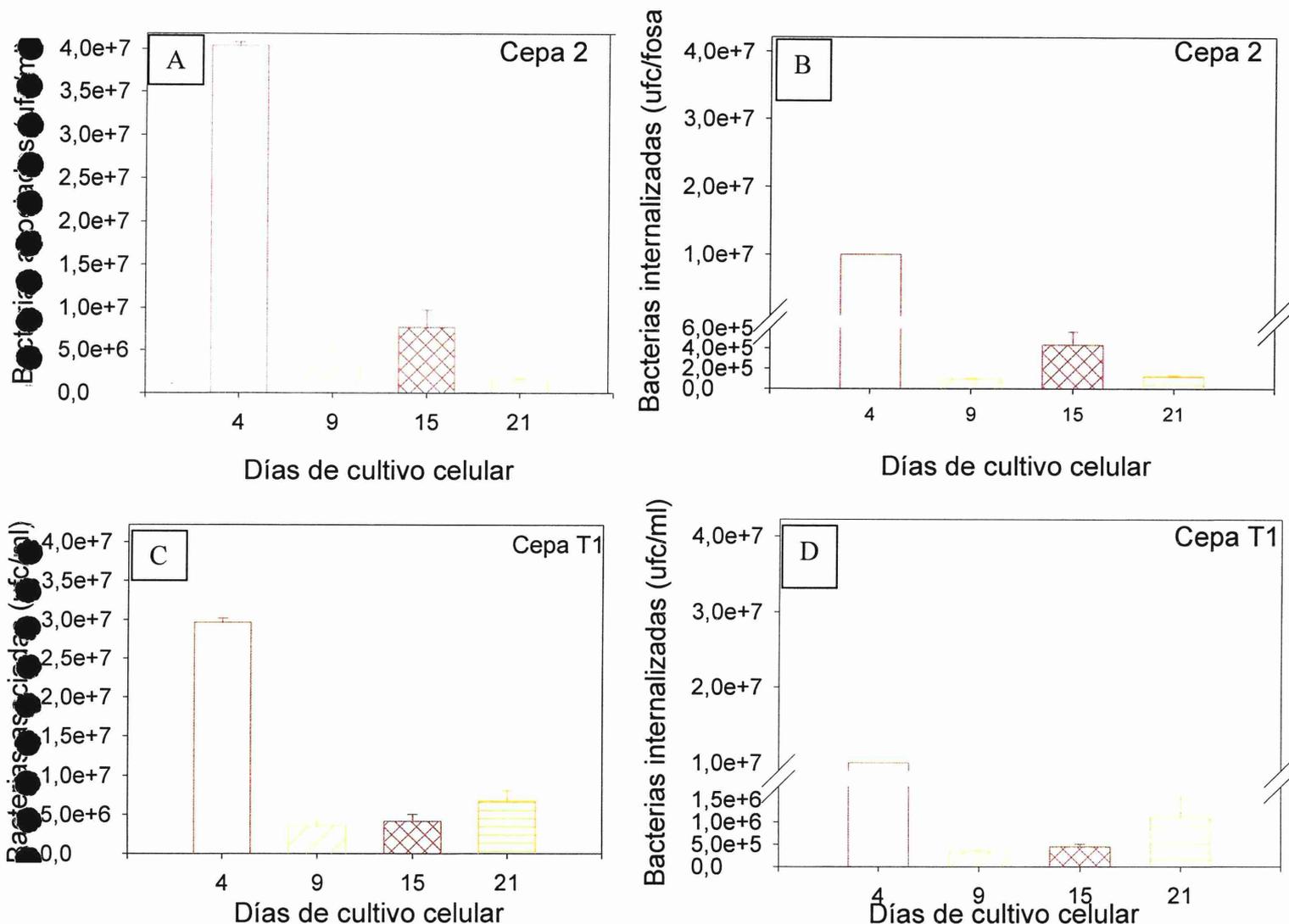


Figura 38: Adhesión e invasión de cepas de *Bacillus cereus* a células Caco-2 en diferentes tiempos de cultivo de los enterocitos. Las cepas 2 (A y C) y T1 (B y D) fueron suspendidas en medio DMEM adicionado con Cloranfenicol 100µg/ml y coincubadas con los enterocitos humanos a 37°C durante 2 hs en atmósfera de 5% de O₂. Las barras indican desviación standard. Experimento representativo de 3 experimentos independientes.

IV. 2. D. DETERMINACION DEL DAÑO CELULAR PRODUCIDO A LAS CELULAS CACO-2 POR LA INFECCION DE *Bacillus cereus*.

IV. 2. D. 1. ESTUDIO DEL CITOESQUELETO DE LOS ENTEROCITOS INFECTADOS

Teniendo en cuenta los resultados de otros experimentos, como por ejemplo las observaciones microscópicas, y considerando que una de las estructuras que contribuyen a mantener la morfología celular es la red de F-actina, se plantearon estudios del efecto de la infección sobre el citoesqueleto.

La coincubación de Caco-2 con *B. cereus* 2 hs a 37°C en 5% de CO₂ en medio DMEM con 100 µg/ml de cloranfenicol provocó distintos grados de daño, dependiendo de la cepa, pero en todas se observó una redistribución de la red de actina (Figura 39). El control de las células sin infectar muestra una localización de la F-actina en los bordes de las células, asociada a las microvellosidades y distribuidas uniformemente en las células. También se observa el patrón continuo de contacto célula-célula (Figura 39 A).

En los enterocitos infectados con *Bacillus cereus* (Figura 39 B-F) en la periferia de las células hay una marcación de F-actina más intensa que en el control (Figura 39 B). Asimismo se hallan zonas donde la concentración de F-actina ha disminuido, hasta desaparecer totalmente, encontrándose zonas oscuras por la falta de tinción (Figura 39 F) y no por desprendimiento

celular. También se observa que en algunas regiones han desaparecido las microvellosidades.

Para estudiar la distribución de la actina tanto en las células usadas como control como en las células infectadas con *B. cereus*, se efectuaron análisis de las imágenes obtenidas midiéndose la intensidad del color verde en toda la superficie de las mismas (Figura 40).

Con este método se observa una redistribución de la F-actina en lugar de una disminución de la misma. No se hallaron diferencias en la intensidad total de la fluorescencia, excepto para la cepa T1, la que presentó valores más bajos que el control sin infectar (Figura 40).

La desorganización del citoesqueleto requirió del contacto bacteria-célula, ya que filtrados del medio de infección luego de 2 hs de coincubación con las células, no provocaron daño al citoesqueleto (Figura 41). Se observó que la F-actina se halla distribuida regularmente, asociada a las microvellosidades y en los bordes de las células tanto en el control (Figura 41 A) como en las células tratadas con los filtrados del medio de infección (Figura 41 B F), no encontrándose diferencias entre ellas.

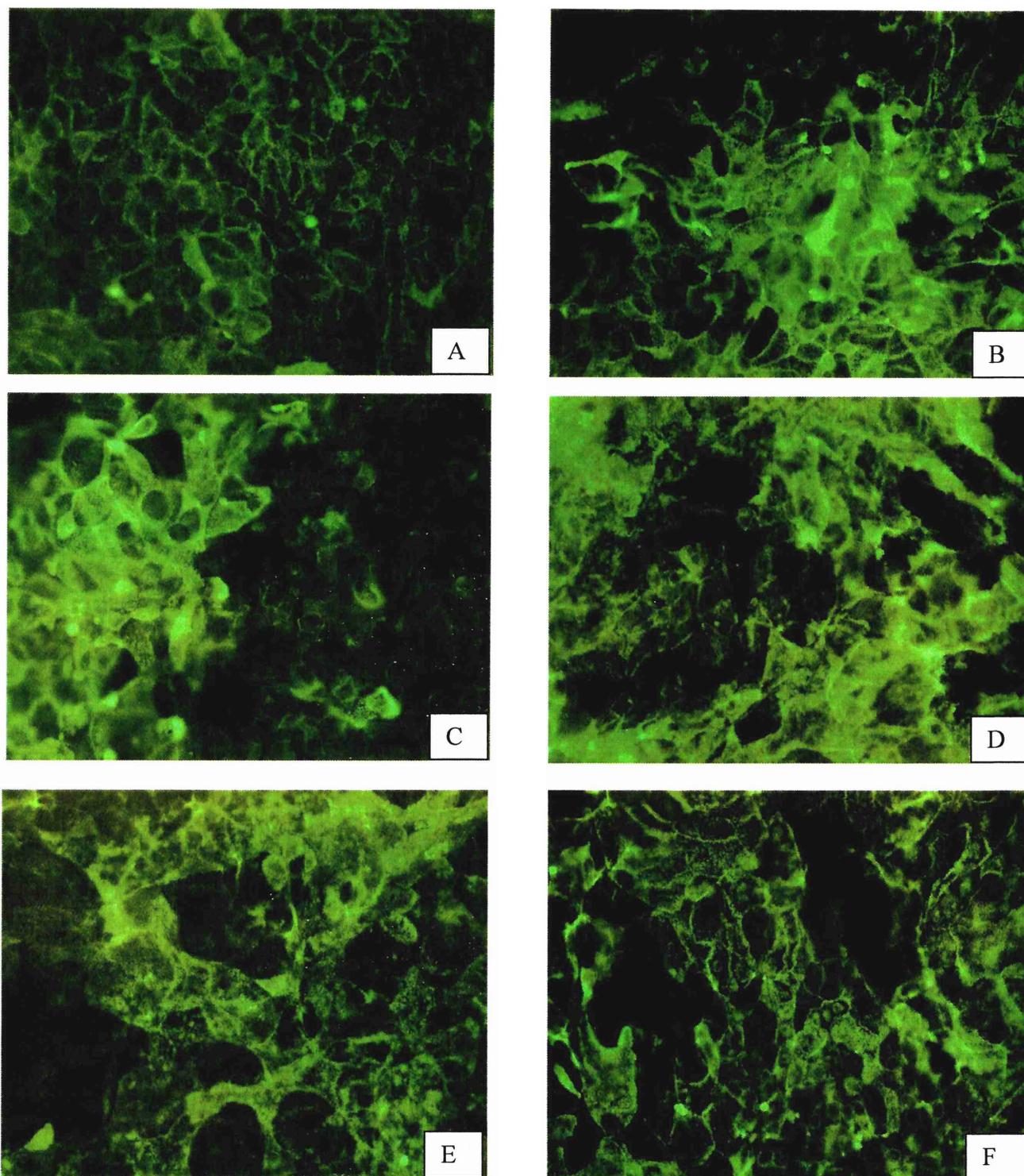


Figura 39: Efecto provocado por la infección a células Caco-2 con distintas cepas de *Bacillus cereus*. Luego de las 2 hs de infección en medio DMEM con ATB, las células se tiñeron con FITC-faloidina. (A) control de células sin infectar, (B) T1, (C) 2, (D) B10502, (E) M2 y (F) ATCC 10876.

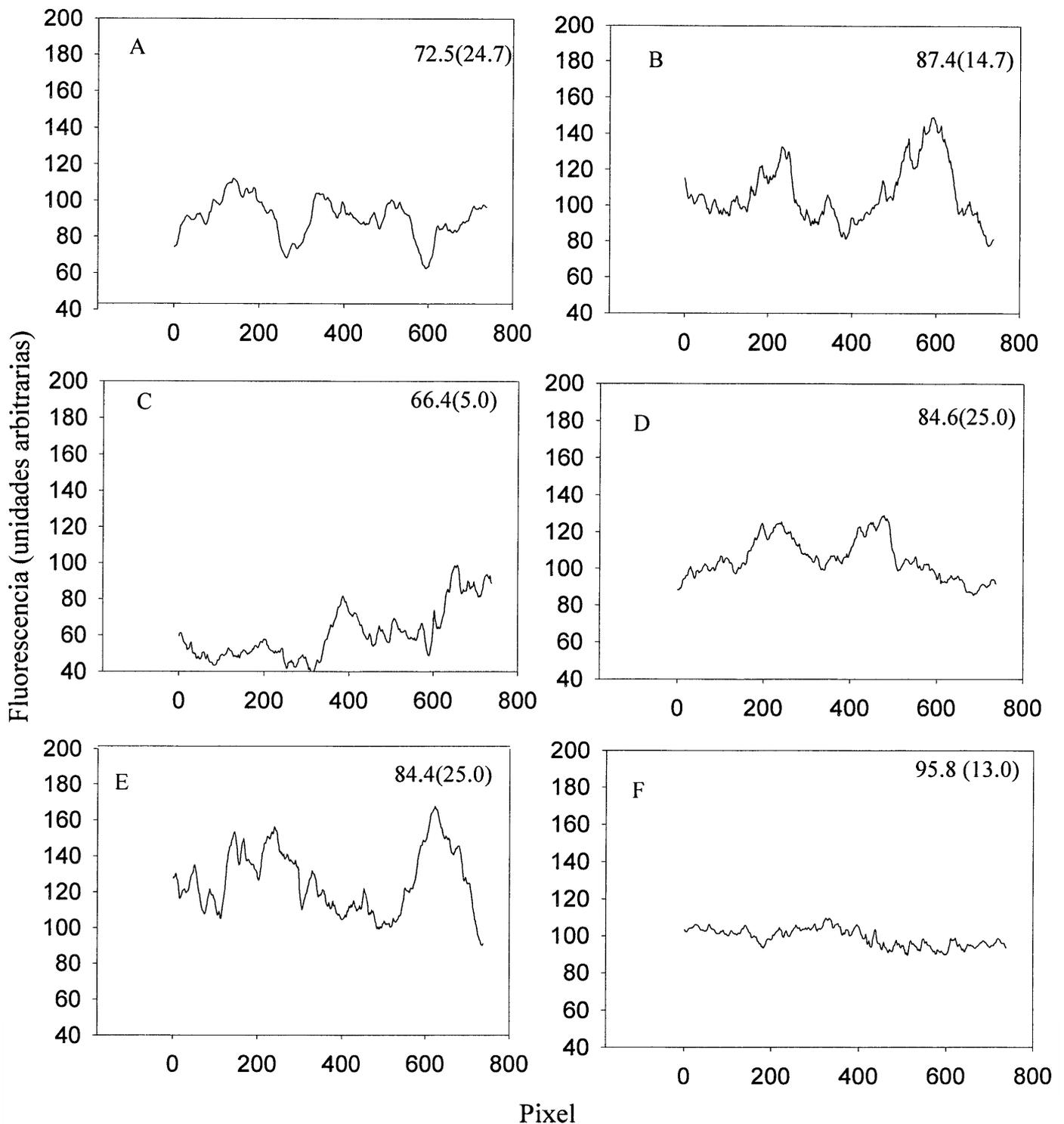


Figura 40: Análisis de las imágenes de la distribución de F-actina en las células Caco-2 infectadas con *Bacillus cereus*. Las células fueron teñidas con FITC-faloidina y luego se seleccionó el área entera de cada imagen, donde se efectuó una medida de la densidad del color verde. Los resultados son de un experimento representativo. (A) ATCC 10876, (B) 2, (C) T1, (D) B10502, (E) M2 y (F) control de las células. Los números ubicados en el margen superior derecho de cada figura indican la intensidad promedio del color verde y la desviación standard entre paréntesis.

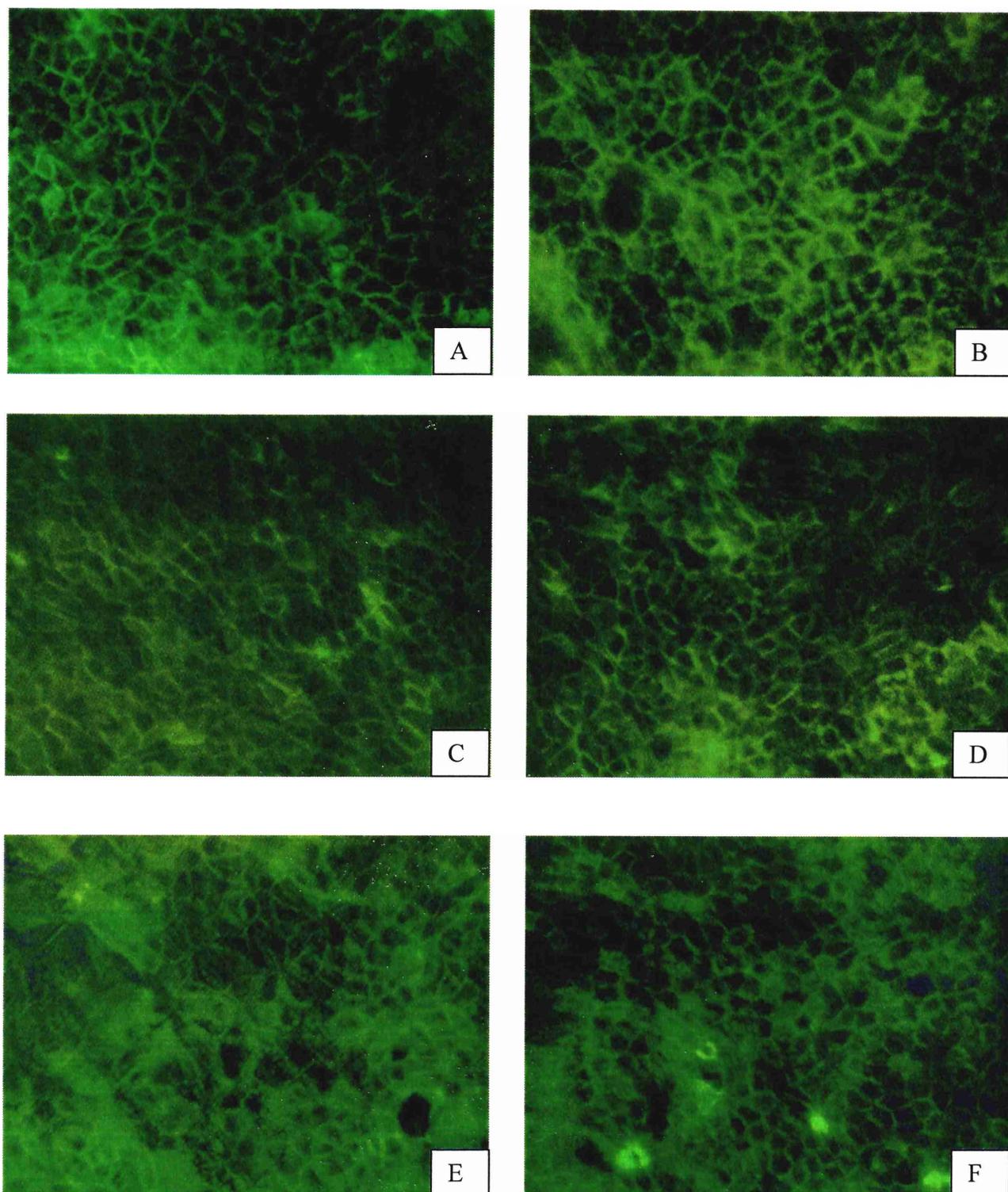


Figura 41: Marcación de F-actina (con FITC-faloidina) de las células Caco-2 tratadas con el medio de infección (2 hs). (A) control de células, (B) T1, (C) 2, (D) B10502, (E) M2 y (F) ATCC 10876.

Con el objeto de determinar si las zonas dañadas se correspondían con los lugares de adhesión/invasión de los microorganismos, se realizaron estudios por microscopía confocal. Tal como se muestra en la Figura 42, las regiones

alrededor de las bacterias muestran una profunda distorsión del citoesqueleto.

Los bacilos teñidos de rojo se hallan en zonas donde la fluorescencia verde ha desaparecido (Figura 42 A y B).

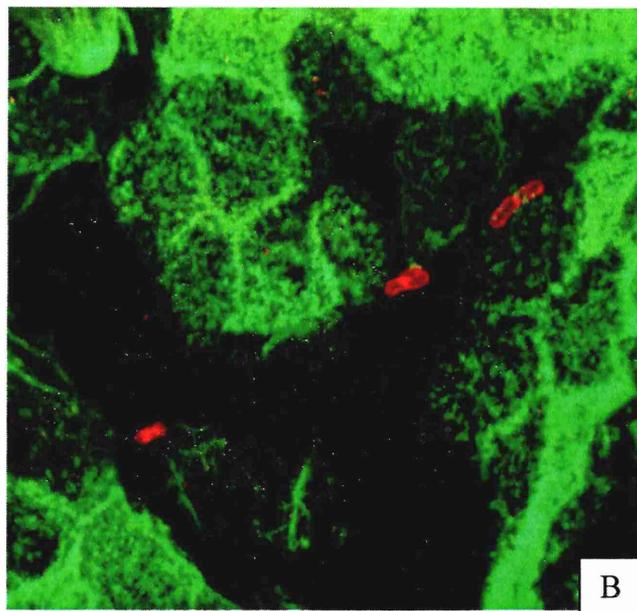
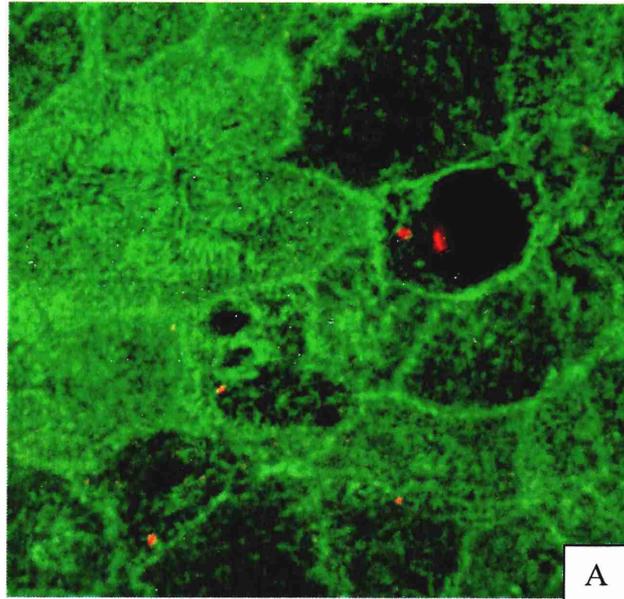


Figura 42: Microscopía confocal de células diferenciadas Caco-2 infectadas con la cepa 2. La bacteria fue marcada con anticuerpos monoclonales 113D2b3 y 116A3b3 que reconocen ácidos lipoteicoicos. Se utilizó un anticuerpo anti-ratón marcado con TRITC como anticuerpo secundario. En una proyección de las imágenes se puede observar la colocalización del daño al citoesqueleto con la ubicación de las bacterias (A y B).

La cinética de asociación de la cepa 2 a Caco-2 muestra una saturación luego de 1 hs de coincubación (Figura 43); en cambio si se efectúa la misma cinética observando el efecto sobre el citoesqueleto, los datos obtenidos dan cuenta de un efecto que comienza a los 30 minutos de infección.

En el control (Figura 44 A) se observa la F-actina en los bordes y en el ribete en cepillo, que se halla distribuido en toda la célula y el contacto célula-célula se mantiene en toda la imagen. A los 30 minutos (Figura 44 B) comienzan a evidenciarse cambios en la red de actina. A los 60 minutos (Figura 44C) el daño es notorio ya que la F-actina se halla

marcadamente en los bordes, en ciertas zonas se perdió el patrón continuo de contacto entre las células y las microvellosidades sólo se observan en algunas zonas. A los 120 minutos (Figura 44 D) el efecto es aún mayor ya que no se observan microvellosidades, la F-actina está sólo en los bordes dejando el centro de las células sin marca fluorescente.

En conclusión, los resultados (Figura 44) muestran que hay un efecto en la distribución de la actina a partir de los 30 minutos y que este efecto va aumentando conforme aumenta el tiempo.

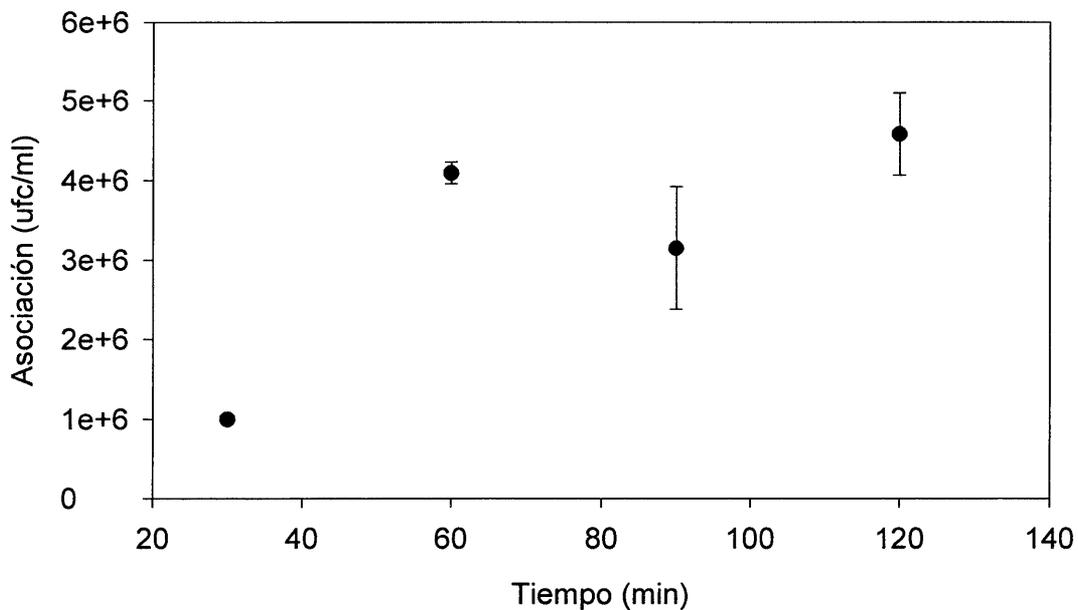


Figura 43: Cinética de asociación de la cepa 2 incubada con las células caco-2 a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ en medio DMEM con 100 ug/ml de cloranfenicol. Las barras indican desviación standard. Experimento representativo de 3 experimentos independientes.

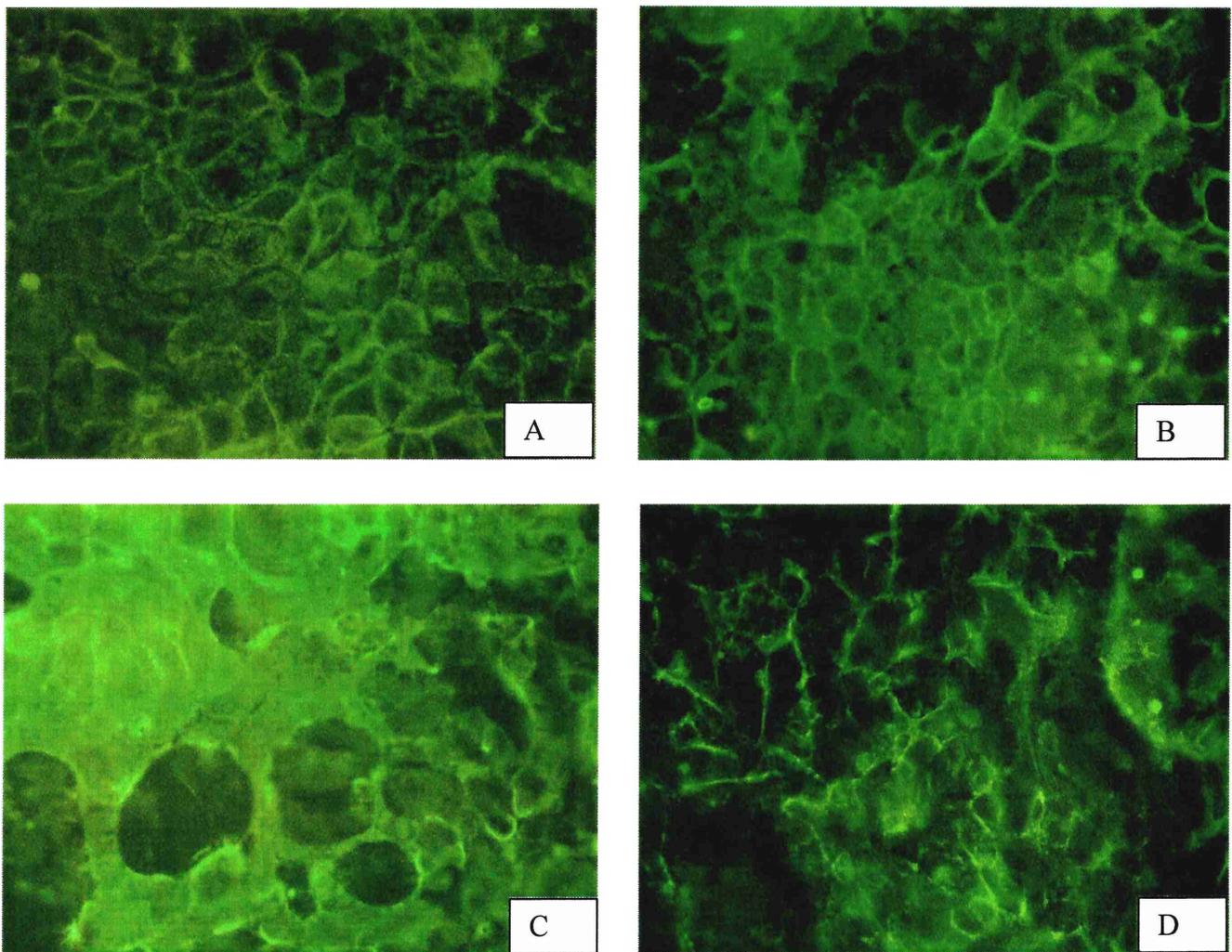


Figura 44: Efecto sobre el citoesqueleto de células Caco-2 de la infección de la cepa 2. Se incubó a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ durante 30 minutos (B), 60 minutos (C) y 120 minutos (D). El control (A) corresponde a 120 minutos de incubación en medio DMEM con cloranfenicol (100µg/ml).

IV. 2. D. 2. EFECTO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR: APOPTOSIS-NECROSIS

Al infectar las células Caco-2 con *Bacillus cereus* y luego teñirlas con anexina-V- FITC y ioduro de propidio, se encontró que luego de 2 hs de coincubación, todas las cepas producían mayormente necrosis, ya que los núcleos se hallan teñidos de color rojo (Figura 45). Estos resultados estarían indicando una profunda desorganización de la membrana plasmática, lo que permite el ingreso del colorante. Las monocapas sin tratar (Figura 45 F) no mostraron células necróticas y sólo algunas células se

hallaban en estado apoptótico, lo que nos sirvió como control para saber que el efecto se debió al contacto con los microorganismos, y no por el manejo experimental.

En el caso de la cepa T1 (Figura 45 C) se observa una célula con doble marcación (rojo y verde). Esto nos podría estar indicando una célula apoptótica o necrótica como consecuencia de un proceso realizado en un cultivo donde no hay células fagocíticas para remover las células muertas (van Engeland et al., 1996).

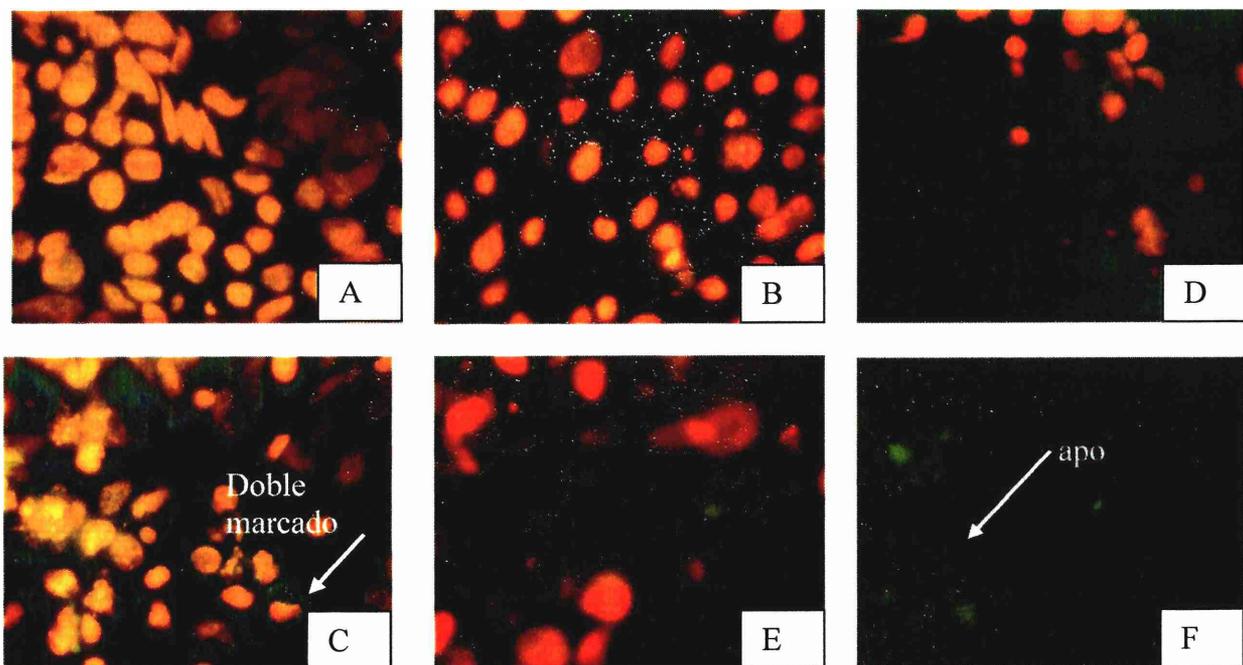


Figura 45: Microscopía de fluorescencia de células Caco-2 infectadas durante 2 hs con 1×10^8 ufc/ml de *Bacillus cereus*. Luego de dicho periodo las células fueron teñidas con Anexina-V-FITC y ioduro de propidio (PI). Las zonas rojas representan los núcleos de las células necróticas (nec) y las verdes indican marcación con Anexina-FITC (apo). (A) ATCC 10876, (B) 2, (C) T1, (D) B10502, (E) M2 y (F) control de células sin infectar.

IV. 2. E. ESTUDIO DE LA VIAS DE SEÑALIZACION INVOLUCRADAS EN LA INFECCION DE CELULAS CACO-2 POR *Bacillus cereus*

IV. 2. E. 1. ESTUDIO DEL CITOESQUELETO DE LAS CELULAS EPITELIALES LUEGO DE LA INFECCION CON *Bacillus cereus* EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE LAS VIAS DE SEÑALIZACION

Para estudiar las posibles vías de señalización involucradas en el daño que produce la infección de células epiteliales Caco-2 con *Bacillus cereus*, se coincubaron las mismas con distintos inhibidores durante la infección y luego se observó el efecto sobre el citoesqueleto.

Para ello se utilizó la cepa T1, que como ya hemos visto es capaz de adherir e invadir las células Caco-2 y produce daño en el citoesqueleto de las mismas.

Cada uno de los inhibidores utilizados puede afectar una vía de señalización en particular (Tabla 10) y se utilizó en las siguientes concentraciones: genisteína (49.5

ug/ml), filipina III (14.4 ug/ml), ciclodextrina (7.3 ug/ml), calfofostina (0.009 ug/ml), dantroleno (5.8 ug/ml), wortmanina (0.26 ug/ml), nocodazol (5.7 ug/ml), U73122 (9.3 ug/ml) y estaurosporina (37 ng/ml), que se coincubaron sobre la monocapa epitelial 1 hs a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂ junto con las bacterias.

Los resultados obtenidos luego de contar las células que poseían el citoesqueleto dañado (Figura 46) demuestran que las sustancias capaces de proteger a las células del daño producido por las bacterias son el dantroleno, la wortmanina, el U73122 y la estaurosporina (p<0.05)

Tabla 10: Inhibidores utilizados para estudiar las vías de señalización implicadas en la infección de *B. cereus* a células Caco-2

Inhibidor	Mecanismo de inhibición	Referencia
Genisteína	Inhibe tirosin kinasas	Wells et al., 1999
Filipina III	Se une a colesterol de caveolas	Orlandi and Fishman, 1998
Ciclodextrina	Extrae colesterol de la membrana plasmática	Kansas et al., 2004
Calfofostina	Inhibe protein kinasa C (PKC).	Kobayashi et al., 1989
Dantroleno	Inhibe la liberación de calcio de las reservas intracelulares mediada por inositoltrifosfato (IP ₃)	MacMillan et al., 2005
Wortmanina	Inhibe la actividad de proteina 3-Kinasa (P3K)	Meraz et al., 2006
Nocodazol	Inhibe la polimerización de microtúbulos	Blocker et al., 2001
U73122	Inhibe la activación de fosfolipasa C (PLC)	Schmolke, 2008
Estaurosporina	Inhibe la actividad de varias kinasas: protein kinasa A (PKA), protein kinasa C (PKC), protein kinasa G (PKG), kinasa de la cadena liviana de miosina (MLCK) y Ca-calmodulina kinasa (CaMK).	Wong et al., 2007

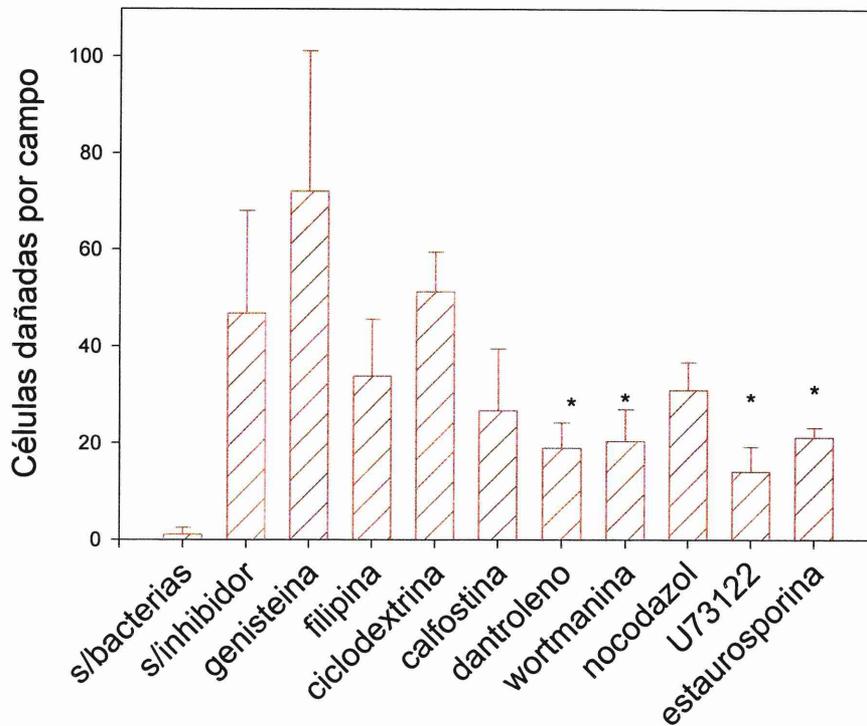


Figura 46: Daño producido al citoesqueleto de las células Caco-2 luego de ser infectadas 1 hs a 37°C con la cepa T1 de *Bacillus cereus* y distintos inhibidores de vías de señalización celular. * indica diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto al control sin inhibidores. Las barras indican desviación standard. Ensayo representativo de 3 experimentos independientes.

Los 4 inhibidores cumplen algún rol en la vía de los lípidos fosforilados, lo que resultó un hallazgo importante.

En las células eucarióticas, los lípidos de la membrana plasmática son el sustrato de muchas enzimas, como por ejemplo las fosfolipasas. Un grupo de fosfolípidos, los fosfatidil inosoles cumplen importantes funciones en la señalización (Henderson et al, 1999^c).

En la Figura 47 se muestra un esquema de la cadena de reacciones sobre la que cual actúan los inhibidores que resultaron de nuestro interés. Entre las enzimas que participan en este proceso se encuentra la fosfatidilinositol 5-quinasa (Pi5K) que fosforila al fosfatidilinositol 4-fosfato (PiP) para formar el fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PiP₂). Sobre esta última molécula pueden actuar dos enzimas distintas: fosfolipasa C (PLC) o fosfoinositido 3-

quinasa (Pi3K). Si actúa la primera, se libera inositol 1,4,5-trifosfato (iP₃) y la moléculas de diacilglicerol (DAG) queda unida a la membrana. El U73122 inhibe la acción de esta enzima. El iP₃ libera calcio de los compartimientos intracelulares como el retículo endoplasmico. El DAG activa la proteína quinasa C (PKC). Sobre esta última enzima actúa la estaurosporina y la calfofostina; y el dantroleno inhibe la liberación de calcio estimulada por el iP₃ (Figura 47).

Mediante la acción de Pi3K sobre PiP₂ se forma el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PiP₃) que activa la protein quinasa B (PKB) (Figura 44).

Con el objeto de dilucidar las vías de señalización de adhesión/invasión, se realizaron ensayos en presencia de wortmanina y U73122.

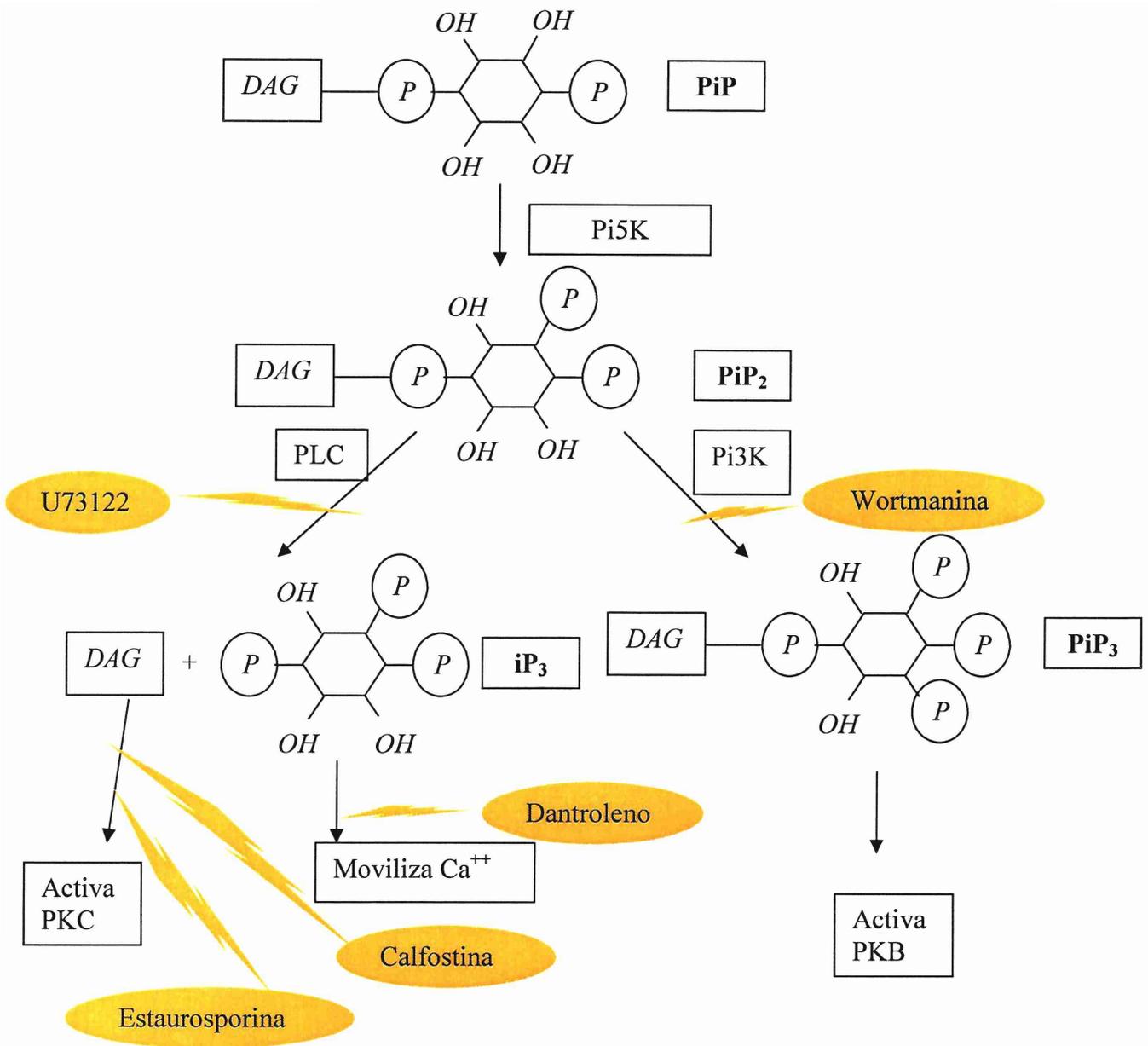


Figura 47: Esquema de la vía de los lípidos fosforilados y ubicación de la acción de los inhibidores. Adaptado de Henderson et al, 1999^c.

Referencias: DAG (Diacilglicerol), iP_3 (inositol 1,4,5-trifosfato), Pi3K (fosfoinositido 3-quinasa), Pi5K (fosfatidilinositol 5-quinasa), PiP (fosfatidilinositol 4-fosfato), PiP₂ (fosfatidilinositol 4,5-difosfato), PiP₃ (fosfatidilinositol 3,4,5- trifosfato), PKB (proteína quinasa B), PKC (proteína quinasa C) y PLC (fosfolipasa C).

IV. 2. E. 2. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LAS VÍAS DE LOS LÍPIDOS FOSFORILADOS SOBRE LA ADHESION-INVASION DE LA CEPA T1

Para realizar estos ensayos se eligieron dos inhibidores: U73122 y wortmanina, ya que según los resultados encontrados al estudiar el citoesqueleto estos demostraron ejercer protección frente al daño producido por *B. cereus* y además serían los dos que actuarían en etapas tempranas de las vías de señalización por lípidos fosforilados (Figura 47).

Los resultados encontrados al estudiar la adhesión e invasión de la cepa T1 en presencia de wortmanina, U73122 y la combinación de ambos demostraron un efecto dependiente del proceso que se esté estudiando (Figura 48). Si analizamos adhesión de la cepa

T1 a las células epiteliales, observamos que los dos compuestos y la combinación de ambos son capaces de disminuir ($p < 0.05$) la cantidad de bacterias adheridas respecto al control (Figura 48 A), encontrándose un efecto sinérgico ($p < 0.05$). En cambio si estudiamos la invasión observamos que la wortmanina no tiene ningún efecto significativo (Figura 48 B) y en cambio tanto el U73122 como la combinación de este con wortmanina disminuyen significativamente ($p < 0.05$) los valores respecto al control (Figura 48 B). En este caso no hay efecto sinérgico cuando se emplean ambos inhibidores.

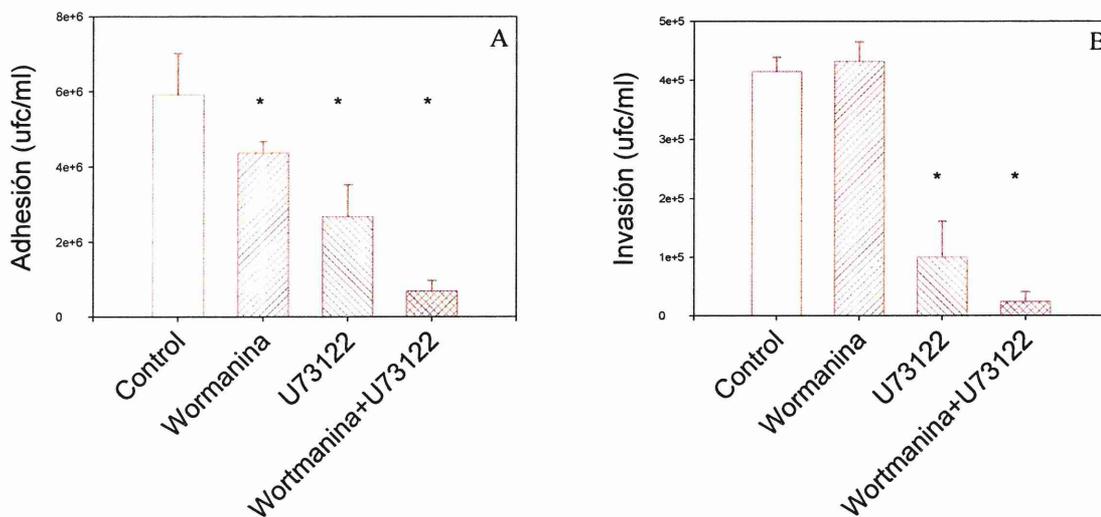


Figura 48: Estudio del efecto de la inhibición de PLC y Pi3K sobre la adhesión (A) e invasión (B) de la cepa T1 de *Bacillus cereus* a células Caco-2. La infección se realizó durante 1 hs a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Ensayo representativo de 3 experimentos independientes.
* = $p < 0.05$ respecto al control

IV. 2. E. 3. EFECTO DE INHIBIDORES DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN POR LÍPIDOS FOSFORILADOS SOBRE EL DESPRENDIMIENTO DE ENTEROCITOS LUEGO DE LA INFECCIÓN CON CEPAS DE *Bacillus cereus*

Respecto al desprendimiento de las células Caco-2 luego de ser infectadas con distintas dosis de la cepa T1 y en presencia de wortmanina, U73122 y la combinación de ambos inhibidores, puede observarse un efecto diferencial para cada tratamiento. Con una dosis de 1.5×10^8 ufc/ml el control sin inhibidores presentó un desprendimiento total de las células, al igual que las células infectadas en presencia de wortmanina. En cambio el U73122 o ambos inhibidores juntos, dejan un remanente de células adheridas a la placa de incubación (Figura 49). Para una dosis de 1×10^8 ufc/ml se observa muy poco desprendimiento en todas las muestras, aunque nuevamente

el U72122 y la combinación de los dos inhibidores deja más células adheridas.

Las células tratadas con una dosis de 5×10^7 ufc/ml no alteran la monocapa respecto del control. Los enterocitos infectados con una dosis de 2×10^8 ufc/ml se desprenden con todos los tratamientos aunque la combinación de wortmanina y U73122 deja un pequeño remanente de células (Figura 49). Obsérvese que la monocapa tratada solo con DMEM permaneció intacta.

Cabe aclarar que, en las concentraciones ensayadas, los inhibidores no afectan la viabilidad de *B. cereus*.

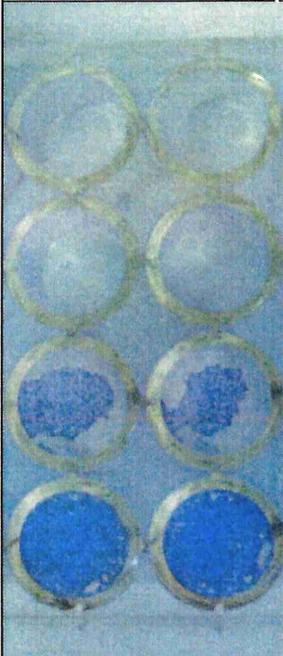
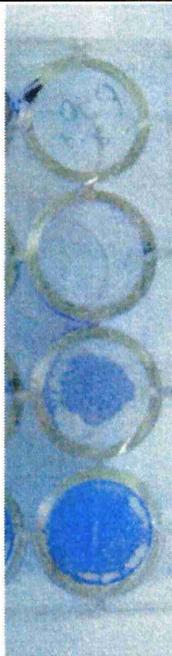
DMEM	Bacterias s/inhibidores	U73122 + Wortmanina	U73122	Wortmanina	Dosis (ufc/ml)
					2×10^8
					1.5×10^8
					1×10^8
					5×10^7

Figura 49: Placa de células Caco-2 de 15 días de crecimiento infectadas con distintas dosis de la cepa T1 de *Bacillus cereus* en presencia de los inhibidores: wortmanina, U73122 y la combinación de ambos durante 1 hs a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Experimento representativo de 3 experimentos independientes.

IV. DISCUSIÓN

IV. 2. ESTUDIO DE INFECCIÓN DE CELULAS EPITELIALES EN CULTIVO POR *Bacillus cereus*

La adhesión de microorganismos a células de epitelio intestinal humano está muy estudiada para géneros como *Escherichia*, *Salmonella* y *Shigella*, por ejemplo, pero no para el género *Bacillus* y menos aún para *B. cereus*. Si bien para este microorganismo se hallan estudios de adhesión de esporos a células epiteliales (Anderson, A.; et al. 1998^a) y de células vegetativas a células Caco-2, Hep-2 y HeLa (Rowan et al., 2001; Ramarao and Lereclus, 2006), la profundización de las investigaciones con las bacterias en forma vegetativa podría tener alta relevancia ya que son estas las que producirían las enterotoxinas *in situ* luego de que los esporos germinen en el tracto digestivo del hospedador (Anderson et al, 1998^a); además hay que considerar el efecto que la interacción directa bacteria-enterocito.

Un tema ampliamente estudiado para *B. cereus* es la producción de factores extracelulares que le confieren características particulares en cuanto a su capacidad patogénica, y que además, en este trabajo de tesis vimos cómo, en el caso de las cepas estudiadas, estos factores afectan la morfología y viabilidad de enterocitos humanos en cultivo.

Si a esto se suma que las cepas de *B. cereus* son capaces de asociarse a las células epiteliales en cultivo (ya sea por adhesión o adhesión e invasión) provocando distinto daño a los enterocitos, estamos ante una propiedad hasta ahora no descrita de este microorganismo que tendría alta relevancia en su capacidad patogénica.

La unión a receptores de la superficie apical ayudaría a los microorganismos a no ser eliminados del intestino y el contacto podría inducir

vías de señalización asociadas a esos receptores, provocando cambios en la morfología y función de las células eucarióticas.

Muchas bacterias patógenas adhieren a la superficie de la célula hospedador y permanecen localizadas extracelularmente. En cambio, para otros patógenos, la colonización de la capa epitelial es el inicio del proceso de invasión, siendo muchos de ellos internalizados por las células epiteliales aunque estas no sean consideradas células fagocíticas profesionales (Isberg, 1991). En el contexto de su existencia intracelular, las bacterias muestran mecanismos que han resultado de una selección evolutiva (Tran Van Nhieu and Sansonetti, 2000).

Las investigaciones referidas a la capacidad de invasión de las bacterias se han centrado en ciertos microorganismos como *Shigella flexneri* o *Salmonella typhimurium*, que se han constituido en modelos de estudio.

En este marco *B. cereus* no ha sido objeto de muchos estudios respecto a su capacidad de invasión, siendo el presente trabajo la primera demostración fehaciente de la capacidad invasiva.

Las condiciones experimentales utilizadas en el trabajo donde se informó por primera vez invasión de cepas de *B. cereus* a células Caco-2 (Rowan et al., 2001), no son comparables con las utilizadas en el presente trabajo.

En esta tesis, se establecieron condiciones estrictas para descartar artefactos y se corroboraron los resultados a través de estudios microscópicos. Se tuvo en cuenta la cantidad de bacterias resistentes a la

acción del antibiótico luego de la infección y se utilizaron células Caco-2 diferenciadas, ya que la expresión y localización de moléculas de superficie dependen del estado de diferenciación de los enterocitos (Guignot et al., 2001; Hess et al., 2001; Coconnier et al., 1994).

Las cepas de *B. cereus* evaluadas producen la infección de las células Caco-2 y el contacto directo bacteria-enterocito provoca el desprendimiento de la monocapa en función del tiempo de infección y de la dosis de microorganismos. Para evitar los daños producidos por el crecimiento de los microorganismos se utilizó con éxito un antibiótico bacteriostático (cloranfenicol) en los ensayos de infección.

Algunas de las cepas ensayadas son invasivas, ya que, luego del ensayo de protección con gentamicina, rendían valores significativamente superiores respecto a la cantidad de bacterias resistentes al tratamiento térmico. Además, la microscopía permitió determinar que las bacterias se encontraban en zonas internas de los enterocitos (Figura 29), dentro de vacuolas y en la zona basolateral (Figura 30).

La mayoría de las bacterias invasivas de células epiteliales lo realizan induciendo cambios en el citoesqueleto de la célula hospedador que resultan en la invaginación de la bacteria dentro de una vacuola (Isberg and Tran Van Nhie, 1994) (Golbert and Sansonetti, 1993). Luego, los microorganismos, según su comportamiento se pueden agrupar en 3 grupos: las que permanecen y se replican dentro de la vacuola como *Salmonella enterica*; las que se escapan de la vacuola pero permanecen en el citoplasma como *Shigella flexneri*; o los que escapan de la vacuola y de la célula para diseminarse sistémicamente como es el caso de *Yersinia*

enterocolitica (Salyers and Whitt, 2002^d). También hay otros microorganismos que son internalizados por células fagocíticas y proliferan en compartimientos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* (Henderson et al., 1999^e).

Las bacterias también pueden provocar daño al citoesqueleto a través de la utilización de otros mecanismos como pueden ser la adhesión a las células del hospedador (Bernet-Camard et al., 1996) o la acción de sus toxinas (Henderson et al., 1999^f).

En el presente trabajo se ha demostrado que *B. cereus* produce alteraciones en la red de actina a través de factores extracelulares y también por medio de la interacción bacteria-enterocito. La infección de los enterocitos con los bacilos, provoca una redistribución de la red de actina (Figura 39 y 41) que comienza 30 minutos después de iniciada la infección (Figura 43) y que colocaliza con las bacterias (Figura 41). Este efecto parece no tener relación exclusiva con la capacidad invasiva de las cepas, ya que la cepa B10502 (considerada no invasiva según este estudio) tiene el mismo efecto sobre el citoesqueleto. Sin embargo, sería necesario el contacto de los bacilos con los enterocitos, ya que cuando se realizaron los experimentos con el medio de infección solo (previamente filtrado) no se observaron diferencias con el control tratado con medio DMEM solo (Figura 44).

En la bibliografía encontramos ejemplos de bacterias no invasivas que modifican el citoesqueleto como es el caso de *E. coli* enteropatogénica (EPEC), que provoca una desorganización de la red de actina que da como resultado la aparición en la superficie apical de una estructura similar a un pedestal al cual la bacteria permanece adherida mientras dura la infección (Goosney et al., 1999).

Respecto a la invasión de células no fagocíticas, los microorganismos inducen su ingreso mediante mecanismos dependientes de actina que requieren que la bacteria induzca la polimerización y rearrreglos de los microfilamentos de actina (McCallum y Theriot, 2000; Henderson et al., 1999^e).

Entonces las preguntas serían ¿Cómo hace *B. cereus* para inducir los cambios en el citoesqueleto? ¿Cómo se inicia el proceso de infección?.

El comienzo de la infección requiere la adhesión bacteriana a los enterocitos y para ello necesitan estructuras específicas para unirse.

La célula hospedadora posee varios sitios y estructuras que pueden funcionar adecuadamente como receptores de las bacterias.

Los receptores pueden ser glicolípidos, fosfolípidos, glicoproteínas, proteínas de la membrana y componentes de la matriz extracelular (MEC) como colágeno, fibronectina, fibrinógeno, elastina, vitronectina, laminina, proteoglicanos o glucosaminoglicanos (Henderson et al., 1999⁵; Preissenr and Chhatwal, 2000). También pueden actuar como receptores hormonas, inmunoglobulinas, citoquinas y receptores que intervienen en la unión con otras células o con la MEC, como integrinas, cadherinas, selectinas (Henderson et al., 1999^d), ICAM-1, DAF y CEACAM (Hudault et al., 2004; Peiffer et al., 1998; Servin, 2005).

La unión de los microorganismos a estos receptores, puede producir alteraciones morfológicas o funcionales en las células del hospedador mediante la transducción de señales.

La ubicación de los receptores puede ser apical o basolateral, o variar de acuerdo a la etapa de crecimiento.

En células de epitelio intestinal polarizadas, la actina del citoesqueleto y las proteínas asociadas son esenciales para el mantenimiento de la

organización estructural y la funcionalidad de muchos componentes relacionados a la membrana tanto en la zona apical como basolateral. La alteración de esta red está asociada al efecto de muchos microorganismos productores de diarrea (Fath et al., 1993) y podría facilitar el acceso de los microorganismos a la zona basolateral.

Dentro de los receptores ubicados en el polo basolateral de las células y que podrían intervenir en la asociación de las bacterias con la célula hospedadora, se encuentran las integrinas y cadherinas, que a su vez tiene relación con la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular (MEC).

Las integrinas se expresan en el borde apical de las células no diferenciadas, pero luego en células diferenciadas sufren una redistribución ubicándose en la zona basolateral (Coconnier et al., 1994). En células Caco-2, la expresión de integrinas α_2 , α_3 , y β_1 es más alta en células no diferenciadas, que en células diferenciadas (Hess et al., 2001).

La bibliografía da cuenta de varios ejemplos de microorganismos que se unen a este tipo de receptores. Por ejemplo, *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* poseen una invasina que reconoce β -integrinas (Salyers and Whitt, 2000^d).

Las cadherinas son estructuras transmembrana dependientes de calcio unidas a tres proteínas citoplasmáticas llamadas cateninas (α , β , γ) (Henderson et al., 1999^b).

Ciertas bacterias como *Listeria monocytogenes* se unen a cadherinas y logran de esta manera el ingreso al interior de la célula hospedador; allí proliferan y pueden invadir las células vecinas. Para unirse a las cadherinas esta bacteria posee una proteína (InlA), y a su vez esta interacción provoca la polimerización de la actina del

citoesqueleto (Pizarro-Cerdá and Cossart, 2004).

Las moléculas de la superficie bacteriana (ligandos) que intervienen en el proceso de asociación con las células del hospedador, se conocen como adhesinas. Entre ellas se encuentran las lectinas, los ácidos lipoteicoicos, ácidos teicoicos, lipopolisacáridos, proteínas y carbohidratos que se encuentran sobre estructuras que están involucradas en la adhesión, como pared celular, cilias, fimbrias, flagelos y capa S (Henderson et al., 1999^d).

Los ácidos lipoteicoicos son importantes en la adhesión de bacterias Gram positivas como *Streptococcus pyogenes* o *Staphylococcus epidermidis*. Para estos microorganismos el receptor es una glicoproteína producida por varios tipos de células, entre ellas las células epiteliales.

Asimismo, muchos de los lípidos y glicolípidos presentes en la membrana plasmática contienen estructuras moleculares que son reconocidas como sitios de adhesión de bacterias (Henderson et al., 1999^d).

La asociación de las cepas de *B. cereus* estudiadas a enterocitos humanos en cultivo y su efecto biológico tendría relación con la viabilidad de las bacterias y no estaría relacionada con componentes de superficie termolábiles, de origen glucídico o proteico (Figura 34 y Tabla 9).

La participación de moléculas unidas débilmente a la superficie bacteriana (Vaughan and Gomal, 1995) tendría relación con la adhesión de algunas cepas, dos de ellas de particular interés para los estudios de invasión: 2 y T1 (Figura 34 y Tabla 9).

Respecto a la implicancia de moléculas no unidas covalente, solo se observó en dos cepas (Figura 34 y Tabla 9).

Estos resultados estarían demostrando que no existiría un sólo tipo de estructura funcional relacionada con la asociación para todas las cepas, y quizás para una misma cepa existan varios tipos de ligandos y receptores involucrados, como podría ser el caso de la cepa 2, que dio positivo para 2 tipos de moléculas (Tabla 9).

La capa-S es la estructura más externa de muchas bacterias Gram positivas y negativas y está compuesta de proteínas o glicoproteínas con una masa molecular entre 40 y 170 KDa (Kadurugamuwa et al., 1998; Sleytr and Beveridge, 1999). Se le atribuyen muchas funciones como protección, tamiz molecular, participación en adhesión, y factor de virulencia (Sleytr and Beveridge, 1999). El tratamiento con LiCl es un procedimiento de rutina para extraer las proteínas de la capa-S de microorganismos (Garrote et al., 2004) y estudiar su participación en distintos procesos.

En *B. cereus*, se ha descrito la existencia de capa-S cuyas proteínas promueven la interacción con leucocitos humanos y con el hospedador, contribuyendo a su patogenicidad (Kotiranta et al., 1998). Mediante microscopía de transmisión (Figura 26 D), puede observarse una estructura externa de similares características a las mostradas para la capa-S de otras especies como lactobacilos (Garrote et al., 2004). Por lo tanto, la capa-S podría ser una de las estructuras involucradas en la interacción con enterocitos, ya que si bien la asociación no disminuyó al tratar los cultivos con enzimas (tripsina o quimiotripsina), para algunas cepas la asociación disminuyó la tratar los cultivos con LiCl (Figura 34 y Tabla 9).

Recordemos que la tripsina corta las cadenas polipeptídicas por el lado carboxílico de los residuos de arginina y lisina; y la quimiotripsina corta principalmente sobre el lado carboxílico de los residuos aromáticos y otros

residuos voluminosos apolares (Stryer, 1990). Para que esto ocurra, los sitios de acción deben tener la accesibilidad necesaria para que el pegado de la enzima sea efectivo y estereoespecífico (Polverino de Laureto et al., 1997). Esto es más difícil que ocurra en estructuras terciarias muy compactas (De Lorenzo et al., 1998), por lo tanto podría ser que el plegamiento de las proteínas de la capa-S o de otra estructura superficial no permitan el acceso de las proteasas a los sitios de corte y por lo tanto no se puede determinar de esta manera si están involucradas en la adhesión.

Respecto a los flagelos, éstos contribuyen a la virulencia de las bacterias con un rol primario en la adhesión y porque además podrían inducir respuestas inflamatorias (Ramarao and Lereclus, 2006). Para el grupo *B. cereus* se encontró que la adhesión depende de la presencia de un gen, *flhA*, que codifica un componente del aparato flagelar (Ramarao and Lereclus, 2006). Si bien los resultados del presente trabajo de tesis demuestran que la adhesión no es alterada por el tratamiento con tripsina y quimiotripsina, no podemos descartar la posibilidad de que los flagelos intervengan en el proceso de asociación.

Para que se lleve a cabo la interacción entre la bacteria y la célula hospedadora intervienen muchas fuerzas que dependen de la distancia que medie entre ellas (Henderson et al., 1999^d). Las fuerzas que intervienen cuando la distancia es más corta son las interacciones hidrofóbicas, los puentes iónicos (más específicamente catiónicos) y las interacciones ligando-receptor (Henderson et al., 1999^d).

El análisis de las características hidrofóbicas de las superficies bacterianas de las cepas ensayadas, no demostró relación entre esta propiedad y la asociación de las cepas de *B. cereus* a los enterocitos humanos en cultivo (Figura 33). Respecto a este

tema, la bibliografía da cuenta de resultados muy variados para esta especie. En aislados clínicos de *B. cereus* se ha encontrado una relación negativa entre la hidrofobicidad y la adhesión a una matriz de proteínas (Kotiranta et al., 1998). Otros estudios encontraron una relación positiva entre la hidrofobicidad superficial de esporos de *B. cereus* y la adhesión al vidrio (Blank and Henderson, 1992). También se observaron variaciones entre distintas cepas (Blank and Henderson, 1992). Considerando la edad de los cultivos (24 hs) de las investigaciones de Kotiranta y colaboradores (1998), es posible que las suspensiones bacterianas usadas por estos autores hayan contenido alta proporción de esporos.

Otro factor que está involucrado en la asociación es la dosis de microorganismos, observándose una saturación que comienza alrededor de 2×10^7 ufc/ml iniciales (Figura 31). Esto podría indicar que los sitios de asociación de *B. cereus* en el dominio apical se encuentran saturados, sugiriendo quizás la presencia de receptores específicos para adhesinas de *B. cereus* asociados al ribete en cepillo.

Dado que la curva se aplana a dosis altas se puede presuponer que no hay adhesión de las bacterias entre sí.

Otra posibilidad sería que durante el proceso de adhesión, las bacterias tengan una alta afinidad por las células a dosis bajas, y una afinidad baja para dosis altas, ya que se postula que a bajas dosis una bacteria adhiere al máximo número de sitios sobre la mucosa, en cambio a dosis altas el número de sitios de adhesión involucrados es mínimo (Lee, Y.; et al., 2000).

Los efectos observados en los enterocitos como consecuencia de la infección podría ser el resultado de una suma de eventos, ya que la observación de zonas con alta concentración bacteriana en estrecha relación con los enterocitos podría favorecer la creación

de microentornos con producción de factores biológicamente activos. En este ambiente también se verían favorecidos fenómenos de quórum sensing (Gominet; M., et al. 2001), que inducirían la expresión del regulador transcripcional pleitrópico, PlcR, implicado en la capacidad citotóxica del grupo *B. cereus* (Ramarao and Lereclus, 2006).

Cuando la bacteria entra en contacto con las células del hospedador, los factores extracelulares podrían ser translocados a través de la membrana de la célula eucariótica mediante una serie de sistemas de secreción equivalentes a los que han sido estudiados en microorganismos Gram negativos, como el sistema de secreción tipo III (Schesser et al., 2000; Jacob-Dubuisson et al., 2001; Plano et al., 2001; Sandkvist, 2001). Este sistema es altamente conservado, mediado por contacto con la célula del hospedador (Finlay and Falkow, 1997) y libera los factores de virulencia dentro de las células del hospedador por secreción a través de la membrana externa y por translocación a través de la membrana citoplasmática (Schesser et al., 2000).

En las bacterias Gram positivas se halla descrito un mecanismo de secreción que podría ser el equivalente al sistema de secreción tipo III de los gérmenes Gram negativos. Se ha encontrado en *Streptococcus pyogenes* que la estreptolisina O, proteína perteneciente a la familia de las citolisinas que se unen a colesterol, podría mediar la inyección de proteínas efectoras dentro de las células del hospedador a través del poro producido por este tipo de toxinas (Madden et al., 2001). Dado que las bacterias Gram positivas no poseen membrana externa, la inyección de proteínas dentro de la célula del hospedador podría ser mediada por toxinas formadoras de poro (Madden et al., 2001).

Basándonos en los hallazgos de estos investigadores, podríamos sugerir que la translocación mediada por citolisinas es un mecanismo general para bacterias Gram positivas ya que existe un alto grado de conservación entre las secuencias de las toxinas pertenecientes a la familia de las citolisinas que se unen a colesterol provenientes de microorganismos diferentes: tienen una porción 100% conservada en todas las citolisinas dependientes de colesterol y se encuentran porcentajes de homología e identidad muy altos como por ejemplo 98 % entre cereolina O y antrolisina O de *B. anthracis* (Shannon et al., 2003).

Dado que *B. cereus* es capaz de producir cereolisina O, una proteína tiol activada perteneciente al mismo grupo que la estreptolisina O (Henderson et al., 1999^f) podríamos considerar que el contacto de la bacteria con los enterocitos podría incrementar la virulencia de las cepas de *B. cereus* a través de la inducción de una cascada de señales por creación de microentornos con alta concentración de factores tóxicos que a su vez podrían ser translocados dentro de la célula a través de poros generados en la membrana citoplasmática. También la interacción de los bacilos con receptores de superficie de la célula eucariótica podría inducir vías de señalización.

Respecto a las vías de señalización implicadas, en el presente trabajo de tesis se demuestra que las vías de lípidos fosforilados son de fundamental importancia.

En la bibliografía se encuentran varios ejemplos de microorganismos invasivos que inducen señales por vías relacionadas con lípidos fosforilados y que permitirán discutir los resultados encontrados con las cepas estudiadas.

Un ejemplo conocido es *Shigella flexneri* que utiliza la vía de los lípidos fosforilados para favorecer su internalización en células no fagocíticas

(Pizarro-Cerdá and Cossart, 2004). Este microorganismo induce la entrada de distintos efectores dentro de la célula mediante un sistema de secreción tipo III. Algunos de estos efectores son IpaC e IpgD. IpaC directamente interactúa con las proteínas del citoesqueleto e IpgD (un efector tipo fosfatasa) modifica el metabolismo de fosfatidilinositol para favorecer su internalización. Este efecto sería posible ya que disminuye la concentración de PiP_2 , quien es responsable de las uniones focales entre la membrana plasmática y el citoesqueleto; también por regular enzimas como gelsolina o cofilina que actúan sobre la polimerización de la actina.

IpgD también induce Cdc42 y Rac facilitando las modificaciones del citoesqueleto. Esta suma de eventos facilitaría la extensión de filopodios que permiten la invaginación de *S. flexneri* (Pizarro-Cerdá and Cossart, 2004).

Otro microorganismo que utilizan esta vía para translocar al interior de las células es *Yersinia spp* (Pizarro-Cerdá and Cossart, 2004).

Las especies de *Yersinia* se unen mediante una invasina proteica de la membrana externa a receptores tipo β -integrinas: esto induce la activación de Rac1, que concentra Pi5K en el sitio de invasión, lo que da como resultado un aumento de PiP_2 y la translocación de proteínas unidas a PiP_2 que están involucradas en el control de la polimerización de actina, necesaria para la invasión (Pizarro-Cerdá and Cossart, 2004).

También hay microorganismos no invasivos que afectan los fosfolípidos translocando efectores dentro del hospedador como es el caso de *E. coli* enteropatogénica (EPEC): inhibe la actividad de Pi3K para evitar su internalización en macrófagos (Pizarro-Cerdá and Cossart, 2004). Esta bacteria además de activar la vía de PLC para lograr la alteración de las uniones

estrechas a través de la fosforilación de la cadena liviana de miosina (MLC), también activa directamente NF- κ B (Goosney et al., 1999).

¿Cómo se relaciona la activación de esta vía con el citoesqueleto?

Comprender esto ayudará a la discusión de lo observado con las cepas de *B. cereus* estudiadas.

La acción de la fosfolipasa C (PLC), sobre el fosfatidilinositol difosfato (PiP_2) da dos productos: diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3) (Figura 47). El DAG activa proteína quinasa C (PKC), y el IP_3 se une a receptores de membranas de reservorios intracelulares del ion Ca^{+2} , activando canales, lo que provoca el aumento de la concentración intracelular de Ca^{+2} (Krauss, 1999; Henderson et al., 1999^c; MacMillan et al., 2005). Este Ca^{+2} regula proteínas involucradas en el proceso de polimerización de actina, ya que se une a proteínas como α -actinina y calmodulina determinando la despolimerización (Krauss, 1999). El complejo Ca-calmodulina (CaM) activa kinasas que estimulan varios procesos, entre ellos la apoptosis (Henderson et al., 1999^c).

Paralelamente, la PKC (que fue activada por DAG) tiene, entre otros sustratos, a las kinasas Raf que dirigen la activación de las MAPK, y a varias proteínas del citoesqueleto involucradas en la organización de la actina (Henderson et al., 1999^c).

El primer compuesto de la vía de los lípidos fosforilados es $\text{Pi}(4)\text{P}$ (Figura 47), que junto con $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$ son los principales fosfoinosítidos asociados a los rearrreglos que se producen en la actina para permitir la fagocitosis (Yin and Janmey, 2003; Defacque et al., 2002; Caroni, 2001). Para esto no sólo es necesaria la unión de $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$ a la membrana, sino también a proteínas asociadas al citoesqueleto como ezrina y moesina, que pertenecen a la familia de proteína ERM (ezrina, moesina y

radixina) que son capaces de unirse simultáneamente a actina y PiP_2 (Defacque et al., 2002).

El aumento de la concentración de PiP_2 en la membrana plasmática siempre está acompañado de un aumento de fosfatidilinositol 5-kinasa (Pi5K) que es la enzima que convierte Pi(4)P en Pi(4,5)P_2 (Figura 47). A su vez el aumento de Pi5K está relacionado con proteínas GTPasas: Rho, Rac y Arf (Yin and Janmey, 2003; Caroni, 2001).

Las proteínas Rho estimulan la formación de fibras de stress (Henderson et al., 1999^c) y se ha encontrado que su unión a Pi5K está relacionada con un aumento de la concentración de la enzima en la membrana, que a su vez conlleva un aumento de las fibras de stress, dependiente de una Rho kinasa (Yin and Janmey, 2003).

Las proteínas Rac no actuarían directamente sobre Pi5K, sino que ayudarían a su reclutamiento a través de Rho (Yin and Janmey, 2003).

De lo expuesto hasta aquí, respecto a la vía de los lípidos fosforilados, se puede concluir que existen varios puntos de la cadena de reacciones que tienen relación con proteínas de citoesqueleto.

En el caso particular de las cepas de *B. cereus* estudiadas, la utilización de inhibidores de algunas de las enzimas implicadas en esta vía, permitió obtener información muy valiosa, ya que la reorganización de la actina no se visualizó en presencia de U73122, dantroleno y estaurosporina. Todos estos compuestos inhiben algunas de las reacciones en la vía de fosfatidilinositolfosfato (PiP) (Tabla 10).

Como ya postulamos anteriormente, la activación de la vía de señalización podrían ser el resultado de la unión de los bacilos a un receptor de la membrana o por inyección de uno o

varios efectores dentro de la célula, como lo hacen otros microorganismos (Pizarro-Cerdá and Cossart, 2004). La generación de microentornos en la zona de adhesión también podría facilitar la acción directa de las toxinas bacterianas sobre receptores de la superficie apical de los enterocitos.

Los posibles receptores implicados en la transducción de señales serían aquellos relacionados con activación a través de proteína G, o relacionados a tirosín kinasas (Schmolke et al., 2008; Stryer, 1990). Este último tipo de receptores parecen no estar implicados en el caso de las cepas en estudio, ya que el efecto sobre el citoesqueleto persistió en presencia de genisteína (Figura 46), un inhibidor de tirosín quinazas.

Dentro de los factores extracelulares de *B. cereus* relacionados con el síndrome emético se encuentran las fosfolipasas C (PLC) (Beecher et al., 1995; Beecher et al., 2000; Granum and Nissen, 1993).

Las fosfolipasas provenientes de distintos microorganismos comparten muchas similitudes, pero una característica de las PLC del género *Bacillus* es su capacidad de interactuar con proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Zenewicz, 2005). Las enzimas bacterianas al actuar sobre la proteína anclada a GPI, produciría el mediador en la señalización (Lehto and Sharom, 1998).

Otras toxinas del género *Bacillus*, como las toxinas Cry de *B. thuringiensis*, utilizan como receptores a varias proteínas ancladas a GPI (Fernandez et al., 2006).

Una característica particular de las proteínas ancladas en GPI es que se ubican en sectores de la membrana plasmática ricas en esfingomielina y colesterol (rafs lipídicos), que intervienen en la transducción de señales y que pueden ser extraídas de la

membrana celular con β -ciclodextrina (Lehto and Sharom, 1998).

En las células Caco-2 las proteínas unidas a GPI están asociadas al ribete en cepillo (Guignot, J., et al. 2001), lo que se puede relacionar con la hipótesis planteada anteriormente de que la generación de microentornos favorezca la acción directa de las toxinas sobre receptores de esa zona.

De acuerdo a los resultados del presente trabajo, la participación de receptores situados en rafts lipídicos no parece tener importancia en la virulencia de *B. cereus*, ya que no se observaron cambios en el daño del citoesqueleto cuando se usó β -ciclodextrina (Figura 46), pero se podría considerar la posibilidad de que en los enterocitos los rafts se hallen protegidos de la acción de las β -ciclodextrinas, como ocurre en los rafts donde se encontraría PiP_2 (Caroni, 2001).

En el caso de los rafts donde se encuentra PiP_2 , estas regiones de la membrana plasmática estarían reguladas por unas proteínas (GAP43-like proteins) que le conferirían cierta resistencia contra la dispersión que le podrían provocar drogas que extraen el colesterol como las ciclodextrinas (Caroni, 2001). A su vez, estas proteínas estarían reguladas por el complejo CaM y PKC, lo que constituiría la unión entre la señal externa y las plataformas de PiP_2 (Caroni, 2001). La ubicación de PiP_2 en esas plataformas le permitiría promover el aumento y la activación de componentes específicos de la señalización en la membrana celular (Caroni, 2001).

Esta unión entre PiP_2 , CaM y PKC podría tener relación con el efecto inhibitorio de U73122 observado sobre la acción de la infección de *B. cereus* sobre el citoesqueleto (Figura 46). Al inhibirse la producción de DAG e iP_3 , por inhibición de la PLC (el U73122 es un inhibidor de la PLC (Tabla 10)) no

se formaría el complejo CaM y tampoco se activaría la PKC. De esta manera no se estaría efectuando el control positivo de las proteínas que regulan los rafts lipídicos sobre la que se encuentra PiP_2 . Esta falta de regulación afectaría la unión de PiP_2 a las proteínas del citoesqueleto, lo que impediría los rearrreglos de actina. El resultado final sería una disminución del daño del citoesqueleto.

Además otro elemento que fundamenta esta suposición es que se observó el mismo efecto cuando se realizó la infección en presencia de dantroleno (inhibidor de la movilización de calcio de los reservorios intracelulares (Tabla 10)) y de estaurosporina y calfofina, que son inhibidores de la activación de PKC (Tabla 10).

La translocación de factores extracelulares bacterianos al citosol podría también activar la vía de los lípidos fosforilados, y se podría considerar que la PLC bacteriana es quien simula el efecto de la PLC endógena. Pero esto no parece conciderarse con los resultados obtenidos, ya que la PLC de *B. cereus* no es inhibida por U73122 (Schmolke, 2008). O sea que si este fuera el mecanismo de acción no se hubiese observado una inhibición del daño sobre el citoesqueleto en presencia del inhibidor de la PLC.

Hasta aquí sólo consideramos una parte de la vía de fosfatidilinositolfosfato estudiada (Figura 47).

Paralelamente a la acción de la PLC sobre el PiP_2 , existe otra enzima, Pi3K que también actúa sobre este sustrato dando como producto PiP_3 que activa PKB. La activación de este compuesto está relacionada con la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis (Kraus, 1999).

En células Caco-2 se encontró que esta enzima (Pi3K) estaba relacionada

con la desorganización de las uniones estrechas que provocaba el estrés oxidativo y que a su vez esto tenía relación con la fosforilación de tirosina de ocludinas (Sheth, P. 2003). La implicancia de receptores que fosforilen tirosina ya la habíamos considerado poco probable dada la falta de inhibición con genisteína.

Según los resultados obtenidos luego de utilizar wortmanina en los ensayos de infección, podemos inferir que Pi3K está implicada en la cadena de señalización de los lípidos fosforilados en enterocitos humanos en cultivo, inducida por la infección de *B. cereus*. Los datos que avalan esta hipótesis son la inhibición del daño al citoesqueleto de células Caco-2 luego de la infección (Figura 46) y la disminución de los valores de asociación de los bacilos a las mismas células sumado a un efecto sinérgico con U73122 (Figura 48 A).

Respecto a la posibilidad de que en la invasión de las cepas estén implicados receptores que implican activación de Pi3K, queda descartada por los resultados de los ensayos de invasión realizados en presencia de wortmanina. Tal como se mostró en la figura 48 B, la wortmanina no inhibe la invasión de células caco-2 por la cepa T1 de *B. cereus*.

Además también parecería que esta cadena de reacciones no tiene relación con la desestabilización observada de las uniones célula-célula, ya que no hubo diferencias entre el desprendimiento de enterocitos luego de la infección y las células tratadas con wortmanina (Figura 49).

El efecto inhibitorio de la wortmanina que se observó sobre la adhesión podría tener relación con otros receptores que serían distintos a los activados por PLC, ya que encontramos un efecto sinérgico con U73122. En el caso de células endoteliales, se ha observado que Pi3K está relacionada

con la inducción de moléculas de adhesión (Pellegatta et al., 1998).

Esto se puede relacionar con el aumento en la adhesión que se observó cuando se coincubaron una cepa no invasiva con sobrenadante de una cepa invasiva durante el ensayo con las células epiteliales (Figura 36). En cambio no se observaron diferencias en los valores de invasión (Figura 36).

Para que se produzca la internalización de un microorganismo dentro de una célula se requiere una compleja cadena de eventos, por lo tanto resultaría difícil que la sola incubación con factores extracelulares provenientes de una cepa invasiva, podría haber cambiado la condición de “no invasiva” de la cepa estudiada. Pero cuando la cepa es capaz de invadir, sus factores extracelulares podrían intensificar las señales que llevan a la invasión (Figura 35).

La exportación de receptores de adhesión también puede estar relacionada con la activación de otras vías de señalización.

La listeriolisina O (LLO), una proteína multifuncional producida por *Lysteria monoyitogenes*, además de otras funciones, activa varias vías de señalización dentro de las células del hospedador, como por ejemplo la vía de quinasas de proteínas mitógeno activadas (MAPK) y el factor nuclear (NF- κ B) (Tang et al., 1998). Esto puede resultar en la expresión específica de moléculas de adhesión (Dramsai and Cossart, 2003).

Otros microorganismos como *B. vulgatus* inducen la expresión del gen de ICAM-1 a través de una vía de señalización que implica NF- κ B que es inhibida por wortmanina (Haller et al., 2002).

Los datos bibliográficos sumados a la observación de que la infección de *B. cereus* a células Caco-2 activa la vía de MAPK (Medrano, M. comunicación personal), permiten suponer la hipótesis

de la expresión de receptores de adhesión inducidos por el contacto bacteria-célula.

Hasta aquí los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten suponer que la adhesión de *B. cereus* a enterocitos humanos en cultivo activa la vía de los lípidos fosforilados por acción directa de bacterias, toxinas y/o translocación de factores extracelulares al citosol. Esto produce una alteración en el citoesqueleto que se puede relacionar directamente con los resultados observados.

La desorganización de la red de actina está implicada en la endocitosis de microorganismos a través de varios mecanismos. Uno de ellos se conoce con el término “zipper” (McCallum y Theriot, 2000).

Este término hace referencia a la habilidad de la bacteria de producir cambios a nivel local, en la organización de la actina, que da como resultado una yuxtaposición entre la bacteria y la membrana plasmática del hospedador. La bacteria parece sumergirse dentro de la célula o estirar la membrana plasmática a su alrededor (McCallum and Theriot, 2000).

Otros microorganismos son capaces de internalizar células epiteliales por un mecanismo similar a “zipper”, pero que no depende de la movilización de F-actina (Kansau, et al. 2004). En el caso de *E. coli* con adhesina Afa Dr positiva se encuentran extensiones de las microvellosidades, que emanan de la célula y envuelven a las bacterias y en internalización estarían implicados los microtúbulos (Kansau, et al. 2004).

Si se observan las imágenes de microscopía obtenidas con nuestras cepas, en algunas de ellas se observan estructuras de similares características a las observadas por los investigadores citados anteriormente (Figura 23 F), sugiriendo que este podría ser un mecanismo posible de internalización de *B. cereus*.

Además, el ribete en cepillo se observó alterado con otras características. En algunos casos de infección las microvellosidades se encuentran más cortas que en el control o directamente han desaparecido (Figura 26). En otros estudios, en las células infectadas, se visualizaron estructuras compatibles con la presencia de restos de enterocitos adheridos a la superficie del bacilo, que también se hallan sobre la superficie celular, específicamente sobre el ribete en cepillo. Estos restos se observaron tanto en microscopía de transmisión como de barrido.

Basados en los trabajos de Bernet-Camard y col. (Bernet-Camard et al., 1996) podríamos pensar que las formaciones observadas en la superficie celular bacteriana y eucariótica podrían ser restos de ribete en cepillo. Este grupo de investigadores observó estas formaciones luego de la infección de células con *E. coli* que provocó un daño al ribete en cepillo similar al observado con nuestras cepas. Si bien no hemos confirmado el origen de dichos restos, los mismos no se observan en las bacterias adheridas al vidrio (Figura 24).

Al igual que en el daño del citoesqueleto, el daño del ribete en cepillo colocaliza con las bacterias y existe un estrecho contacto entre las bacterias y el ribete en cepillo (Figura 23). Esto podría tener dos explicaciones: es un efecto producido por la asociación de las bacterias, o bien las bacterias se adhieren a zonas donde el ribete en cepillo ha sido previamente dañado.

Algunos autores postulan que la desorganización de la red de actina del citoesqueleto, inducida por la unión de la bacteria a un receptor de la membrana plasmática, induce el daño observado en el ribete en cepillo (Bernet-Camard et al., 1996; Peiffer et al., 1998). Esta hipótesis la postularon para *E. coli*

difusamente adherente (DAEC según sus siglas en inglés) que no es invasiva, pero dado que la adhesión es el primer paso en la infección, esto podría ser válido también para microorganismos invasivos. Por lo tanto podría ser válida la explicación que las bacterias son las que provocan el daño en el ribete en cepillo, luego de unirse a un receptor y desencadenar la desorganización en el citoesqueleto.

Así como la alteración de la red de actina de traduce en cambios en la superficie apical de los enterocitos que permiten la endocitosis de microorganismos, también se puede producir una distorsión de las uniones estrechas que facilitaría la invasión por la vía paracelular.

Los resultados obtenidos permitirían postular la hipótesis de que las cepas de *B. cereus* utilizarían también esta vía para acceder al interior de los enterocitos, ya que en estudios de infección sin calcio, los valores de invasión han resultado significativamente más altos que en medio de infección con calcio (Figura 37).

Cuando se utilizó medio de infección libre de calcio, las células se preincubaron 1 hs con dicho medio. Esto produce la apertura reversible de las uniones estrechas entre los enterocitos, exponiendo la superficie lateral de los mismos (Wells et al., 1996).

Además se encontró que las cepas de *B. cereus* presentan valores de asociación e invasión significativamente más altos cuando las células epiteliales no están diferenciadas (células de 4 días de cultivo) respecto a células de 15 o 21 días de cultivo (Figura 38).

Estos resultados, analizados conjuntamente, nos pueden dar idea de que la internalización de las bacterias está relacionada con la zona basolateral de los enterocitos y que los bacilos podrían unirse a receptores tipo

integrinas o cadherinas, sin descartar la posibilidad que existan allí otros factores que favorezcan la internalización. Además recordemos, que mediante microscopía se observó a las bacterias en esa zona (Figura 30).

También el dato del aumento de la asociación a células no diferenciadas resulta de interés, ya que esto podría ser un indicio de que los microorganismos tendrían un tropismo hacia las criptas de las vellosidades donde las células no están diferenciadas (Wu et al., 1992). Asimismo podría relacionarse con los receptores ICAM-1, considerados anteriormente como posibles receptores exportados a la superficie apical. Estos receptores se han encontrado expresados en mayor medida en células no diferenciadas y podría ser una respuesta a la invasión de patógenos, a un proceso inflamatorio o a ambos (Huang et al., 1996).

Las cepas ensayadas también producen una alteración en la estructura de la membrana plasmática, aumentando la permeabilidad de la misma, cuya consecuencia final en la necrosis celular (Figura 45). Este efecto podría estar relacionado con la formación de poros por citolisinas tiol activadas que constituirían la puerta de entrada de efectores al citosol de los enterocitos.

En resumen, los datos presentados demuestran que las cepas de *B. cereus* son capaces de adherir e invadir enterocitos desencadenando profundos cambios en las células infectadas.

Dado que el primer paso en la infección, es la adhesión, los bacilos, a través de ligandos de diversa naturaleza se unirían a receptores ubicados sobre la superficie de los enterocitos. Para que esto se produzca es necesaria la viabilidad de las bacterias.

Podrían unirse a varios tipos de receptores como por ejemplo a los pertenecientes al grupo de las proteínas ancladas a GPI y desencadenar una serie

de señales intracelulares activando la vía de los lípidos fosforilados.

Además los bacilos podrían inducir vías de señalización a través de alguno de sus factores extracelulares, ya sea por acción directa sobre la superficie apical de los enterocitos o por translocación al interior de la célula, a través de un sistema similar al sistema de secreción tipo III de las bacterias Gram negativas. La formación de poros en la membrana aumentaría la permeabilidad de la misma, llevando a las células finalmente a necrosis.

Además de la vía de los lípidos fosforilados, *B. cereus* también podría activar la vía de MAPK y NF- κ B.

La utilización de las vías de señalización de los enterocitos desencadena la alteración del citoesqueleto y en consecuencia del ribete en cepillo, lo que favorecería la

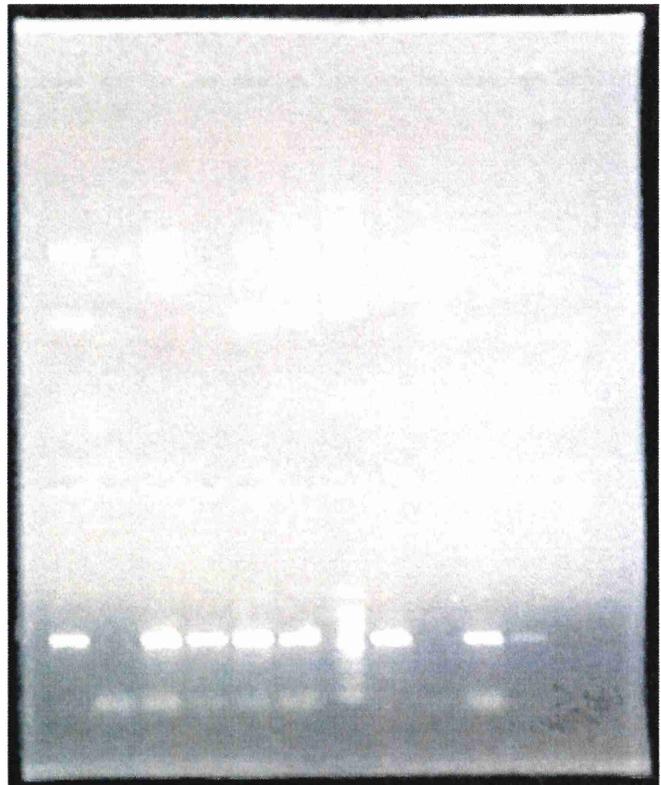
formación de estructuras como las denominadas "zipper" o "similares a zipper", que internalicen a las bacterias mediante endocitosis. También se produciría la distorsión de las uniones estrechas, lo que permitiría a las bacterias invadir por la vía paracelular.

La importancia de los resultados obtenidos, es la demostración que este microorganismo, no solo daña las células epiteliales a través de sus factores extracelulares, sino también por el contacto directo bacteria-célula, siendo capaz de desencadenar señales en las células infectadas.

La demostración que el contacto directo bacteria-enterocito produce profundos cambios en las células eucarióticas, constituye un aporte de altísima relevancia en el contexto de la infección intestinal por este patógeno.



3. ANÁLISIS MULTIVARIADO DE FACTORES DE VIRULENCIA



IV. RESULTADOS

IV. 3. ANALISIS MULTIVARIADO DE LAS CEPAS DE *Bacillus cereus*

IV. 3. A. RIBOTIPIFICACIÓN

La ribotipificación se efectuó sobre 21 cepas de *Bacillus cereus* y al efectuar el agrupamiento según el coeficiente de Dice se encontraron 2 grupos: A (incluye 3 cepas) y B (incluye 18 cepas); a su vez este último grupo, tiene un subgrupo, B*.

El grupo A se une al grupo B a un valor de similitud de 60%. El grupo B contiene cepas que se agrupan a un valor de 65% de similitud. Finalmente, el grupo B* está compuesto por cepas que se agrupan con un valor de 83% de

similitud. Estos grupos provienen de 16 perfiles diferentes ya que hubo tres grupos de cepas con perfiles idénticos (Figura 50):

- 273 y A7
- ATCC 13061, 93 y 124
- 113, 114 y ATCC 10876).

Los coeficientes más altos están dados por la agrupación de las cepas 273 y A7 con 123 en un valor de 93.3; y con un valor de 92.3 la agrupación de las cepas 113, 114 y ATCC 10876 con T1.

IV. 3. B. P.C.R.

Se analizaron 12 genes asociados a

factores de virulencia de *B. cereus* (Tabla 11).

Tabla 11: Análisis mediante PCR de las cepas de *Bacillus cereus*. Referencias: pb (pares de bases)

Cepa	Gen											
	<i>entS</i>	<i>entFM</i>	Complejo <i>nhe</i>			<i>sph</i>	Complejo <i>hbl</i>				<i>piplC</i>	<i>bceT</i>
			<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>		<i>hblA</i>	<i>hblB</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>		
2	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
114	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
273	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
253	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
124	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
123	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B10502	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
T2	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
113	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
E2	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
M2	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
3	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Watertown	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
313	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
M845	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
A7	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
M74	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
93	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
ATCC 13061	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
ATCC 10876	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tamaño de productos (pb)	581	1269	499	769	581	558	1154	2684	740	829	569	428

Coefficiente de similitud

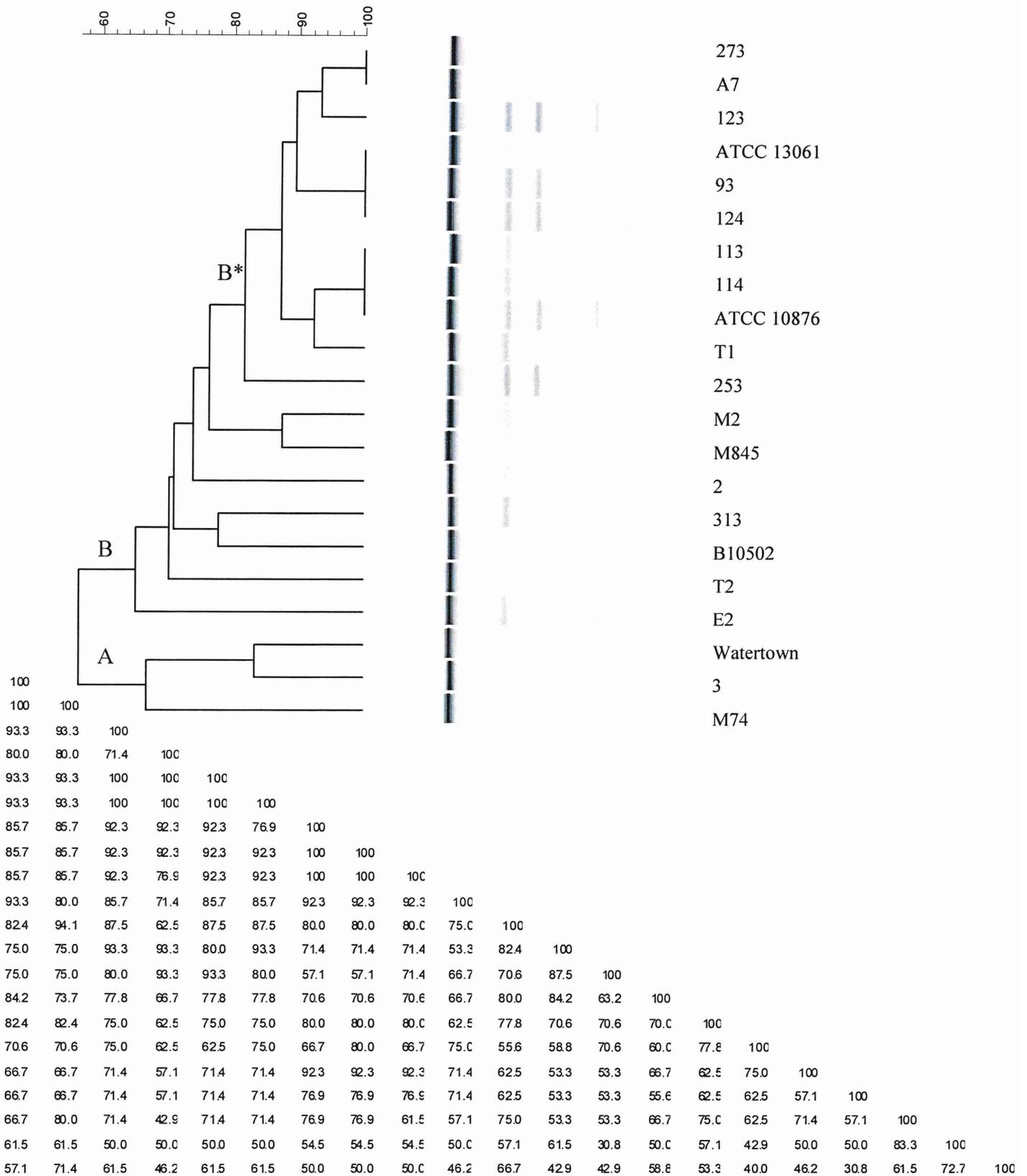


Figura 50: Patrones genotípicos en base a ARNr y análisis por grupos de las cepas de *B. cereus* estudiadas. Los dendrogramas fueron generados mediante ligamiento promedio (UPGMA) basado en el coeficiente de Dice.

IV. 3. Resultados

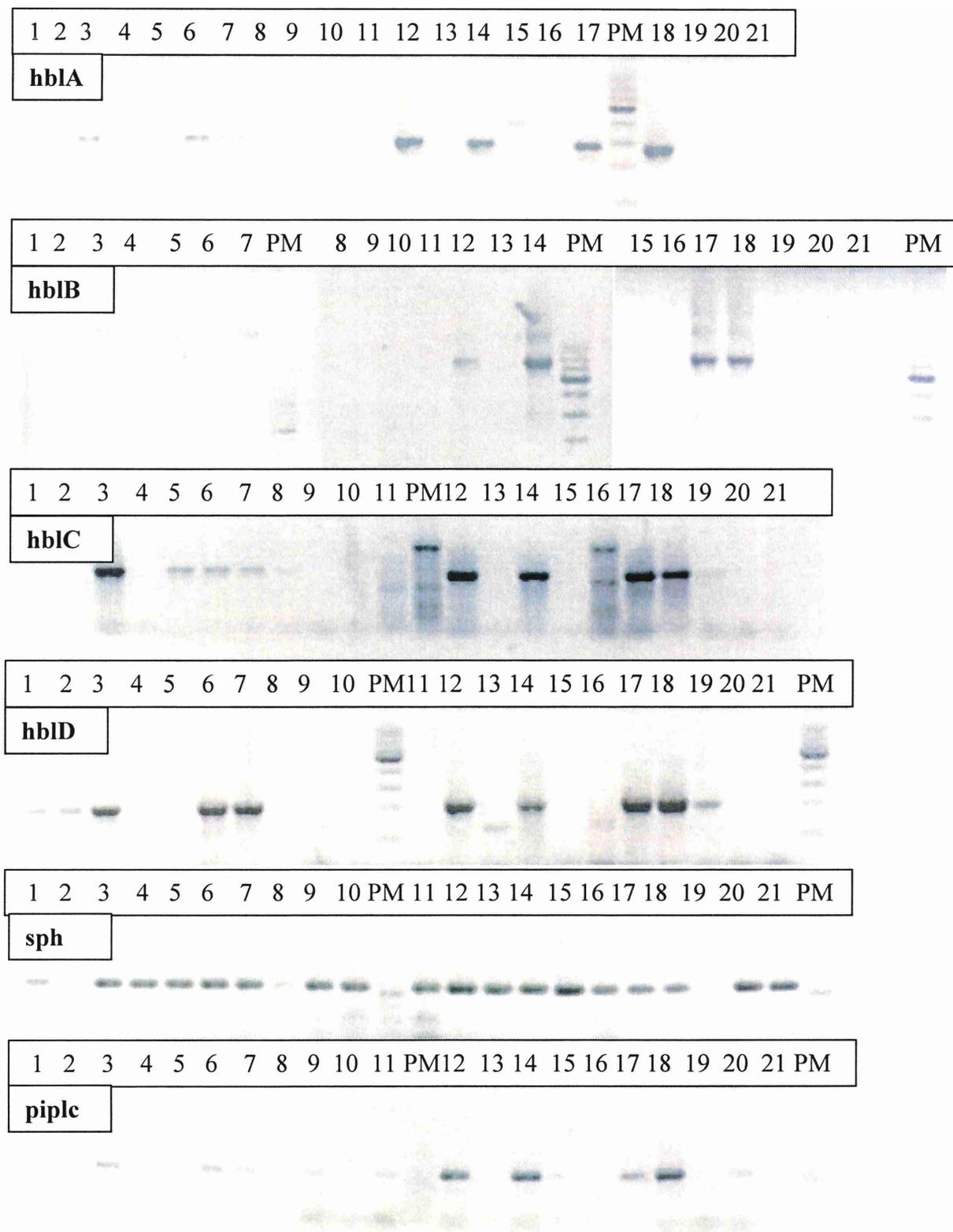


Figura 51: Corridas electroforéticas en gels de agarosa de los productos de las PCR de los primers correspondientes a los genes que codifican para los factores de virulencias HBL, esfingomielinasa y fosfolipasa C. Referencias (se indica la cepa): 1(2); 2 (114); 3 (273); 4 (B10502); 5 (T2); 6 (113); 7 (253); 8 (E2); 9 (M2); 10 (3); 11 (Watertown); 12 (ATCC 10876); 13 (313); 14 (124); 15 (M845); 16 (A7); 17 (T1); 18 (123); 19 (93); 20 (ATCC 13061); 21 (M74); PM (Peso molecular). Experimento representativo de 3 ensayos independientes.

Todos los genes dieron fragmentos de amplificación de los tamaños esperados (Tabla 11) tal como se muestra, a modo de ejemplo, para los genes que codifican al complejo HBL (hblA, hblB, hblC y hblD), a la esfingomielinasa (sph) y a la fosfolipasa C (pipIc) (Figura 51).

Del total de cepas ensayadas (21), 5 fueron positivas para todas las secuencias estudiadas: cepa 273, 253, 124, 123 y T1; y pertenecen al grupo B* (Figura 50).

IV. 3. C. RELACION ENTRE ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y PRESENCIA DE LOS GENES DE VIRULENCIA

Para analizar la relación entre la presencia de las secuencias ensayadas y la actividad biológica de las cepas se efectuó un análisis de componentes principales (CP). Para ello consideramos que tanto la habilidad de desprender enterocitos en cultivo luego de la infección (Sección IV. 2), como el modelo de desprendimiento celular por factores extracelulares (Sección IV. 1) representan adecuadamente el conjunto de la actividad biológica.

Estas dos características abarcan tanto el efecto de la interacción directa bacteria-célula como el efecto de los factores extracelulares.

La matriz de correlación y probabilidad de análisis de componentes principales se muestra en la tabla 12, y en la tabla 13 se encuentran resumidas las diferencias significativas y las tendencias. Se hallaron correlaciones tanto positivas como negativas. La habilidad de desprender enterocitos luego de la infección se correlaciona negativamente con la presencia de los genes entS y nheB ($p= 0.07$) (Tabla 13). En lo que respecta al modelo de desprendimiento por factores extracelulares, se encontraron correlaciones positivas y significativas ($p<0.05$) con la presencia de las secuencias entS, nheC y sph (Tabla 13).

Todas las cepas, excepto la 93 (negativa para la mayoría de los genes) fueron positivas para esfingomielinasa.

Si se analiza el complejo hbl, puede observarse que 12 cepas presentan al menos una de las secuencias de la hemolisina BL.

Respecto a los genes que codifican los componentes del otro factor complejo de *B. cereus*, 20 cepas son positivas al menos para una de las secuencias de la enterotoxina no hemolítica (nhe).

Y una tendencia hacia correlaciones positivas con la presencia de las secuencias pipIc y bceT ($p= 0.076$ y 0.070 respectivamente) (Tabla 13).

El complejo hbl mostró alta correlación entre sus genes; en cambio ocurrió lo contrario con el grupo nhe (Tabla 13).

Los autovalores obtenidos a partir de la matriz de correlación (Infostat 2004) muestran que los 4 primeros componentes principales acumulan el 76% de la variación total (Tabla 14), por lo tanto se realizaron gráficos biplots utilizando los 4 CP generados a partir de esos autovalores.

Los autovectores obtenidos dan una idea de la influencia que tendrá cada variable sobre cada CP (Tabla 15).

A partir de ellos y con los valores de cada variable que le corresponde a cada cepa se obtienen las CP (Tabla 16).

Del análisis de estos resultados podemos decir que la CP 1 recibe el peso positivo más alto para las variables modelo de desprendimiento, entS, nheA, hblA, hblC, hblD, pipIc y bceT. O sea que en el gráfico, esta componente separará la presencia de la mayoría de los genes de la capacidad de desprender enterocitos por la infección, ya que respecto a esta última variable el autovector es negativo.

La CP2 recibe el peso positivo más alto para entFM y sph.

Las CP 3 y CP4 reciben el peso positivo más alto sólo para dos variables, nheB y nheC, y desprendimiento por infección y hblB, respectivamente.

El análisis por biplots permite confirmar la relación entre diferentes variables así como definir grupos de cepas (Figura 52).

Las cepas 113, 253, 273, 124, ATCC 10876 y T1 forman un grupo (grupo I) en diferentes gráficos, por ejemplo CP1 vs CP2, CP1 vs CP3 y CP1 vs CP4. Todas poseen valores altos de desprendimiento celular y son positivas para todas las secuencias de los genes ensayados. Esto se ve reflejado en la posición de las cepas respecto del vector de las variables, ya que los datos que se encuentran en la misma dirección que una variable pueden tener valores relativamente altos respecto a esa variable.

En el gráfico CP1 vs. CP2 las cepas ubicadas a la izquierda del gráfico están más asociadas con la variable “Desprendimiento debido a la infección” y menos asociadas con la presencia de algunos genes, ya que están ubicadas en la zona negativa del CP1. En cambio las cepas ubicadas a la derecha del gráfico parecen estar asociadas con todas las variables, como por ejemplo la cepa T1 ya que está ubicada en un punto de valores positivos para las 2 componentes principales. Esto a su vez se ve confirmado por los datos de la tabla 16, donde esta cepa es positiva para todas las variables. En cambio la cepa 93 parece no estar asociada con ninguna variable ya que se encuentra alejada de todos los vectores y en la zona negativa de ambas CP.

Las cepas B10502 y Watertown están juntas formando un par bien definido en los gráficos de CP1 vs CP3 y CP1 vs CP4. Estas cepas comparten

las propiedades de ser positivas para pocas secuencias de genes y de ser capaces de desprender los enterocitos luego de la infección.

En función de los ángulos entre las variables también podemos deducir correlación. Ángulos de 90° entre dos variables indican que ambas variables no se encuentran correlacionadas. Ángulos menores de 90° indican correlación positiva y ángulos mayores de 90° implican correlación negativa. Es decir un ángulo cercano a cero implica que ambas variables están fuertemente correlacionadas en forma positiva y un ángulo cercano al ángulo llano entre dos variables indica que hay una correlación negativa. El valor de la correlación es un valor muy similar al valor dado por el coseno del ángulo formado entre los vectores.

Por ejemplo, el ángulo entre la presencia del gen sph y el modelo de desprendimiento es agudo, entonces entre estas dos variables existe una correlación positiva. En general, el modelo de desprendimiento correlaciona positivamente con todos los genes, en cambio no correlaciona o lo hace en forma negativa con el desprendimiento debido a la infección.

Por otro lado, el desprendimiento debido a la infección, correlaciona en forma negativa con la mayoría de los genes, y sólo tiene correlación positiva con la presencia del gen entFM.

En dos gráficos, CP1 vs. CP3 y CP1 vs. CP4, los tres genes que codifican para el complejo NHE no correlacionan en forma positiva entre ellos: se encuentran nheB y nheC formando un ángulo agudo, pero correlacionando negativamente con el gen nheA.

Con respecto al otro complejo, HBL, los cuatro genes que lo codifican correlacionan positivamente entre sí en todos los gráficos, excepto en el gráfico CP1 vs. CP4, donde el gen hblD correlaciona negativamente con los otros tres.

Tabla 12: Análisis multivariado de los genes de virulencia y la actividad biológica de las cepas del presente estudio. A: matriz de correlación. B: matriz de probabilidad

A		D. inf	Modelo	entS	entFM	nheA	nheB	nheC	sph	hblA	hblB	hblC	hblD	pipIC	bceT
D. inf	1.00														
Modelo	-0.14	1.00													
entS	-0.41	0.54	1.00												
entFM	0.06	0.09	-0.14	1.00											
nheA	-0.20	0.27	0.60	0.14	1.00										
nheB	-0.41	0.22	0.33	-0.14	0.00	1.00									
nheC	-0.24	0.54	0.58	0.08	0.35	0.58	1.00								
sph	0.19	0.46	0.23	0.55	0.23	-0.08	0.40	1.00							
hblA	-0.17	0.35	0.52	0.01	0.52	0.24	0.42	0.17	1.00						
hblB	-0.09	0.29	0.44	-0.03	0.44	0.22	0.38	0.15	0.89	1.00					
hblC	-0.33	0.20	0.50	-0.18	0.50	0.30	0.29	-0.25	0.81	0.72	1.00				
hblD	-0.33	0.20	0.70	-0.46	0.50	0.30	0.29	-0.25	0.60	0.50	0.60	1.00			
pipIC	0.00	0.40	0.40	0.14	0.40	0.00	0.12	0.23	0.52	0.44	0.30	0.50	1.00		
bceT	-0.25	0.41	0.61	-0.23	0.41	0.27	0.47	0.19	0.90	0.80	0.70	0.41	0.41	1.00	

B		D. inf	Modelo	entS	entFM	nheA	nheB	nheC	sph	hblA	hblB	hblC	hblD	pipIC	bceT
D. inf	0.5629														
Modelo	0.0739*	0.0141													
entS	0.8108	0.6922	0.5560												
entFM	0.3880	0.2502	0.0052	0.5560											
nheA	0.0739*	0.3408	0.1510	0.5560	>0.9999										
nheB	0.3171	0.0130	0.0077	0.7347	0.1346	0.0077*									
nheC	0.4291	0.0393	0.3306	0.0127	0.3306	0.7486	0.0828*								
sph	0.4705	0.1264	0.0177	0.9510	0.0177	0.2986	0.0627*	0.4780							
hblA	0.7088	0.2079	0.0544	0.8982	0.0544	0.3553	0.1004	0.5274	<0.0001						
hblB	0.1577	0.3900	0.0239	0.4401	0.0239	0.1964	0.2147	0.2806	<0.0001	0.0003					
hblC	0.1577	0.3900	0.0005	0.0391	0.0239	0.1964	0.2147	0.2806	0.0051	0.0233	0.0056				
hblD	>0.9999	0.0769*	0.0806*	0.5560	0.0806*	>0.9999	0.6278	0.3306	0.0177	0.0544	0.1964	0.0239			
pipIC	0.2878	0.0704*	0.0041	0.3322	0.0739*	0.2457	0.0359	0.4291	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0006	0.0739*		
bceT															

Correlación significativa (p<0.05) se indica en verde y tendencia (0.07<p<0.09) se indica en gris. Referencias: D. inf (Desprendimiento por infección), Modelo (Modelo de desprendimiento por factores extracelulares).

IV. 3. Resultados

Tabla 13: Resumen del análisis multivariado de los genes de virulencia y la actividad biológica de las cepas del presente estudio.

<u>B</u>	D. inf	Modelo	<i>entS</i>	<i>entFM</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>sph</i>	<i>hblA</i>	<i>hblB</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>pipIC</i>	<i>bceT</i>
D. inf														
Modelo	0													
<i>entS</i>	(-)	+												
<i>entFM</i>	0	0	0											
<i>nheA</i>	0	0	-	0										
<i>nheB</i>	(-)	0	0	0	0									
<i>nheC</i>	0	+	+	0	0	+								
<i>sph</i>	0	+	0	+	0	0	(+)							
<i>hblA</i>	0	0	+	0	+	0	(+)	0						
<i>hblB</i>	0	0	(+)	0	(+)	0	0	0	(+)					
<i>hblC</i>	0	0	+	0	+	0	0	0	(+)	+				
<i>hblD</i>	0	0	+	-	+	0	0	0	(+)	+	+			
<i>pipIC</i>	0	(+)	(+)	0	(+)	0	0	0	(+)	(+)	0	+		
<i>bceT</i>	0	(+)	+	0	(+)	0	+	0	(+)	+	+	+	(+)	

Referencias: +: correlación positiva ($p \leq 0.05$); -: correlación negativa ($p \leq 0.05$); (+): tendencia a correlación positiva ($0.07 < p < 0.09$); (-): tendencia a correlación negativa ($0.07 < p < 0.09$); 0: no hay correlación.

Tabla 14: Autovalores resultantes del análisis de Componentes Principales sobre la matriz de correlación de las variables en estudio.

<u>Lambda</u>	<u>Valor</u>	<u>Proporción</u>	<u>Prop acum.</u>
1	5.84	0.42	0.42
2	2.24	0.16	0.58
3	1.60	0.11	0.69
4	1.02	0.07	0.76
5	0.95	0.07	0.83
6	0.67	0.05	0.88
7	0.54	0.04	0.92
8	0.43	0.03	0.95
9	0.20	0.01	0.96
10	0.20	0.01	0.98
11	0.15	0.01	0.99
12	0.12	0.01	1.00
13	0.02	1.8E-03	1.00
14	0.01	5.3E-04	1.00

Tabla 15: Coeficientes de los autovectores (e) seleccionados para la conformación de las Componentes Principales. En verde se encuentran resaltados los valores más altos para cada variable.

<u>Variables</u>	<u>e1</u>	<u>e2</u>	<u>e3</u>	<u>e4</u>
Desprend inf	-0.15	0.19	-0.40	0.25
Modelo despr	0.31	0.21	-0.14	0.22
<i>entS</i>	0.33	0.03	0.18	-0.37
<i>entFM</i>	-0.05	0.51	-0.04	0.08
<i>nheA</i>	0.27	0.12	-0.15	-0.39
<i>nheB</i>	0.17	-0.13	0.55	0.29
<i>nheC</i>	0.26	0.21	0.44	0.17
<i>sph</i>	0.07	0.61	0.04	0.04
<i>hblA</i>	0.37	0.02	-0.23	0.29
<i>hblB</i>	0.33	0.01	-0.25	0.39
<i>hblC</i>	0.32	-0.23	-0.14	0.19
<i>hblD</i>	0.32	-0.29	-0.07	-0.30
<i>pipIC</i>	0.23	0.17	-0.31	-0.32
<i>bceT</i>	0.37	-0.05	-0.10	0.21

Tabla 16: Valores de las variables correspondiente a cada cepa de *B. cereus* y los componentes principales utilizados para la construcción de los gráficos biplots.

Cepa	Variables														Coordenadas de las CP			
	D. inf.	Modelo	entS	entFM	nheA	nheB	nheC	sph	hblA	hblB	hblC	hblD	pipIC	beeT	CP 1	CP 2	CP 3	CP 4
2	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0,45	-1,34	1,88	-0,66
114	0	0,5	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0,27	0,28	0,77	-2,05
273	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3,39	0,21	-0,41	-0,01
B10502	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	-3,18	0,37	-2,69	-0,74
T2	0	0,5	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0,85	-0,27	-0,02	2,87
113	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	2,69	0,19	0,12	-0,84
253	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3,39	0,21	-0,41	-0,01
E2	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0,12	0,49	1,52	-0,63
M2	0	0,5	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	-2,10	0,08	-0,15	-0,35
3	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	-1,16	0,86	1,43	-0,28
Watertown	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	-2,67	1,29	-2,44	-0,97
ATCC 10876	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3,22	-0,79	-1,08	0,26
313	1	0,5	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	-2,85	0,14	-0,34	0,76
124	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3,39	0,21	-0,41	-0,01
M845	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	-2,57	0,19	0,37	1,33
A7	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	-1,99	1,02	0,93	0,97
T1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3,09	0,60	-1,20	0,48
93	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	-1,78	-5,76	-0,30	-0,18
ATCC 13061	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	-1,54	1,34	0,32	0,35
M74	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	-1,03	0,70	2,08	-0,26

Referencias: D. inf. (Desprendimiento debido a la infección); Modelo (Modelo de desprendimiento por factores extracelulares): 1 (Desprendimiento alto), 0.5 (Desprendimiento bajo) y 0 (No desprende).

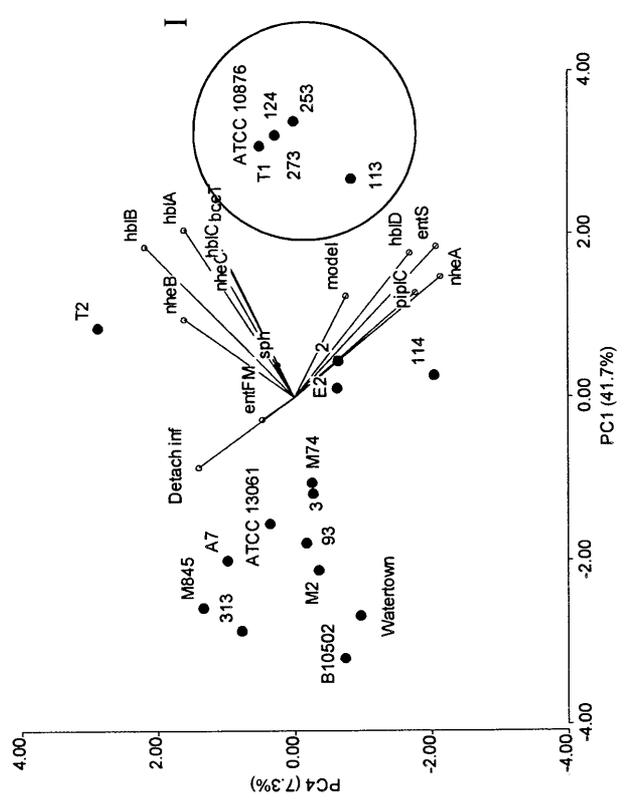
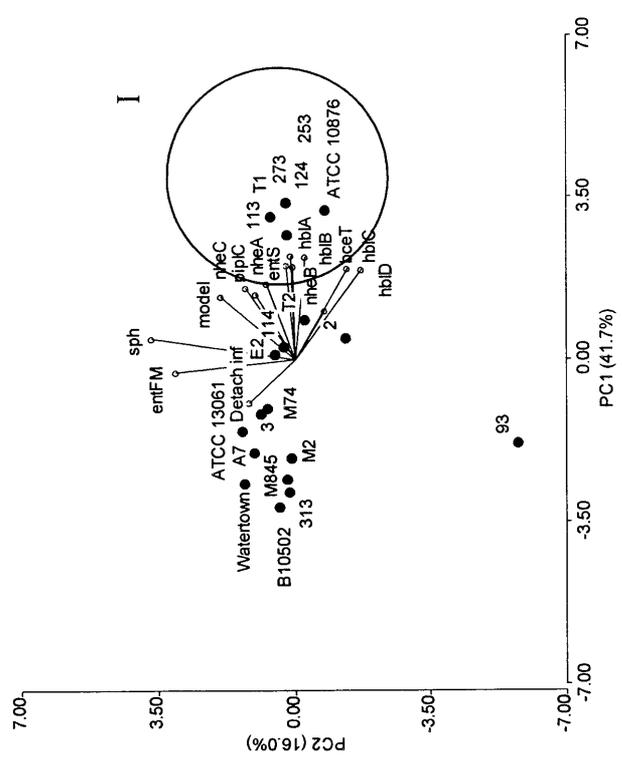
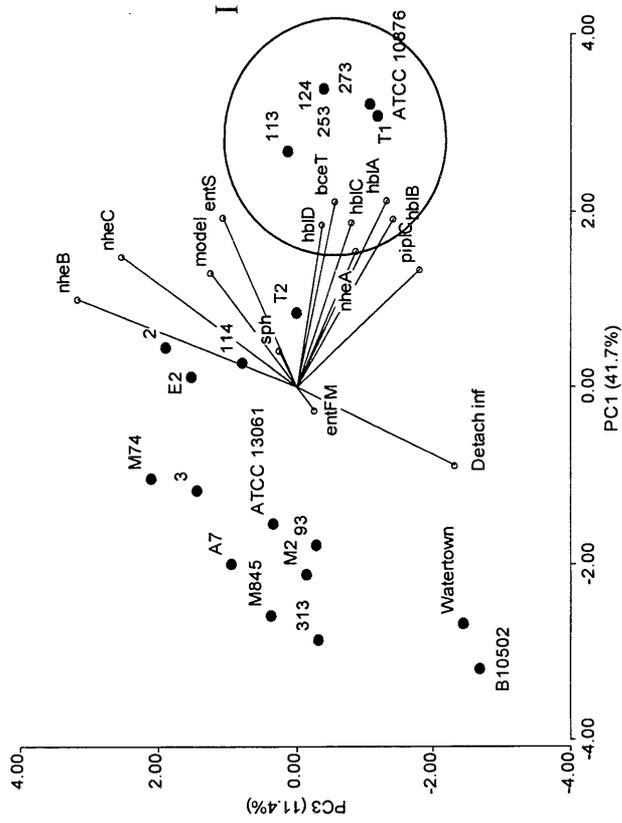


Figura 52: Análisis mediante biplot de los genes y actividad biológica sobre enterococos humanos en cultivo. Las cepas positivas para todas las secuencias de ADN analizadas se encuentran delimitadas por un círculo. Referencias: model (Modelo de desprendimiento); detach inf (Desprendimiento por infección); PC (Componente Principal).

IV. DISCUSIÓN

IV. 3. ANÁLISIS MULTIVARIADO DE LAS CEPAS DE *Bacillus cereus*

La virulencia de *Bacillus cereus* está relacionada con varios genes, que codifican para diferentes toxinas responsables de la actividad biológica.

La transcripción de algunos de estos genes está bajo control de un regulón pleiotrópico, PlcR, que es exclusivo del grupo *B. cereus* (Slamti and Lereclus, 2002). Es parte de un sistema de “quorum sensing que permite a la bacteria regular los genes de virulencia en función de la densidad bacteriana y esto activa la expresión de varios factores extracelulares, entre los que se incluyen HBL, NHE, CytK, proteasas, fosfolipasas y proteínas de superficie (Gohar et al., 2002; Slampti et al., 2004; Brillard and Lereclus, 2007).

La actividad de este regulón depende de la presencia de un péptido señal, PapR, el cual es exportado y reimportado por una permeasa (Slampti and Lereclus, 2002; Bouillaut et al., 2008). Se cree que PapR es un heptapéptido que interactúa con PlcR dentro de la célula y ejerce un control positivo sobre la expresión de del mismo (Bouillaut et al., 2008).

Otros factores extracelulares no están bajo el control de PlcR (Stenfors Arnesen et al., 2008). Entre ellos se encuentra HlyII, que se encuentra bajo el control negativo del regulador transcripcional HlyIIR (Budarina et al., 2004). A su vez, también parece estar regulado por el regulador de la incorporación de hierro (Fur), que regula la movilización del ión y reprime los genes involucrados en la incorporación del mismo, cuando hay suficiente cantidad dentro de bacteria (Harvie et al., 2005).

Las proteasas serían otros de los factores independientes de PlcR (Callegan et al., 2003).

El análisis conjunto de características fenotípicas y genotípicas permitiría una mejor caracterización de las cepas de *B. cereus*.

Para ello, en este trabajo de tesis, se efectuó un análisis multivariado tomando en cuenta la ribotipificación, los genes asociados con factores de virulencia y la actividad biológica de las cepas.

El análisis de la secuencia 16S del ARNr es muy utilizada como método para la identificación de microorganismos (te Giffel et al., 1997) y aunque es una secuencia muy conservada se ha encontrado que posee regiones de alta variabilidad (Bavykin et al., 2004).

En el caso de *B. cereus*, el análisis total del 16S ARNr muestra una homología muy alta, pero análisis basados en la región VI demuestran que existe suficiente variabilidad como para distinguir *B. cereus* y *B. thuringiensis* (te Giffel et al., 1997). La diferenciación de estas dos especies dentro del grupo *B. cereus*, es importante, ya que fenotípicamente son indistinguibles, excepto por la presencia de los cristales parasporales en *B. thuringiensis* (Tourasse et al., 2006). Los genes que codifican esta toxina se encuentran en plásmidos, por lo tanto la pérdida de ellos haría imposible la diferenciación; esto es un tema importante en la prevención de riesgos para la salud de la población, ya que esta especie es utilizada para la fabricación de insecticidas (te Giffel et al., 1997).

En los resultados de la ribotipificación obtenidos con las cepas en estudio, se encontró heterogeneidad de perfiles (Figura 50). Los diferentes patrones encontrados (16 sobre 21

cepas) indicaron polimorfismo en la secuencia del ARNr. Si bien las cepas se agruparon en dos grupos, esta técnica efectuada con una sola enzima de restricción (EcoRI) puede generar grupos heterogéneos y no distingue microorganismos estrechamente relacionados, como es el caso del grupo *B. cereus* (Grif et al., 2003).

Para subsanar esto se efectuaron análisis, mediante el cálculo de componentes principales y gráficos biplots, incluyendo otros marcadores genotípicos y fenotípicos.

El análisis de componentes principales (CP) y los gráficos conocidos como biplot son técnicas generalmente utilizadas para reducción de dimensión. Las técnicas de reducción de dimensión permiten examinar todos los datos en un espacio de menor dimensión que el espacio original de las variables (InfoStat 2004; Gabriel and Odoroff, 1990).

Graficar más de 2 variables en un plano es difícil, pero si se observa la nube de puntos de las variables originales ubicadas en el espacio se pueden proyectar sobre un plano. Entonces hay que buscar un sistema de referencia para el plano (subespacio) más cercano a la nube de puntos de forma que, al proyectar todos los puntos sobre dicho plano, la pérdida de información sea mínima. El subespacio quedará definido mediante un sistema de referencia para el mismo, es decir, mediante dos vectores perpendiculares dentro del subespacio. El primero se sitúa en la dirección en la que más varían los datos, el segundo, perpendicular al primero recogiendo la mayor parte de la variabilidad restante y así sucesivamente (InfoStat 2004; Gabriel and Odoroff, 1990).

Los componentes principales (CP) se pueden obtener a partir de la matriz de correlación o la matriz de covarianza (InfoStat 2004).

En el análisis realizado en este trabajo de tesis se utilizó la matriz de correlación. La característica de este tipo de cálculos es que las variables no conservan sus unidades, todas son transformadas en la misma escala lo cual implica que todas las variables tienen el mismo “peso” (InfoStat 2004).

Cuando el análisis se aplica a la matriz de correlación las componentes principales resultan de la combinación lineal de las variables originales previamente estandarizadas y de forma tal que ningún otro conjunto de combinaciones lineales de igual cardinalidad, tiene varianza de las combinaciones mayor a la del conjunto de componentes principales (InfoStat 2004).

Se espera que dicha reducción de dimensionalidad no produzca una pérdida importante de información. Desde este punto de vista, la técnica de reducción de la dimensión implica una consecuente ayuda en la interpretación de los datos.

El análisis de componentes principales cuenta con las siguientes características:

1. La varianza de los componentes principales es igual a los autovalores (λ) de la matriz original. Es decir, la suma de los autovalores es igual al número de variables totales porque explican el total de la variabilidad. En los cálculos realizados para este análisis, obsérvese que $\lambda = 14$ (Tabla 14) que es igual al número de variables (Tabla 16).
2. La primera componente principal es la combinación lineal de las variables originales que expresa la mayor varianza (λ_1) (Tabla 14: $\lambda_1 = 5.84$, proporción=0.42). La segunda componente principal es la combinación lineal que explica la mayor varianza (λ_2) si no tomamos en cuenta la primera componente principal (Tabla 14: $\lambda_2 = 2.24$, proporción=0.16). Como los

autovalores están ordenados por magnitud, las componentes principales quedan ordenadas por la cantidad de variabilidad que explica cada una.

Los resultados señalan que con las 4 primeras componentes es posible explicar el 76 % de la variación total (Tabla 14).

A partir de los autovalores, se obtienen los autovectores (e1, e2, e3 y e4) para cada variable (Tabla 15) (Infostat 2004). Los autovectores dan una idea del peso que cada variable tendrá en cada CP (Tabla 15) y son los valores con que cada variable original fue ponderada para calcular las CP1, CP2, CP3 y CP4 (Tabla 16).

Con los valores de cada CP para cada cepa se construyen los gráficos biplots.

Los biplots permiten visualizar observaciones y variables en un mismo espacio, así es posible identificar asociaciones entre observaciones, entre variables y entre variables y observaciones.

En los biplots las observaciones están representadas como puntos y las variables son graficadas como vectores desde el origen.

Los vectores son las proyecciones de los ejes de las variables en el subespacio. Los biplots generalmente no muestran la escala de valores para las variables. La flecha desde el origen muestra la dirección positiva de las variables y el largo de estos vectores representa la desviación standard de las variables (Gabriel and Odoroff, 1990).

Las observaciones, que se grafican en una misma dirección que una variable podría tener valores relativamente altos para esa variable y valores bajos en variables que se grafican en dirección opuesta (Gabriel and Odoroff, 1990).

Al realizar este análisis, consideramos que la habilidad de desprender los enterocitos humanos

luego de la infección y el modelo de desprendimiento eran características importantes que representaban acabadamente la actividad biológica.

Estas características, analizadas junto a la presencia de secuencias asociadas a genes de factores de virulencia, permiten tener un panorama completo de la relevancia de distintos factores en la actividad biológica de *B. cereus*.

En la bibliografía encontramos antecedentes, donde las cepas de *B. cereus* pudieron ser agrupadas de acuerdo a las características de los genes que codifican para los factores de virulencia (Prub et al., 1999; Sergeev et al., 2006; Vassileva et al., 2007).

Según el análisis por PCR realizado a las cepas en estudio, la secuencia del gen *nheA* (cuyo producto es detectado por el kit de TECRA) estuvo presente en 11 de las 21 cepas (Tabla 11). Sin embargo todas las cepas fueron positivas en el test de ELISA. Estos resultados pueden indicar que la secuencia del primer del gen *nheA* no es la apropiada o que el kit detecta otro producto.

La variación en la secuencia del gen puede afectar los sitios de pegado en el ADN dando resultados falsos negativos, impidiendo la detección por PCR (Thaenthanee et al., 2005). Algunos autores sostienen que el grado de polimorfismo entre las cepas de *B. cereus* está relacionada con la fuente de origen de las mismas (Ehling-Schulz et al., 2005^a; Tourasse et al., 2006), y en particular, en lo que se refiere al gen *nhe*, se ha encontrado una gran variabilidad entre cepas provenientes de alimentos (Guinebretiere et al., 2002).

También existen evidencias respecto a que el test de TECRA detectaría dos péptidos diferentes de similar tamaño (40 y 41 kDa) (Beecher and Wong, 1994^b).

En investigaciones recientes para este gen, se ha encontrado una nueva

variante que no da reacción positiva con el test de TECRA (Fagerlund et al., 2007) y en otros casos no se ha encontrado el set completo de genes, que se suponen que son necesarios para la expresión de la proteína en cepas NHE positivas (Sergeev et al., 2006). Estos datos permitirían reafirmar la idea de la variabilidad de este gen.

Las investigaciones realizadas con otras cepas han encontrado que el operon *nhe* está presente en casi todas las cepas de *B. cereus* (Lindback et al., 2004; Guinebretiere et al., 2002) y que o está el operon completo o no tiene ningún gen (Dietrich et al., 2005). Estos resultados difieren de los datos obtenidos en este trabajo de tesis, ya que hay cepas que dieron negativo sólo para uno o dos de los componentes del operón.

Cada cepa presenta una distribución de genes que le es particular (Sergeev et al., 2006), y su presencia tiene relación con el origen de las mismas (Tourasse et al., 2006). Esto podría explicar las diferencias encontradas con nuestras cepas.

Teniendo en cuenta la actividad biológica muchas cepas que comparten una actividad relevante se encuentran agrupadas en los gráficos biplots (denominado Grupo I) (Figura 52, círculo). Todas estas cepas también pertenecen al grupo B* de la ribotipificación. Esta correlación indica lo provechosa que es la ribotipificación para agrupar cepas, aunque no es el único método a utilizar, ya que otras cepas que también tienen factores de virulencia importantes como la capacidad de invadir enterocitos, se encuentran en regiones separadas dentro del gráfico como es la cepa 2.

El grupo I definido en los gráficos biplots, tiene una tendencia hacia valores positivos para los 3 componentes del operon *nhe*, y en alguna de las representaciones, donde los 3 genes parecieran no relacionarse (*nheA* con

nheB y *nheC*), el grupo I se hallan más cerca del gen *nheA* (CP1 vs CP3). Los datos obtenidos mediante análisis PCR demuestran que todas las cepas de este grupo son positivas para el operon completo.

Otras cepas (114, E2 y 3), que también son positivas para todos los componentes del operon *nhe*, se encuentran alejadas de este grupo, aunque con tendencia hacia valores positivos en al menos algunos de los genes del operón.

Las cepas del grupo I correlacionan negativamente con el desprendimiento debido a la infección, una de las características que consideramos importante para incluir en el análisis biplots. A su vez esta característica correlaciona en forma negativa, o no correlaciona con la mayoría de los genes, excepto para el gen *entFM*. Esto podría indicar que esta característica se encontraría relacionada con otros genes no estudiados en este trabajo.

El gen *entFM* codifica una enterotoxina de 45 kDa que es idéntica en un 97% a la proteína codificada por el del gen *entS* (Asano et al., 1997). Sin embargo, en nuestro análisis, estos dos genes correlacionan en forma negativa, o no correlacionan. Esto podría ser el resultado de la presencia de los genes en forma separada; solo coexisten en 8 cepas de un total de 21. Algunos autores sostienen que ambos genes (*entS* y *entFM*) codifican la misma proteína, pero que son necesarios dos primers distintos para detectarlos (Ghelardi et al., 2002). A diferencia de estos autores, en las cepas ensayadas en este trabajo de tesis existen varios casos de presencia simultánea de los dos genes.

El modelo de desprendimiento por los factores extracelulares, otra característica que consideramos que contribuiría significativamente al análisis mediante el uso de biplots, correlaciona positivamente con las cepas agrupadas en el grupo I.

El desprendimiento de los enterocitos causado por los factores extracelulares, responde a tres modelos distintos, que podrían tener relación con las características de cada cepa, en lo que a la producción de factores extracelulares se refiere.

De las seis cepas que integran el grupo I, cuatro de ellas (cepa T1, 253, 273 y 124) son positivas para todos los genes y son de desprendimiento alto.

Las otras dos cepas también son de desprendimiento alto y solo les falta un gen para tener el total de los genes evaluados.

La cepa ATCC 10876 dio negativo para el gen entFM. Si consideramos lo que postulan algunos investigadores, que codifica para la misma enterotoxina que el gen entS (Ghelardi et al., 2002), tendríamos una cepa potencialmente productora de todas las enterotoxinas analizadas.

La cepa 113 dio negativo para el gen hblB, lo que la haría no activa para la enterotoxina HBL. La ausencia del gen nos indica la incapacidad de la cepa de producir un determinado factor, pero su presencia no es condición suficiente para la expresión. O sea que en este caso también estamos ante una cepa que, potencialmente, puede expresar la mayoría de la toxinas evaluadas.

No todas las cepas pertenecientes al grupo de desprendimiento alto pertenecen al grupo I ni son positivas para todos los genes estudiados, así como las cepas pertenecientes a los otros 2 grupos (del modelo de desprendimiento), que no tienen un patrón coincidente. Esto podría tener relación con otros factores, como la presencia del gen *cytK* (CytK) (Fagerlund et al., 2004), el gen *ces* (cereulide) (Ehling-Schulz et al., 2005), el gen *hlyII* (HlyII) (Budavarina et al., 2004) y el gen *clo* (Cereolisina O) (Brillard and Lereclus, 2007) entre otros factores que podrían formar parte de las toxinas de *B. cereus* y que aún no hayan

sido dilucidados. Asimismo esto podría tener relación con los resultados encontrados para el desprendimiento debido a la infección, donde la mayoría de los genes no tiene correlación con esta característica (Tabla 13).

La presencia del gen *pipIC* demuestra una correlación positiva con el modelo de desprendimiento celular. Aunque, como ya sabemos, la presencia de la secuencia no es garantía de que el gen se exprese, esta correlación podría darnos un punto de vista para analizar los resultados.

El fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC) es un factor extracelular producido por *B. cereus* y es una de las enzimas asociadas a la transducción de señales en la membrana plasmática de las células eucarióticas, ya que actúa sobre el fosfatidilinositol o sobre el glicosilfosfatidilinositol en la superficie externa para generar el mensajero intracelular, inositoltrifosfato (Sergev, 2005). De esta manera, la PI-PLC puede contribuir a la desestabilización de la membrana plasmática induciendo hemólisis y citólisis y también está involucrada en vías de señalización relacionadas con el ensamblado del citoesqueleto (Henderson et al., 1999^o). Ambas actividades pueden explicar la capacidad de desprender enterocitos luego del contacto bacteria-célula y el efecto sobre el citoesqueleto.

Así mismo hay cepas capaces de provocar cambios importantes en el citoesqueleto que se hallan en el otro extremo del vector *pipIC*, como por ejemplo la cepa 2. También se encuentra (el vector de *pipIC*), en dos de los gráficos, relacionado negativamente con el vector correspondiente al desprendimiento debido a la infección.

La cepa B10502 se encuentra apartada del resto de las cepas en dos de los gráficos, formando un par con la cepa Watertown con quien no comparte características respecto a modelo de desprendimiento y desprendimiento

debido a la infección. Si bien se encuentran alejadas del vector correspondiente al desprendimiento por la infección, ambas cepas se encuentran en la dirección de los valores positivos para dicha variable.

La cepa B10502, además, es una de las nueve cepas que dio negativo para todos los genes que codifican el complejo hbl. Esta cepa proviene de una intoxicación alimentaria asociada con el desarrollo de émesis en los pacientes.

Algunos autores postulan que las cepas productoras de la toxina emética provienen del mismo grupo, que a su vez es distinto del resto de las cepas (Vassileva et al., 2007) y que comparten algunas características como la ausencia del operon hbl (Ehling-Schulz et al., 2005) u otras propiedades (Stenfors Arnesen et al., 2008). En las cepas estudiadas en este trabajo de tesis no se evaluó la presencia del gen ces.

La utilidad de este tipo de análisis estaría dada por la posibilidad de inferir o predecir la actividad biológica de una cepa a partir de la presencia de los genes, como ocurre en las toxinas tipo Shiga en *E. coli* (Müller et al., 2006; Kaper and Karmali, 2008; Manning et al., 2008).

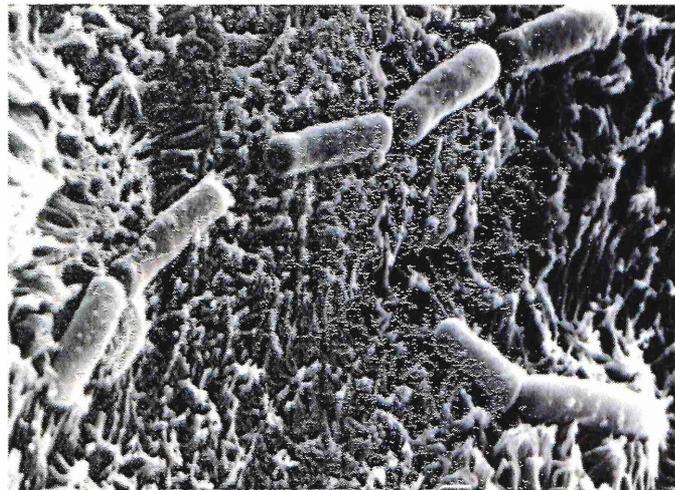
Del análisis de los resultados, podríamos concluir que determinadas características de las cepas nos permitirían predecir la pertenencia al grupo I (como ser positivas a todos los genes). Otras características parecen ser imprescindibles para pertenecer al grupo pero no indica pertenencia unívoca, como por ejemplo ser de desprendimiento alto (DA) en el modelo de desprendimiento y ser positivas para todos los genes del operon nhe

Respecto a la otra característica importante para este estudio, como es el desprendimiento de los enterocitos debido a la infección, no parecería tener relación exclusiva con el grupo I, ya que dentro de este conjunto hay cepas que desprenden y otras no.

En el caso de las cepas estudiadas, el análisis resulta complejo y no es posible establecer una correlación entre la presencia de ciertos genes con determinada actividad biológica. Esto podría estar dando cuenta de carácter multifactorial de la virulencia de *B. cereus*, lo que dificultaría su agrupamiento bajo determinadas características para predecir su patogenicidad.



V. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES



V. DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo de tesis, se ha demostrado que las cepas de *B. cereus* son capaces de producir profundas alteraciones en enterocitos humanos en cultivo. Estos efectos están relacionados con la producción de factores extracelulares y la habilidad de adhesión e invasión, constituyendo este trabajo de tesis la primera demostración fehaciente de la capacidad invasiva de este microorganismo y del efecto citopático debido a la infección.

El contacto directo bacteria-enterocito, o los factores extracelulares provocaron el desprendimiento de las células, la reorganización del citoesqueleto, daño al ribete en cepillo y necrosis.

Los factores extracelulares además, disminuyeron la actividad deshidrogenasa de los enterocitos.

El desprendimiento de las células en cultivo por los factores extracelulares permitió agrupar las cepas en tres modelos, y esto correlacionó positivamente con la presencia de los genes asociados a los factores de virulencia.

El carácter multifactorial de la patogénesis de *B. cereus* podría dificultar la correlación entre la presencia de los genes relacionados con factores de virulencia y la actividad biológica de las cepas.

Hasta el momento se creía que la patogenicidad de *B. cereus* estaba dada sólo por los factores extracelulares, que en el caso de las cepas productoras de diarrea, los comenzaban a producir una vez que se habían instalado en el intestino y habían germinado, ya que son los esporos los que son transmitidos por los alimentos (Granum, 1994).

Los resultados mostrados en este trabajo de tesis nos permitirán plantear un modelo para explicar la virulencia de *B. cereus*.

Cuando las bacterias llegan al intestino, los esporos germinan y comienzan a crecer. Allí se producirían dos efectos principales: daño por infección y daño por producción de factores extracelulares como se observó en las células en cultivo, pero cómo se desencadena ese daño?

Las bacterias viables se asociarían a la superficie apical de las células del epitelio, quizás preferentemente a las células de la cripta de las vellosidades, a través de receptores que podrían estar relacionados con proteínas ancladas a glucosilfosfatidilinosil y por ligandos dependientes de la cepa, entre las que se considerarían moléculas débilmente unidas y/o unidas no covalentemente; la capa S podría estar implicada.

La asociación de las bacterias a los enterocitos, generaría microentornos favorables para la producción y acción de toxinas, entre ellas las formadoras de poro. Esto, además de desestabilizar la membrana, permitiría a las bacterias inyectar dentro de la célula otros factores, que podrían desencadenar vías de señalización.

La transducción de señales también se podría generar por la interacción directa de las bacterias o las toxinas con los receptores de la superficie apical de los enterocitos.

Esta serie de eventos induciría vías de señalización mediadas por la vía de los lípidos fosforilados que a través de un mensajero intracelular, inosiltrifosfato, eleva los niveles de calcio. La unión del ión con calmodulina y la PKC, efector de diacilglicerol, regula las proteínas que protegen los rafts sobre los que se encontraría el fosfatidilinositol difosfato quien se une a proteínas del citoesqueleto que producen rearrreglos para facilitar la internalización.

La activación de esta vía u otras exportaría receptores de adhesión a la

superficie apical para favorecer la adhesión de los microorganismos.

La alteración en el citoesqueleto y la desorganización de la membrana plasmática, por la formación de poros, facilita la apertura de las uniones estrechas y el acceso de las bacterias a la zona basolateral. Allí las bacterias se unirían a otro tipo de receptores, como por ejemplo integrinas, y/o cadherinas, entre otros que estarían acoplados a vías de señalización que permitan la invasión de las bacterias por la vía paracelular.

Las bacterias también podrían lograr acceso a la zona basolateral a través de las células M e internalizarse mediante la inducción de rearrreglos de actina, como es lo hace *Yersinia spp* (Henderson et al., 1999^e).

La bacterias internalizadas se localizarían en vacuolas y desde allí podrían ser liberadas al medio intracelular y activar vías como MAPK

y NF- κ B como es el caso de *Listeria monocytogenes* (Salyers and Whitt, 2002¹³).

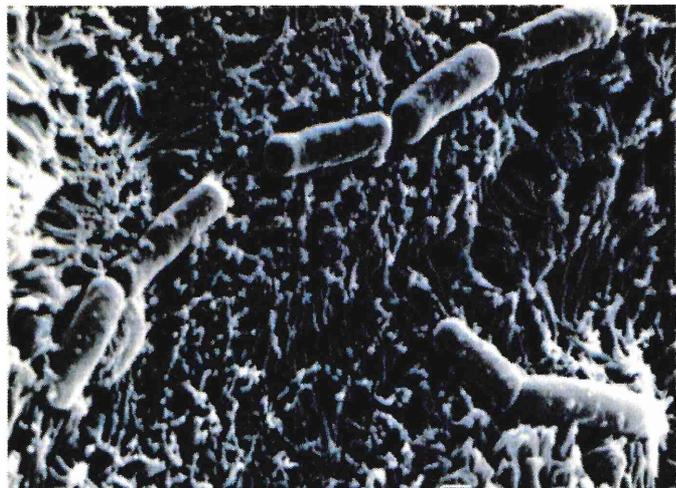
La activación de la vía de las MAPK podría inducir la producción de citoquinas proinflamatorias las que a su vez serían la señal para la migración transepitelial de PMN.

Las profundas alteraciones que se producen en la membrana plasmática llevarían a las células epiteliales a necrosis. Esto podría tener relación con el fin del ciclo, y ser indicativo de que no ha desarrollado un mecanismo para sobrevivir intracelularmente manteniendo la viabilidad de la célula infectada.

El presente trabajo de tesis abre nuevas perspectivas en el campo del estudio de los mecanismos moleculares de virulencia de *B. cereus* en el contexto de las infecciones intestinales.

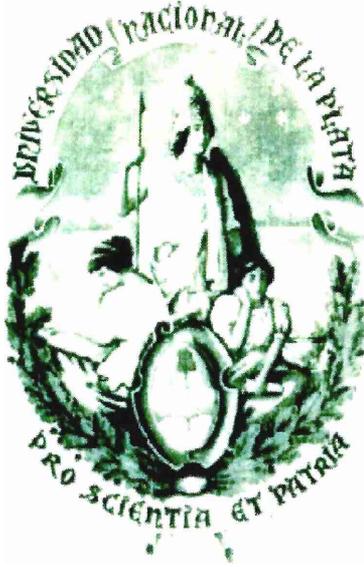


VI. PERSPECTIVAS

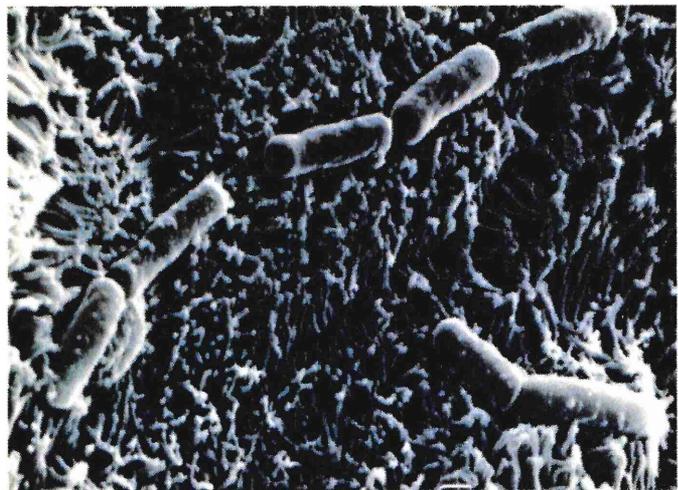


VI. PERSPECTIVAS

- Establecer un modelo de virulencia utilizando factores purificados.
- Determinar los receptores y ligandos implicados en la interacción entre *Bacillus cereus* y enterocitos humanos en cultivo.
- Determinar si las señales desencadenadas por los factores extracelulares son compartidas con las inducidas por la interacción directa bacteria-enterocito.
- Estudiar el destino intracelular de *Bacillus cereus* en enterocitos y en células fagocíticas profesionales.
- Determinar los factores relevantes que marcan la diferencia entre cepas invasivas y no invasivas.
- Establecer un modelo *in vivo* de infección intestinal de *Bacillus cereus*.



VII. APENDICE



VII. APENDICE

VII. 1. CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS DE *Bacillus cereus* USADAS EN ESTE ESTUDIO

VII. 1. A. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LAS CEPAS DE *Bacillus cereus*

Todas la cepas provenientes de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas (U.N.L.P.) son bacilos Gram positivos (Figura 53), agrupados en cadena, poseen la capacidad de esporular (Figura 54), son de crecimiento aeróbico, móviles y presentan las siguientes características, obtenidas a partir de su crecimiento en

medio Mossel: lecitinasa positivo, manitol negativo y polimixina resistente. Otras características metabólicas estudiadas (Tabla 17) indican que todas las cepas son hemolíticos en agar sangre, citrato negativo (medio de Simmons), Voges Proskauer negativo (medio de Clark y Lubs) y que la utilización del nitrato es dependiente de la cepa (caldo nitrato).

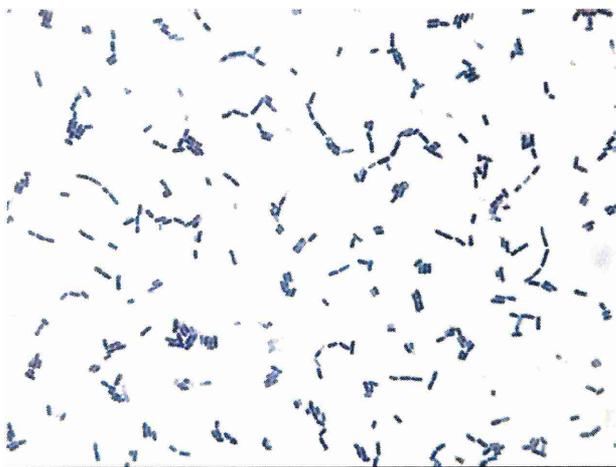


Figura 53: Cepa T1 de *Bacillus cereus* teñida mediante la técnica de Gram.

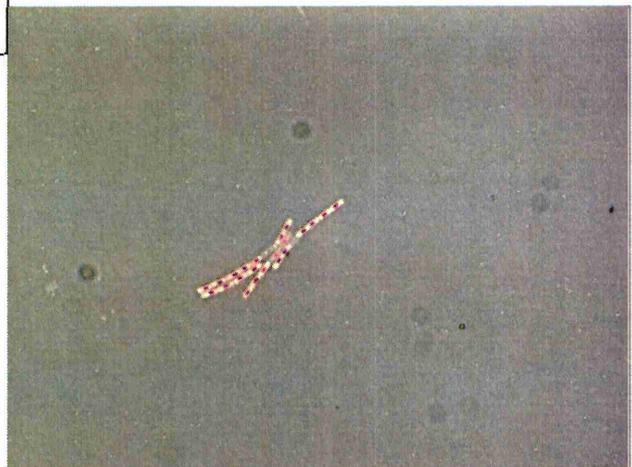


Figura 54: Cepa 3 de *Bacillus cereus* teñida mediante la técnica de Dorner que permite observar la ubicación central del espora

Tabla 17: Características fenotípicas y metabólicas de las cepas aisladas en la Cátedra de Microbiología (FCE-UNLP). Referencias: nd (No determinado); ne (no especificado); V. P (Voges Proskauer).

CEPA	HEMOLISIS	CITRATO	V.P.	NITRATO		
				N ₂	NH ₃	NO ₂
M2	+	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	+
M845	+	-	-	-	-	+
93	+	-	-	-	-	-
112	+	-	-	-	-	+
113	+	-	-	-	-	+
114	+	-	-	-	-	+
123	+	-	-	-	-	+
124	+	-	-	-	-	-
236	+	-	-	-	-	-
253	+	-	-	-	-	+
273	+	-	-	-	-	+
274	+	-	-	-	-	+
313	+	-	-	-	-	+
M74	+	-	-	-	-	-
B10502	+	nd	nd	nd	nd	nd
12	+	-	-	-	-	+
ATCC 18795	+	-	-	-	-	-
Manual Bergey	+	+	+	+	ne	+

VII. 2. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

VII. 2. A. MEDIOS DE CULTIVO (Manual Merck, 1994)

- **AGAR NUTRITIVO (g/L):** peptona de carne, 5.0; extracto de carne, 3.0; agar-agar, 12.0.
- **AGAR SANGRE (g/l):** extracto de corazón y peptona, 20.0; cloruro de sodio, 5.0; agar-agar, 15.0; sangre desfibrinada, 5-8%; pH: 6.9 ± 0.2.
- **AGAR TRIPTICASE SOYA (g/L):** tripticasa, 17.0; peptona, 3.0; cloruro de sodio, 5.0; fosfato dipotásico, 2,5; dextrosa, 2,5; pH: 7.2-7.4.
- **BHIG (g/L):** substrato alimenticio (extracto de cerebro, extracto de corazón y peptona), 27.5; D(+)-glucosa, 2.1; cloruro sódico, 5.0; hidrógeno fosfato sódico, 2.5; pH: 7.2-7.4.
- **CALDO NITRATO (g/L):** Extracto de carne, 3.0; peptona, 5.0; NO₃K, 1.0; campanita de Dirham; pH: 7.1-7.3
- **MEDIO DE CLARK Y LUBS (g/L):** Polipeptona, 7.0; glucosa, 5.0; fosfato dipotásico, 5.0; pH: 6.8-7.0.
- **MEDIO DE SIMONS (g/L):** Sulfato de magnesio, 0.2; fosfato ácido de amônio, 0.1; fosfato ácido de potasio, 1.0; citrato de sódico, 2.0; cloruro de sódico, 5.0; agar, 15.0; azul de bromo timol, 0.08; pH: 6.5-6.7

- **MEDIO MOSSEL (g/L):** peptona de carn, 10.0; extracto de carne, 1.0; D(-)manitol, 10.0; Cloruro de sódio, 10.0; rojo fenol, 0.025; agar, 12.0. Aditivos: emulsión de yema de huevo, 100 ml; polimixina 0.01 a 0.1; pH: 7.0-7.2.

VII. 2. B. SOLUCIONES DE LAVADO Y COLORANTES

- **PBS (g/l):** NaCl, 9.00; KH₂PO₄, 0.144 g/l; Na₂HPO₄, 0.795 g/l; pH: 7.2-7.4.
- **CRISTAL VIOLETA:** 0.13 gr. de cristal violeta en 5 ml de etanol y 5 ml de formol al 40%; se completa a 100 ml con PBS
- **MEDIO DE MONTAJE:** glicerol 50 % en PBS con una concentración final de 0,1 % de azida de sodio como agente antibleaching.
- **BINDING BUFFER:** HEPES/NaOH 10mM; NaCl 140mM; CaCl₂, 2.5 mM
- **BUFFER TAE 1x:** 40 mM Tris acetato, 1mM EDTA
- **BUFFER PCR:** 20mM TRIS-HCl, 50 mM KCl, pH: 8,4.

VII. 3. COLORACIONES

- **COLORACION DE GRAM:**
 - Se realizó el extendido, secado y fijado de la muestra en un portaobjeto.
 - Se cubrió el preparado durante 2 minutos con violeta de genciana.
 - Se escurrió la solución anterior y se cubrió el preparado con solución de Lugol: 2 veces, 30 segundos cada una.
 - Se lavó con agua destilada
 - Se cubrió con solución de safranina.
 - Se lavó con agua destilada
 - Se observó al microscopio con objetivo de inmersión
- **COLORACION CON CRISTAL VIOLETA**
 - Se realizó el extendido, secado y fijado de la muestra en un portaobjeto.
 - Se cubrió el preparado durante 5 minutos con cristal violeta.
 - Se lavó con agua destilada
 - Se observó al microscopio óptico con objetivo de inmersión
- **COLORACIÓN DE DORNER**
 - Se realizó una suspensión de la muestra a examinar en 1 ml de agua destilada.
 - Se añadió 1 ml de fucsina fenicada y se colocó en baño de agua hirviendo durante 10 minutos.
 - Se tomó una ansada del material y se colocó en un portaobjetos sobre una gota de nigrosina.
 - El preparado se extendió y secó.
 - Se observó al microscopio óptico con objetivo de inmersión

VII. 4. CULTIVO DE CÉLULAS CACO-2

- Las células fueron cultivadas a 37°C en medio DMEM (GIBCO BRL Life Technologies Rockville, MD. USA).
- Cada envase se resuspendió en agua bidestilada estéril (1 litro).
- Se le agregó 2.0 g de NaHCO₃.
- Se esterilizó por filtración con membrana de 0.22µm de poro (Millipore Co., Bedford, MA, USA).
- Luego se le adicionó asepticamente 20% de suero fetal bovino (GEN S.A., Argentina) inactivado durante 30

minutos a 58°C, solución de antibióticos (penicilina 12 UI/ml, estreptomina 12µg/ml, gentamicina 50µg/ml, fungizona 1.25µg/ml) y solución de aminoácidos no esenciales (13 ml/l)

- Las células se mantuvieron en nitrógeno líquido en viales de 1 ml de medio DMEM completo con 5% de dimetilsulfóxido (Riedel-de Haën AG, D-3016 Seelze, Alemania) como crioprotector.
- Para reactivarlas se descongeló un vial a 37°C, se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos para retirar el crioprotector, se resuspendieron las células en 1 ml de medio de cultivo fresco, y se cultivó en una botella de 25cm² (Corning Costar Co., Cambridge, MA, USA) con 4 ml de medio.
- El medio de cultivo se le cambió cada 2 días.
- A los 7 días, si microscópicamente (microscopio invertido) se observó una monocapa uniforme y continua, se repicó de la siguiente manera: se descartó el medio de cultivo, se lavó

la monocapa 3 veces con 5 ml de PBS, se colocaron 5 ml de tripsina (tripsina 75mg; EDTA 20mg; PBS 100ml) a 37°C durante 5 minutos (o hasta que se evidenció desprendimiento de la monocapa), se desprendió totalmente y se inactivó la enzima con medio de cultivo. Luego de lograr una suspensión homogénea, se amplificó de la siguiente manera: 1.4×10^4 células/ ml de medio. Luego se distribuyó en las placas para cultivo de células de 24 fosas (Corning Costar Co., Cambridge, MA, USA) con 0.5 ml por fosa (7×10^3 células/fosa), las que se incubaron el tiempo necesario para cada ensayo cambiando el medio cada 2 días.

Para los ensayos que requirieron una observación microscópica, se prepararon placas con un vidrio de 1 cm² (Assistent, Kart Hecht KG, Sondhein, Germany) por fosa para el desarrollo de la monocapa.

Se utilizaron células entre los pasajes 30 y 60.

VII. 5. EVALUACION DE UN MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE MICROORGANISMOS Y CELULAS DE EPITELIO INTESTINAL

INTRODUCCIÓN

El estudio de la interacción entre los microorganismos y los enterocitos es fundamental para comprender el efecto de la flora intestinal sobre el hospedador.

Aunque existen varios modelos in vitro de células epiteliales intestinales humanas, las células Caco-2 constituyen uno de los sistemas más aceptados para el estudio de las interacciones entre microorganismos y enterocitos humanos (1, 8, 11).

Con respecto a los métodos utilizados para la determinación de concentraciones bacterianas, su confiabilidad, costo y duración depende del microorganismo en estudio así como también del sistema experimental empleado.

Una revisión de los métodos utilizados para determinar la concentración de microorganismos (tanto en suspensión como asociados a células eucarióticas) muestra que los recuentos de bacterias viables y las lecturas espectrofotométricas se encuentran entre las técnicas más comúnmente empleadas. Asimismo se utilizan la

marcación radioactiva, citometría de flujo, recuentos totales, PCR cuantitativa y métodos enzimáticos (4, 7, 14, 16).

Los métodos basados en alguna actividad enzimática microbiana presentan buena sensibilidad y especificidad y permiten la determinación específica de microorganismos en muestras complejas (3, 4). En particular, la capacidad de ciertos microorganismos de reducir nitrato a nitrito en la respiración anaeróbica ha sido utilizada para determinar concentraciones bacterianas y la capacidad de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de interactuar con células HeLa, células uroepiteliales y coágulos de fibrina (16).

El objetivo del presente trabajo es determinar la confiabilidad de la determinación colorimétrica de la actividad nitrato reductásica para la evaluación de concentraciones bacterianas y la interacción de diferentes microorganismos con células de epitelio intestinal humano en cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas de *Escherichia coli* CM1, *Bacillus cereus* 2 y *Bacillus cereus* M2 pertenecen a la colección de cultivos de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas (Universidad Nacional de La Plata). Las cepas de *Salmonella* y *Shigella* fueron cedidas gentilmente por el Dr. Horacio Lopardo del Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Buenos Aires. Asimismo se emplearon las cepas de *Staphylococcus aureus* derivada de

ATCC 25923 y *Escherichia coli* derivada de ATCC 25922. Los microorganismos fueron cultivados en caldo nutritivo (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) adicionado de 1 g/l de nitrato de sodio. Cabe destacar que la presencia de nitrato es importante para la inducción adecuada de la actividad nitrato reductasa (16). Los cultivos de *Escherichia coli*, *Salmonella arizonae*, *Shigella sonnei* y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se realizaron en forma estática a 37°C durante 18 hs. Las

cepas de *Bacillus cereus* se crecieron en BHI (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) a 32°C con agitación durante 18 hs.

Las bacterias fueron colectadas por centrifugación a 10000 g durante 10 min y resuspendidas en PBS, sin previo lavado, hasta alcanzar la absorbancia requerida (600 nm).

Ensayo de nitrato reductasa.

La actividad nitrato reductasa se determinó mediante una reacción de diazotación del nitrito utilizando ácido sulfanílico y N-naftil-etilen-diamonio. El formiato se agregó a la solución inductora además del nitrato, debido a que la formiato deshidrogenasa está estrechamente asociada al sistema de reducción de nitratos (13). La presencia de formiato produce mayores concentraciones de nitrito que en el caso de utilizarse sólo nitrato.

Las muestras se incubaron con una mezcla de 5 partes de nitrato de sodio 1 % (p/v) y 3 partes de formiato de sodio 1 M a 37°C durante diferentes intervalos de tiempo tal como se indica en las figuras correspondientes.

Posteriormente las muestras fueron centrifugadas 1 minuto a 14000 g. Se extrajeron 0,1 ml de sobrenadante que fueron mezclados con 0,1 ml de ácido sulfanílico 1 % (p/v) y 0,1 ml de cloruro de N-naftil-etilen-diamonio 0,02 %, ambos preparados en HCl 1,5 M. La mezcla se dejó durante 10 min a temperatura ambiente para permitir el desarrollo del color y se leyó la absorbancia a 540 nm en un lector de placas (ELISA Plate Reader SLT Rainbow Reader, Wien, Austria).

Estudios cinéticos

Diluciones seriadas de las suspensiones bacterianas conteniendo alrededor de 10^8 ufc/ml se mezclaron con un volumen igual de la solución de nitrato-formiato doble concentración. Las mezclas se incubaron a 37 °C. A

diferentes tiempos, las muestras fueron centrifugadas y la concentración de nitrito se evaluó como se indicó anteriormente. Para calcular la velocidad inicial de reacción, se efectuó una regresión lineal con los primeros puntos de la curva.

Cultivo de enterocitos

Se utilizaron enterocitos humanos (células Caco-2) que fueron obtenidas del Nestle Research Center (Lausanne, Suiza). Las células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium) con 25 mM de glucosa, 20 % de suero fetal bovino (Gen S. A. Buenos Aires, Argentina) inactivado (30 min, 58°C), 1 % de aminoácidos no esenciales (Gibco, Life Technologies, Rockville MD, USA), 12 UI/ml de penicilina, 12 µg/ml de estreptomina, 50 µg/ml de gentamicina y 1.25 µg/ml de fungizona. Para los ensayos de asociación, las células se inocularon en placas de 24 fosas (Iwaki Glass, Japan) a razón de $1,4 \times 10^5$ células por fosa y se incubaron a 37°C en atmósfera compuesta por 95 % de aire y 5 % de CO₂. Las monocapas se utilizaron en postconfluencia tardía luego de 15 días en cultivo entre los pasajes 46 y 58.

Ensayos de asociación

Antes de los ensayos las células fueron lavadas dos veces con PBS.

Posteriormente, se agregaron 0,5 ml de las suspensiones bacterianas con alrededor de 2×10^8 ufc/ml y 0,5 ml de PBS por fosa. Las placas fueron incubadas durante 60 min a 37°C luego de lo cual se efectuaron tres lavados con 0,5 ml de PBS estéril por fosa.

La determinación colorimétrica del porcentaje de asociación se realizó de la siguiente manera: luego de los lavados y de retirar completamente el PBS, se agregaron 0,25 ml de la solución inductora (nitrato-formiato) por fosa y se incubó durante 2 h a 37°C. Luego, las

muestras fueron extraídas de las fosas, centrifugadas a 14000 g durante 1 min y 0,1 ml de cada sobrenadante fueron transferidos a una placa de 96 fosas. El desarrollo de color se realizó mediante el agregado de 0,1 ml de ácido sulfanílico 1 % y 0,1 ml de cloruro de N-naftil-etilendiamonio (ambos preparados en HCl 1,5 M). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min y la intensidad de color se determinó a 540 nm en un lector de placas tal como se indicó anteriormente. Para concentraciones altas de nitrito, las muestras fueron diluidas en PBS previamente a la reacción de diazotación. Suspensiones bacterianas de concentración conocida fueron tratadas de la misma manera en presencia de células Caco-2 para establecer las curvas de calibración. Los porcentajes de asociación se calcularon como $100 \times Cs/Cr$ siendo Cs

la concentración bacteriana de la muestra y Cr la concentración bacteriana patrón (para más detalles ver la figura 57 y la sección Discusión). La asociación se determinó también mediante recuento de microorganismos viables. Para esto, luego de la coincubación entre las bacterias y los enterocitos y posterior lavado, las monocapas fueron lisadas con agua destilada a 37°C durante 1 h. Diluciones apropiadas se plaquearon en ágar nutritivo. Los porcentajes de asociación se calcularon utilizando la cantidad total de bacterias agregadas por fosa como 100 %.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y el test de Tukey para las mínimas diferencias significativas (Systat, Inc)

RESULTADOS

Determinación colorimétrica de nitrito y cinética de la actividad nitrato reductasa

La determinación colorimétrica de nitrito tiene una alta sensibilidad ya que pueden detectarse concentraciones de nitrito tan bajas como 0,58 mM y la linealidad se mantiene hasta concentraciones de 50 mM (datos no mostrados).

La determinación colorimétrica del nitrito producido en suspensiones bacterianas de diferentes concentraciones, mostró una curva bifásica. En la Figura 55 se muestran los resultados obtenidos para *E. coli* CM1. Puede observarse que existe un aumento significativo de la pendiente para suspensiones bacterianas con más de 0,1 unidades de absorbancia (A_{600}). De las 7 cepas ensayadas, solamente *Bacillus cereus* M2 mostró una respuesta lineal (datos no mostrados).

Para determinar si esta respuesta bifásica estaba relacionada con la cinética de reducción de nitrato, se realizaron determinaciones de nitrito a diferentes tiempos. En la Figura 56 se muestran los resultados obtenidos con *E. coli* ATCC 25922. Puede apreciarse que la absorbancia se incrementa con el tiempo y existe una relación sigmoidea entre el tiempo y la intensidad de color (Figura 56 A). La relación entre las velocidades iniciales de reacción y las concentraciones bacterianas se mantuvo lineal en un amplio rango de concentraciones (Figura 56 B). Idénticos resultados fueron obtenidos con *E. coli* CM1 y *S. aureus* ATCC 25923 (datos no mostrados). Es importante destacar que la viabilidad bacteriana no fue afectada por la solución de nitrato-formiato en todo el rango de concentraciones bacterianas ensayadas (datos no mostrados).

Asociación de microorganismos con enterocitos humanos en cultivo

Para evaluar la aplicabilidad del método colorimétrico para la cuantificación de la asociación de microorganismos a enterocitos, se incubaron suspensiones bacterianas con células Caco-2 diferenciadas y se calcularon los porcentajes de asociación según se indica en la Figura 57. Como se observa en la Tabla 18, los más altos porcentajes de interacción se obtuvieron para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ya que esta cepa mostró un 41,7 % de asociación. En contraste, solamente 0,7 % de la cepa M2 de *Bacillus cereus* permaneció asociada a las células.

DISCUSION

De acuerdo a resultados publicados (16) existe una relación lineal entre la concentración de nitrito y la concentración bacteriana en el ensayo colorimétrico de la actividad nitrato reductasa. Este comportamiento, permite el cálculo directo de la concentración bacteriana utilizando las relaciones entre la absorbancia de las muestras y la de suspensiones de concentración bacteriana conocida. En estas condiciones, Cs/Cr será igual a As/Ar (Figura 57).

Sin embargo, en el presente trabajo nosotros demostramos una relación bifásica entre la cantidad de color y la concentración bacteriana (Figura 55) lo cual da lugar a dos zonas correspondientes a bajas y altas concentraciones bacterianas. Resulta evidente en la Figura 57, que las relaciones Cs/Cr y As/Ar son diferentes entre sí cuando existe la mencionada curva bifásica y que las muestras y las suspensiones bacterianas de concentración conocida (referencia) se encontrarán en zonas diferentes de la curva.

Cuando la asociación se calculó en base a los recuentos de bacterias viables, los valores variaron entre 0,05 % y 4,36 % (Tabla 18). Para algunas cepas, los porcentajes de asociación calculados en base a la actividad nitrato reductasa fueron significativamente mayores que los calculados en base a recuentos de bacterias viables. Esto ocurrió para *Escherichia coli* CM1, *Bacillus cereus* 2, *Salmonella arizonae* y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Tabla 18).

Aunque se encuentra una relación lineal entre las velocidades iniciales de reacción y las concentraciones bacterianas en todo el rango de concentraciones ensayadas (Figura 56), el cálculo de las concentraciones bacterianas en base a las velocidades iniciales de reacción constituye un método engorroso y lento. Es aconsejable por lo tanto, asumir el carácter bifásico de las curvas de calibración y realizar el cálculo a partir de las relaciones entre las concentraciones bacterianas y la concentración de nitrito producida. Según se observa en la Figura 57, el porcentaje de asociación será 100 x Cs/Cr. El carácter bifásico de las curvas de calibración podría explicarse teniendo en cuenta el curso sigmoideo de la reacción de reducción. Como puede apreciarse en la Figura 56, a un tiempo fijo, las distancias entre las curvas dependen de la concentración bacteriana. Esta cinética de reacción podría ser debida a la coexistencia de diferentes sistemas relacionados con la reducción de nitrato en las bacterias. En efecto,

varios mecanismos pueden tomar parte de las vías de reducción de nitrato y también existen diferentes posibilidades de regulación (5, 12, 13). Estos sistemas pueden coexistir en la misma bacteria y podrían tener diferentes actividades relativas según la concentración bacteriana.

En referencia a los ensayos de interacción con células Caco-2, debe destacarse que el término “asociación” utilizado en todo este trabajo tiene en cuenta tanto las bacterias adheridas como las internalizadas. Aunque se sabe de la capacidad de invasión de células epiteliales intestinales por parte microorganismos tales como *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Shigella spp* y *Bacillus cereus* (1, 2, 6, 9, 10, 15), nuestros estudios no discriminan entre bacterias adheridas (en la superficie) y bacterias internalizadas. La incubación de las monocapas infectadas con la solución de nitrato-formiato produce una lisis total de las células epiteliales y permite el contacto de todas las bacterias con la solución inductora.

Tal como se muestra en el Tabla 18, los valores de asociación dependen del método empleado. Las diferencias podrían ser atribuidas a la coagregación entre las bacterias y restos celulares ya que, luego del desprendimiento de las células de la superficie de la placa de cultivo, se observan agregados de bacterias y restos celulares a pesar de haberse realizado agitación vigorosa de las suspensiones antes de los recuentos de bacterias viables (datos no mostrados). Esta interacción fue

diferente en las distintas cepas ensayadas. Queda claro que un agregado dará una sola colonia en un recuento en placa, independientemente del número de microorganismos que lo componen.

Estos hallazgos podrían explicar los diferentes valores de asociación encontrados con los métodos estudiados (Tabla 18). Por ejemplo, cuando se empleó el método colorimétrico, los valores de asociación fueron significativamente mayores para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 que para *Shigella sonnei* ($P < 0,05$) mientras que no se obtuvieron diferencias cuando se evaluaron mediante recuentos de bacterias viables. En conjunto, nuestros resultados muestran que la actividad nitrato reductasa bacteriana puede ser usada para determinar concentraciones de microorganismos así como también para estudiar la asociación entre microorganismos y enterocitos humanos siempre que se preste especial atención a la posibilidad de una relación bifásica entre la concentración bacteriana y la intensidad de color desarrollado que presentan algunos microorganismos. Además, la formación de agregados bacterianos no modifica los resultados. Finalmente, como no es necesario un lavado de los microorganismos antes del ensayo, este método no implica la remoción de estructuras superficiales involucradas en la interacciones procariote-eucariote.

REFERENCIAS

1. Bernet M F; Brassart D; Neeser JR; Servin AL. (1993) Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4121-4128.
2. Bernet M F; Brassart D; Neeser JR; Servin AL. (1994) Lactobacillus acidophilus La1 binds to cultured human intestinal cell lines and

- inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut.* 35: 483-489.
3. Bibiloni R; Pérez PF; De Antoni GL . (2000) An enzymatic-colorimetric assay for the quantification of *Bifidobacterium*. *J. Food Prot.* 63: 322-326.
 4. Bibiloni R; Gómez Zavaglia A; De Antoni GL. (2001). Enzyme-based most probable number method for the enumeration of *Bifidobacterium* in dairy products. *J. Food Prot.* 64: 2001-2006.
 5. Bonnefoy V; Demoss JA. (1994) Nitrate reductases in *Escherichia coli*. *Antonie van Leeuwenhoek* 66: 47-56.
 6. Coconnier MH; Lievin V; Lorrot M; Servin AL. (2000) Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against intracellular *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infecting human enterocyte-like Caco-2/TC-7 cells. *Appl Environ. Microbiol.* 66: 1152-1157.
 7. Comas-Riu J; Vives-Rego J. (2002) Cytometric monitoring of growth, sporogenesis and spore cell sorting in *Paenibacillus polymyxa* (formerly *Bacillus polymyxa*). *J. Appl. Bacteriol.* 92: 475-481.
 8. Fogh J; Fogh JM Orfeo T. (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Nat. Cancer Inst.* 59: 221-226.
 9. Guignot J; Bernet-Camard MF; Poüs C; Plançon L; Le Bouguenec C; Servin AL. (2001) Polarized entry of uropathogenic Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strain IH11128 into human epithelial cells: evidence for $\alpha_5\beta_1$ integrin recognition and subsequent internalization through a pathway involving caveolae and dynamic unstable microtubules. *Infect. Immun.* 69: 1856-1868.
 10. Kusters JG; Mulders-Kremers GAW M; van Doornik CEM. van der Zeijst B A M. (1993). Effects of multiplicity of infection, bacterial protein synthesis and growth phase on adhesion to and invasion of human cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 61: 5013-5020.
 11. Minnaard J; Humen M; Pérez PF. (2001) Effect of *Bacillus cereus* exocellular factors on human intestinal epithelial cells. *J. Food Prot.* 64: 1535-1541.
 12. Moreno-Vivián C; Cabello P; Martínez-Luque M; Blasco R Castillo F. (1999) Prokariotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J. Bacteriol.* 181: 6573-6584.
 13. Payne WJ. (1973) Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Microbiol. Rev.* 37: 409-452.
 14. Pérez PF; Minnaard J; Disalvo EA; De Antoni GL. (1998) Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 21-26.
 15. Rowan NJ; Deans K; Anderson JG; Gemmell CG; Hunter IS; Chaithong T. (2001) Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3873-3881.
 16. Shoeb HA; Tawfik AF; Shibi AM. (1991). A nitrate reductase-based colorimetric assay for the study of bacterial adherence. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 270-276.

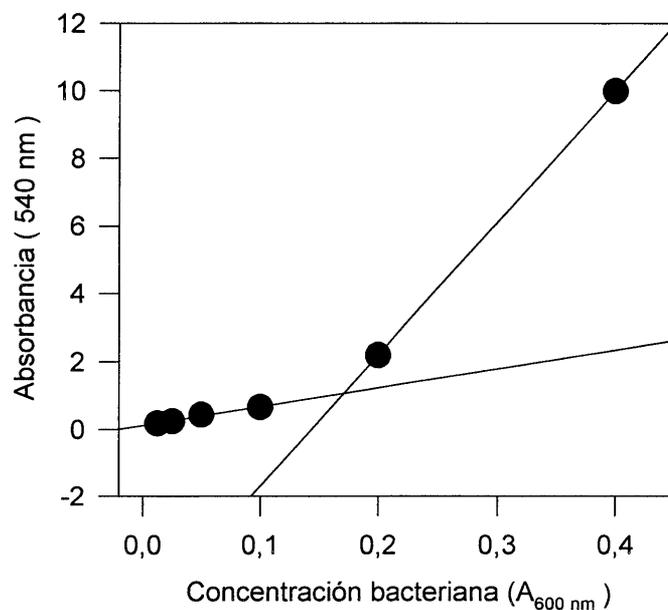


Figura 55: Relación entre la concentración bacteriana y el color desarrollado ($A_{540 \text{ nm}}$) en la determinación colorimétrica de la actividad nitrato reductasa para *E. coli* CM1. Los datos representan los resultados de un experimento representativo. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

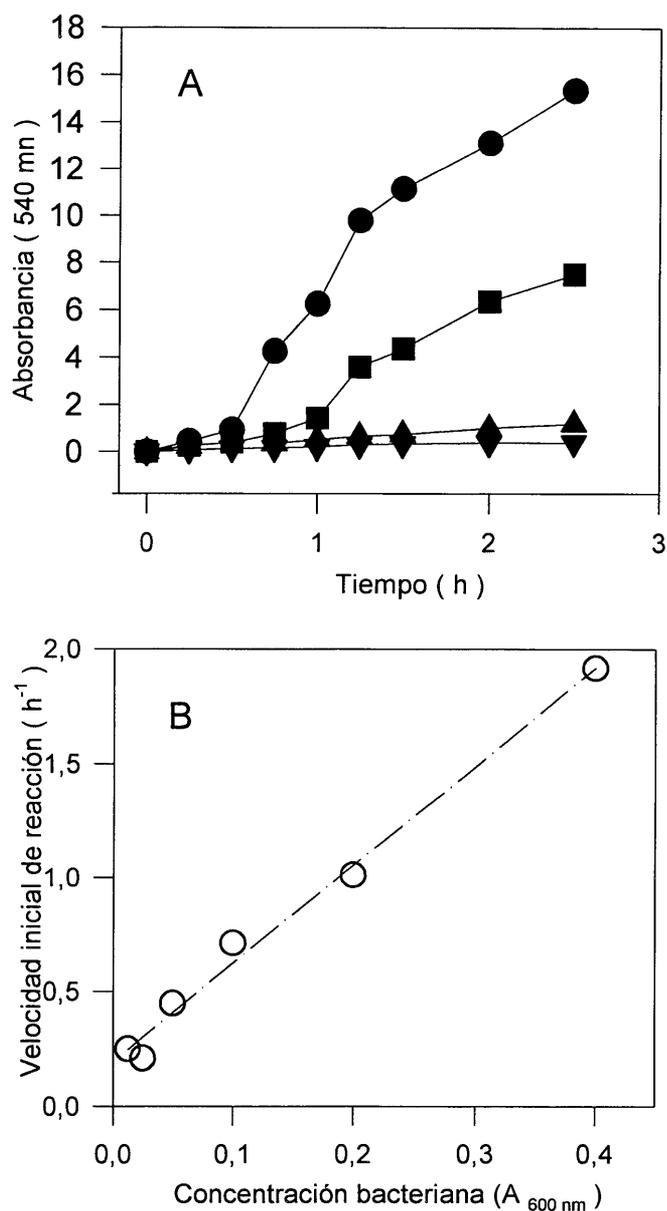


Figura 56: (A) Cinética de la reducción de nitrato para diferentes concentraciones bacterianas ($A_{600 \text{ nm}}$) y (B) gráficos de velocidades iniciales de reacción en función de las concentraciones bacterianas para *Escherichia coli* ATCC 25922. Las concentraciones bacterianas ($A_{600 \text{ nm}}$) para cada cepa son: (▼) 0.05, (▲) 0.1, (■) 0.2 y (●) 0.4. Los datos representan los resultados de un experimento representativo. Resultados similares se obtuvieron en por lo menos 3 experimentos independientes.

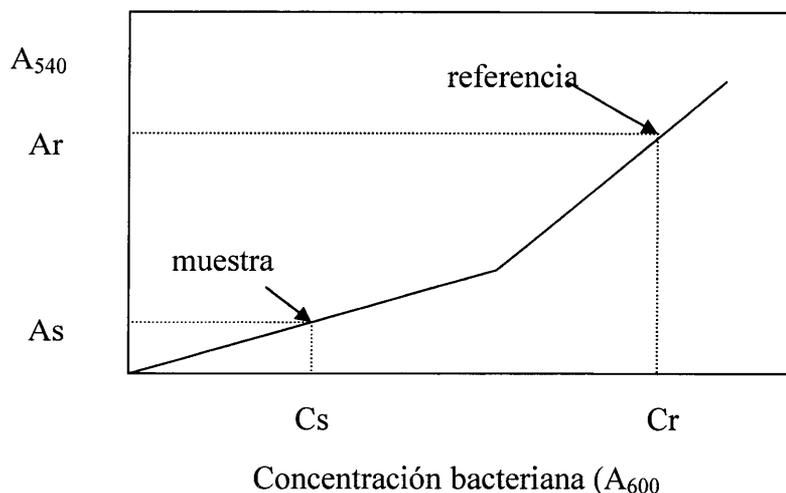


Figura 57: Ejemplo del cálculo de las concentraciones bacterianas teniendo en cuenta la relación bifásica entre las concentraciones bacterianas y el color desarrollado en la reacción de diazotación-copulación. Referencias: A_r : absorbancia (540 nm) para la suspensión bacteriana de referencia; A_s : absorbancia (540 nm) para la muestra; C_r : concentración bacteriana ($A_{600 \text{ nm}}$) de la suspensión de referencia y C_s : concentración bacteriana ($A_{600 \text{ nm}}$) de la muestra. El porcentaje de asociación celular se calcula como $100 \times C_s/C_r$ cuando se agrega una concentración bacteriana C_r por fosa.

Tabla 18: Porcentaje de asociación de diferentes microorganismos luego de 1 h de incubación con células Caco-2 a 37°C. Las determinaciones se realizaron por dos métodos: medición de la actividad nitrato reductásica y recuento de microorganismos viables.

Cepa	Porcentaje de asociación	
	Nitrato reductasa	recuento
<i>Escherichia coli</i> CM1	4.61 ± 0.28^a	$0.31 \pm 0.08^{a*}$
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1.56 ± 1.00^a	0.05 ± 0.02^a
<i>Bacillus cereus</i> 2	18.9 ± 3.8^b	$1.2 \pm 0.1^{ab**}$
<i>Bacillus cereus</i> M2	0.7 ± 0.3^a	0.16 ± 0.03^a
<i>Salmonella arizonae</i>	9.6 ± 0.65^c	$0.55 \pm 0.09^{a**}$
<i>Shigella sonnei</i>	4.96 ± 0.76^a	1.65 ± 0.27^{ab}
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	41.7 ± 7.1^d	$4.36 \pm 1.77^{b**}$

Los valores representan promedios (\pm desviación standard) de 2 a 6 determinaciones en diferentes pasajes celulares. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (nitrato reductasa o recuentos) para la misma cepa. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$. Valores con diferentes letras indican diferencias significativas entre cepas para el mismo tratamiento ($p < 0,05$).



VIII. BIBLIOGRAFIA



VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Agata, N.; Mori, M.; Ohta, M.; Suwan, S.; Ohtani, I. and Isobe, M. 1994. A Novel Dodecadepsipeptide Cereulide, Isolated From *Bacillus Cereus* Causes Vacuole Formation In Hep-2 Cells. FEMS Microbiol. Lett. **121**: 31-34
2. Agata, N.; Ohta, M.; Mori, M. and Isobe, M. 1995^a. A Novel Dodecadepsipeptide, Cereulide, Is An Emetic Toxin Of *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett. **129**: 17-20.
3. Agata, N.; Ohta, M.; Mori, M. and Isobe, M. 1995^b. The bceT Gene of *Bacillus cereus* Encodes An Enterotoxic Protein. Microbiology. **141**: 983-988.
4. Alouf, J. E.. Bacterial Protein Toxins. Chapter 1 in Bacterial Toxins. Methods and Protocols. Vol. 145 in Methods in Molecular Biology. Ed. by Otto Holst, Humana Press, 2000.
5. Andersson, A., Granum, P. and Rönner, U. 1998^a. The Adhesion of *Bacillus cereus* Spores To Epithelial Cells Might Be An Additional Virulence Mechanism. Intern. J. of Food Microb. **39**: 93-99.
6. Andersson, M. A.; Mikkola, R. Helin, J.; Andersson, M. C. and Salkinoja-Salonen, M. 1998^b. A Novel Sensitive Bioassay For Detection of *Bacillus cereus* Emetic Toxin And Related Depsipeptide Ionophores. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 1338-1343
7. Andreeva, Z. I.; Nesterenko, V. F.; Fomkina, M. G.; Ternovsky, V. I.; Suzina, N. E.; Bakulina, A, Y.; Solonin, A. S. and Sineva, E. V. 2007. The Properties of *Bacillus cereus* Hemolysin II Pores Depend On Environmental Conditions. Biochimica et Biophysica Acta **1768** : 253-263.
8. Armstrong, J. K.; Wenby, R. B.; Meiselman, H. J. and Fisher T. C. 2004. The Hydrodynamic Radii of Macromolecules and Their Effect on Red Blood Cell Aggregation. Biophys. Journal. **87**: 4259-4270.
9. Asano, S-I. ; Nukumizu, Y. ; Bando, H. ; Ilzuka, T. amd Yamamoto, T. 1997. Cloning of Novel Enterotoxin Genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Applied Env. Microb. **63**: 1054-1057.
10. Baida, G.E. and Kuzmin, N.P. 1995. Mechanism Of Action of Hemolysin III From *Bacillus cereus*. Biochim. Biophys. Acta **1284**: 122-124.
11. Barth, H.; Aktories, K.; Popoff, M. R. and Stiles, B. G. 2004. Binary Bacterial Toxins: Biochemistry, Biology, and Applications of Common *Clostridium* and *Bacillus* Proteins. Microb. and Mol. Biology Reviews. **68**: 373-402.
12. Bavykin, S. G.; Lysov, Y. P.; Zakhariyev, V.; Kelly, J. J.; Jackman, J.; Stahl, D. A. and Cherni, A. 2004. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and gyrB Gene Sequence Analysis To Determine Phylogenetic Relationships of *Bacillus cereus* Group Microorganisms. J. of Clinical Microb. **42**: 3711-3730.
13. Beecher, D. and Macmillan, J. 1991. Characterization of The Components of Hemolysin BL From *Bacillus cereus*. Infect. and Immunity. **59**: 1778-1784.
14. Beecher, D. J. and Lee Wong, A. C. 1994^a. Identification of hemolysin BL-producing *Bacillus cereus* isolates by a discontinuous hemolytic pattern in blood agar. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 1646-1651.

15. **Beecher, D. and Wong, A.** 1994^b. Identification and Analysis of The Antigens Detected by Two Commercial *Bacillus cereus* Diarrheal Enterotoxin Immunoassay Kits. *Applied and Envir. Microbiology*. **60**: 4614-4616.
16. **Beecher, D. J. and Lee Wong, A. C.** 1994^c. Improved Purification And Characterization Of Hemolysin Bl, A Hemolytic Dermonecrotic Vascular Permeability Factor From *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* **62**: 980-986.
17. **Beecher, D. and Wong, A.** 1997. Tripartite Hemolysin BL from *Bacillus cereus*: Hemolytic Analysis of Component Interactions and a Model For Its Characteristic Paradoxical Zone Phenomenon. *The J. of Biol. Chemistry*. **273**: 233-239.
18. **Beecher, D. J. and Wong, A. C. L.** 2000. Cooperative, Synergistic And Antagonistic Haemolytic Interactions Between Haemolysin BL, Phosphatidylcholine Phospholipase C And Sphingomyelinase From *Bacillus cereus*. *Microb.* **146**: 3033-3039.
19. **Beecher, D. J.; Pulido, J. S.; Barney, N. P. and Lee Wong, A. C.** 1995. Extracellular Virulence Factors In *Bacillus cereus* Endophthalmitis: Methods And Implication of Involvement Of Hemolysin BL. *Infect. Immun.* **63**: 632-639.
20. **Bernet-Camard, M.; Coconnier, M. ; Hudault, S. ; and Servin, A.** 1996. Pathogenicity of the Diffusely Adhering Strain *Escherichia coli* C1845 : F1845 Adhesin-Decay Accelerating Factor Interaction, Brush Border Microvillus Injury, and Actin Disassembly in Cultured Human Intestinal Epithelial Cells. *Infect and Immun.* **64** : 1918-1928.
21. **Bibiloni, R. ; Pérez, P.F. and De Antoni, G.** 1999. Factors Involved in Adhesion of Bifidobacterial Strains to Epithelial Cells en Culture. *Anaerobe*. **5** : 483-485.
22. **Blank, G. and Henderson, H. M.** 1992. Variations in Hydrophobic Behaviour of *Bacillus* Spores. *Lebensm. Wiss Technol.* **25**: 330-333.
23. **Bouillaut, L.; Perchat, S.; Arold, S.; Zorrilla, S.; Slamti, L.; Henry, C.; Gohar, M.; Declerck, N. and Lereclus, D.** 2008. Molecular Basis For Group-Specific Activation of The Virulence Regulator PlcR by PapR Heptapeptides. *Nucleic Acids Research.* **36**: 3791–3801.
24. **Bradford, L.** 1976. A Rapid And Sensitive Method For The Quantitation of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
25. **Brillard, J. and Lereclus, D.** 2007. Characterization Of A Small PlcR-Regulated Gene Co-Expressed With Cereolysin O. *BMC Microb.* **7**:52-60.
26. **Buchanam, R. L. and Schultz, F. J.,** 1994. Comparison of the Tecra VIA kit, Oxoid BCET-RPLA Kit And CHO Cell Culture Assay For The Detection of *Bacillus cereus* Diarrhoeal Enterotoxin. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**: 353-356.
27. **Buchanan, R. L. and Schultz, F. J.** 1992. Evaluation of The Oxoid BCET-RPLA Kit For The Detection of *Bacillus cereus* Diarrheal Enterotoxin As Compared To Cell Culture Cytotoxicity. *J. Food Prot.* **55**: 440-443.
28. **Budarina, Z. I.; Nikitin, D. V.; Zenkin, N.; Zakharova, M.; Semenova, E.; Shlyapnikov, M. G.; Rodikova, E. A.; Masyukova, S.; Ogarkov, O.; Baida, G. E.; Solonin, A. S. and Severinov, K.** 2004. A New *Bacillus cereus* DNA-Binding Protein, HlyIIR, Negatively Regulates

- Expression of *Bacillus cereus* Haemolysin II. Microbiology. **150**: 3691–3701.
29. **Burns, J.; Griffith, A. ; Barry, J. ; Jonas, M. and Chi, E.** 2001. Transcytosis of Gastrointestinal Epithelial Cells by *Escherichia coli* K1. Pediatric Research. **49** : 30-37.
 30. **Busscher H. and Weerkamp, A.** 1989. Specific A Non-Specific Interaction In Bacterial Adhesion To Solid Substrate. FEMS Microbial. Rev. **46**: 165-173.
 31. **Callegan, M. ; Jett, B. ; Hancock, L. and Gilmore, M.** 1999. Role of Hemolysin BL in the Pathogenesis of Extraintestinal *Bacillus cereus* Infection Assessed in an Endophthalmitis Model. Infect. and Immun. **67**: 3357-3366.
 32. **Callegan, M.; Kane, S. T.; Clay Cochran, D.; Gilmore, M. S.; Gominet, M. and Lereclus, D.** 2003. Relationship of plcR-Regulated Factors to *Bacillus* Endophthalmitis Virulence. Infect. and Immun. **71**: 3116–3124.
 33. **Cardazzo, B.; Negrisola, E.; Carraro, L.; Alberghini, L.; Patarnello, T. and Giaccone, V.** 2008. Multiple-Locus Sequence Typing and Analysis of Toxin Genes in *Bacillus cereus* Food-Borne Isolates. Applied And Environmental Microbiology. **74**: 850–860.
 34. **Caroni, P.** 2001. Actin Cytoskeleton Regulation Through Modulation of PI(4,5)P₂ Rafts. The EMBO J. **20**: 4332-4336.
 35. **Chamaillard, M.; Inohara, N. and Nuñez, G.** 2004. Battling Enteroinvasive Bacteria: Nod1 Comes To The Rescue. TRENDS in Microb. **12**: 529-532.
 36. **Chantret, I. ; Rodolosse, A. ; Barbat, A. ; Dussaulx, E. ; Brot-Laroche, E. ; Zweibaum, A. and Rousset, M.** 1994. Differential Expression Of Sucrase-Isomaltase In Clones Isolated From Early And Late Passages of The Cells Line Caco-2 : Evidence For Glucose-Dependent Negative Regulation. J. of Cell Scienc. **107**: 213-225.
 37. **Christie, P.** 2001. Type IV secretion : intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. Mol, Microb. **40**: 294-305.
 38. **Coconnier, M-H. ; Bernet-Camard, M-F. ; and Servin, A.** 1994. How Intestinal Epithelial Cell Differentiation Inhibits The Cell-Entry of *Yersinia pseudotuberculosis* In Colon Carcinoma Caco-2 Cell Line In Culture. Different. **58**: 87-94.
 39. **Crow, V. L. and Gopal, P. K.** 1995. Cell Surface Differences of Lactococcal Strains. Int. Dairy Journal. **5**: 45-68.
 40. **Day, T. L.; Tatini, S. R.; Notermans, S. and Bennett, R. W.** 1994. A Comparison of ELISA And RPLA For Detection of *Bacillus cereus* Diarrhoeal Enterotoxin. J. Appl. Bacteriol. **77**: 9-13.
 41. **Defacque, H.; Bos, E.; Garvalov, B.; Barret, C.; Roy, C.; Mangeat, P.; Shin, H.; Rybin, V. and Griffiths, G.** 2002. Phosphoinositides Regulate Membrane-Dependent Actin Assembly by Latex Bead Phagosomes. Molecular Biology of the Cell. **13**: 1190–1202.
 42. **De-Lorenzo, C.; Piaz, F. D.; Piccoli, R.; Maro, A. D.; Pucci, P. and D'alessio, G.** 1998. Selective And Asymmetric Action of Trypsin On The Dimeric Forms of Seminal RNase. Protein Sci. **7**: 2653-2658.
 43. **Dietrich, R.; Moravek, M.; Bürk, C.; Granum, P. E. and Märklbauer, E.** 2005. Production and Characterization of Antibodies

- Against Each of The Three Subunits of The *Bacillus cereus* Nonhemolytic Enterotoxin Complex. Applied and Environm. Microb. **71**: 8214–8220.
44. **Dramsi, S. and Cossart, P.** 2003. Listeriolysin O-Mediated Calcium Influx Potentiates Entry of *Listeria monocytogenes* into the Human Hep-2 Epithelial Cell Line. Infection and Immunity. **71**: 3614–3618.
45. **Drobniewski, F.A.** 1993. *Bacillus cereus* And Related Species. Clin. Microb. Rev. **6**: 324–338
46. **Duncan-Hewit, W.** Nature of The Hydrofobic Effect In Microbial Cell Surface Hydrofobic. Ed.: Doyle, R. and Rosemberg, American Society of Microbiology, Washington, 1999. p. 39.
47. **Ehling-Schulz, M.; Fricker, M.; Grallert, H.; Rieck, P.; Wagner, M. and Scherer, S.** 2006. Cereulide Synthetase Gene Cluster From Emetic *Bacillus cereus*: Structure And Location On A Mega Virulence Plasmid Related To *Bacillus anthracis* Toxin Plasmid pXO1. BMC Microbiology. **6**:20-31.
48. **Ehling-Schulz, M.; Svensson, B.; Guinebretière, M-H.; Lindbäck, T.; Andersson, M.; Schulz, A.; Fricker, M.; Christiansson, A.; Granum, P. E.; Märtlbauer, E.; Nguyen-The, C.; Salkinoja-Salonen, M. and Scherer, S.** 2005^a. Emetic Toxin Formation Of *Bacillus cereus* Is Restricted To A Single Evolutionary Lineage Of Closely Related Strains. Microbiology. **151**: 183-197.
49. **Ehling-Schulz, M.; Vukov, N.; Schulz, A.; Shaheen, R.; Andersson, M.; Märtlbauer, E. and Scherer, S.** 2005^b. Identification And Partial Characterization of The Nonribosomal Peptide Synthetase Gene Responsible for Cereulide Production in Emetic *Bacillus cereus*. Appl. and Environmental Microb. **71**: 105–113.
50. **Fagerlund, A., Brillard, J., Fürst, R., Guinebretière, M. and Granum, P.** 2007. Toxin Production In A Rare And Genetically Remote Cluster Of Strains of The *Bacillus cereus* Group. BMC Microbiology. **7**:43-51.
51. **Fagerlund, A., Ween, O.; Lund, T.; Hardy, S. P. and Granum, P. E.** 2004. Genetic And Functional Analysis Of The CytK Family Of Genes In *Bacillus cereus*. Microb. **150**: 2689-2697.
52. **Fagerlund, A.; Lindbäck, T.; Storset, A. K.; Einar Granum, P. and Hardy, S. P.** 2008. *Bacillus cereus* Nhe Is A Pore-Forming Toxin With Structural And Functional Properties Similar To The ClyA (Hlye, Shea) Family Of Haemolysins, Able To Induce Osmotic Lysis In Epithelia. Microb. **154**: 693–704.
53. **Fath, K. R.; Mamajiwalla, S. N.; Burgess, D. R.** 1993. The Cytoskeleton In Development Of Epithelial Cell Polarity. J Cell Sci Suppl. **17**: 65-73.
54. **Fernandez, L. E.; Aimanova, K. G.; Gill, S. S.; Bravo, A. and Soberon, M.** 2006. A GPI-Anchored Alkaline Phosphatase Is A Functional Midgut Receptor Of Cry11Aa Toxin In *Aedes aegypti* Larvae. Biochem. J. **394**: 77–84.
55. **Finlay B. and Falkow S.** 1997. Common Themes in Microbial Pathogenicity Revisited. Microb. and Molec. Biology Reviews. **61**: 136-169.
56. **Finlay B. B. and Caparon, M.** Bacterial Adherence to Cell Surfaces and Extracellular Matrix in Cellular Microbiology. Ed. Cossart, P.; Boquet, P.; Normark, S. and

- Rappuoli, R. ASM Press, Washington, DC. 2000. p. 67-80.
57. **Finlay, W. J. J.; Logan, N. A. and Sutherland, A. D.** 1999. Semiautomated Metabolic Staining Assay For *Bacillus cereus* emetic Toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1811-1812.
58. **Fogh, J. M. and Orfeo, T.** 1977. One Hundred And Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors In Nude Mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **59**: 221-226.
59. **Fricker, M.; Messelhäuser, U.; Busch, U.; Scherer, S. and Ehling-Schulz, M.** 2007. Diagnostic Real-Time PCR Assays for the Detection of Emetic *Bacillus cereus* Strains in Foods and Recent Food-Borne Outbreaks. *Applied and Environm. Microbiol.* **73**: 1892-1898.
60. **Fritz, J. H.; Ferrero, R. L.; Philpott, D. J. and Girardin, S. E.** 2006. Nod-like Proteins In Immunity, Inflammation And Disease. *Nature Immun.* **7**: 1250-1257.
61. **Gabriel K. R. and Odoroff C. L.** 1990. Biplots In Biomedical Research. *Stat Med.* **9**: 469-485.
62. **Garrote, G. L.; Delfederico, L.; Bibiloni, R.; Abraham, A. G.; Pérez, P. F.; Semorile, L. and De Antoni, G. L.** 2004. Lactobacilli Isolated From Kefir Grains: Evidence of The Presence of S-Layer Proteins. *Journal of Dairy Research.* **71**: 222-230.
63. **Gavrieli, Y.; Sherman, Y. and Ben-Sasson, S.** 1992. Identification of Programmed Cell Death in Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *The Journal of Cell Biology.* **119** : 493-501
64. **Ghelardi, E.; Celandroni, F.; Salvetti, S. Barsotti, C.; Baggiani, A. and Senesi, S.** 2002. Identification And Characterization of Toxigenic *Bacillus cereus* Isolates Responsible For Two Food-Poisoning Outbreaks. *FEMS Microbiol. Lett.* **208**: 129-134.
65. **Gohar, M., Okstad, O. A.; Gilois, N.; Sanchis, V.; Kolsto, A. B. and Lereclus, D.** 2002. Two Dimensional Electrophoresis Analysis Of The Extracellular Proteome of *Bacillus cereus* Reveals The Importance Of The PlcR regulon. *Proteomics* **2**: 784-791.
66. **Golberg, M. and Sansonetti, P.** 1993. *Shigella* Subversion Of The Cellular Cytoskeleton : Strategy For Epithelial Colonization. *Infect. Immun.* **61**: 4941-4946.
67. **Gominet, M.; Slamti, L.; Gilois, N., Rose, M. and Lereclus, D.** 2001. Oligopeptide Permease Is Required For The Expression of The *Bacillus thuringiensis* PlcR regulon And For Virulence. *Mol. Microbiol.* **40**: 963-975.
68. **Goosney, D. L.; de Grado, M. ang Finlay, B. B.** 1999. Putting *E. coli* On A Pedestal: E Unique System To Study Signal Transduction And The Actin Cytoskeleton. *Trends in Cells Biology.* **9**: 11-14.
69. **Gorczyca, W. ; Gong, J. and Darzynkiewicz, Z.** 1993. Detection of DNA Strand Breaks in Individual Apoptotic Cells by the in Situ Terminal Deoxynucleotidyl Transferase and Nick Translation Assays. *Cancer Research.* **53** : 1945-1951.
70. **Gordon, V. M. and Leppla, S. H.** 1994. Proteolytic Activation of Bacterial Toxins: Role of Bacterial and Host Cell Proteases. *Infection and Immunity.* **62**: 333-340.
71. **Gorina, L. G.; Fluer, F. S.; Olovnikov, A. M. and Ezepcuk, Y. V.** 1975. Use Of The Aggregate-Hemagglutination Technique For

- Determining Exo-Enterotoxin of *Bacillus cereus*. **29**: 201-204.
72. **Granum, P. E.** 1994. *Bacillus cereus* And Its Toxins. J. of Applied Bacteriology Symposium Supplement. **76**: 61-66.
73. **Granum, P. E. and Nissen, H.** 1993. Sphingomyelinase Is Part Of The 'Enterotoxin Complex' Produced By *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett. **110**: 97-100.
74. **Grif, K.; Dietrich, M. P.; Much, P.; Hofer, E.; Allerberger, F.** 2003. Identifying And Subtyping Species Of Dangerous Pathogens By Automated Ribotyping. Diag. Microbiol. Inf. Dis. **47**: 313-320.
75. **Guignot, J. ; Bernet-Camard, M-F. ; Poüs, C. ; Plançon, L. ; Bouguenec, C. ; and Servin, A.** 2001. Polarized Entry of Uropathogenic Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli* Strain IH11128 into Human Epthelial Cells: Evidence for $\alpha_5\beta_1$ Integrin Recognition and Subsequent Internalization through a Pathway Involving Caveolae and Dynamic Unstable Microtubules. Infection and Immunity. **69**: 1856-1868.
76. **Guinebretière, M-H.; Broussolle, V. and Nguyen-The, C.** 2002. Enterotoxigenic Profiles Of Food-Poisoning And Food-Borne *Bacillus cereus* Strains. J. Clin. Microbiol. **40**: 3053-3056.
77. **Hägglom, M. M.; Apetroaie, C. ; Andersson, M. A.; Salkinoja-Salonen, M. S.** 2002. Quantitative Analysis of Cereulide. The Emetic Toxin of *Bacillus cereus*, Produced Under Various Conditions. Appl. Environ. Microbiol. **68**: 2479-2483.
78. **Haller, D.; Russo, M. P.; Balfour Sartor, R. and Jobin, C.** 2002. IKK and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Participate in Non-pathogenic Gram-negative Enteric Bacteria-induced RelA Phosphorylation and NF- κ B Activation in Both Primary and Intestinal Epithelial Cell Lines. The Journal of Biological Chemistry. **277**: 38168–38178.
79. **Hardy, S., Lund, T., and Granum, E.** 2001. CytK Toxin Of *Bacillus cereus* Forms Pores In Planar Lipid Bilayers And Is Cytotoxic To Intestinal Epithelia. FEMS Microbiology Letters. **197**: 47-51.
80. **Harvie, D. R.; Vilchez, S.; Steggles, J. M. and Ellar, D. J.** 2005. *Bacillus cereus* Fur Regulates Iron Metabolism And Is Required For Full Virulence. Microbiology. **151**: 569–577.
81. **Helgason, E.; Økstad, O. A.; Caugant, D. A.; Johansen, H. A.; Fouet, A.; Mock, M.; Hegna, I. and Kolstø, A.** 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*- One Species on the Basis of Genetic Evidence. Applied and Environmental Microbiology. **66**: 2627–2630.
82. **Henderson, B.; Wilson, M.; McNab, R.; and Lax, A.** An Introduction to Cellular Microbiology. Chapter 1 in Cellular Microbiology. Bacteria-Host Interactions in Health and Disease. Ed: John Wiley and Sons, UK, 1999^a. p. 3-22.
83. **Henderson, B.; Wilson, M.; McNab, R.; and Lax, A.** The Cellular Biology Underlying Prokaryotic-Eukaryotic Interactions. Chapter 2 in Cellular Microbiology. Bacteria-Host Interactions in Health and Disease. Ed: John Wiley and Sons, UK, 1999^b. p.: 23-88.
84. **Henderson, B. ; Wilson, M. ; McNab, R. ; and Lax, A.** The

- Prokaryotic and Eukaryotic Signalling Mechanisms. Chapter 3 in Cellular Microbiology. Bacteria-Host Interactions in Health and Disease. Ed: John Wiley and Sons, UK, 1999^c. p.: 89-162.
85. **Henderson, B.; Wilson, M.; McNab, R.; and Lax, A.** Bacterial Adhesion to Host Cells. Chapter 5 in Cellular Microbiology. Bacteria-Host Interactions in Health and Disease. Ed: John Wiley and Sons, UK, 1999^d. p.: 191-221.
86. **Henderson, B.; Wilson, M.; McNab, R.; and Lax, A.** Bacterial Invasion of Host Cells. Chapter 6 in Cellular Microbiology. Bacteria-Host Interactions in Health and Disease. Ed: John Wiley and Sons, UK, 1999^e. p.: 223-272.
87. **Henderson, B.; Wilson, M.; McNab, R.; and Lax, A.** Bacterial Proteins Toxins. Chapter 7 in Cellular Microbiology. Bacteria-Host Interactions in Health and Disease. Ed: John Wiley and Sons, UK, 1999^f. p.: 273-310.
88. **Henderson, B.; Wilson, M.; McNab, R.; and Lax, A.** The Innate Immune Response and Bacterial Infections. Chapter 8 in Cellular Microbiology. Bacteria-Host Interactions in Health and Disease. Ed: John Wiley and Sons, UK, 1999^g. p.: 311-353.
89. **Henderson, B.; Wilson, M.; McNab, R.; and Lax, A.** Acquired Immune in the Defence Against Bacteria. Chapter 9 in Cellular Microbiology. Bacteria-Host Interactions in Health and Disease. Ed: Willey, England, 1999^h. p.: 355-405.
90. **Hess, D. J.; Henry-Stanley, M. J.; Moore, E. A. and Wells, C. L.** 2001. Integrin Expression, Enterocyte Maturation, and Bacterial Internalization. *J. of Surgical Research*. **98**: 116-122.
91. **Huang, G. T. J.; Eckmann, L.; Savidge, T. C. and Kagnoff, M. F.** 1996. Infection of Human Intestinal Epithelial Cells with Invasive Bacteria Upregulates Apical Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) Expression and Neutrophil Adhesion. *The Journal of Clinical Investigation*. **98**: 572-583.
92. **Hudault, S.; Spiller, O. B.; Morgan, P. B. and Servin, A. L.** 2004. Human Diffusely Adhering *Escherichia coli* Expressing Afa/Dr Adhesins That Use Human CD55 (Decay-Accelerating Factor) as a Receptor Does Not Bind the Rodent and Pig Analogues of CD55. *Infection and Immunity*. **72**: 4859-4863.
93. **Hugo A. A.; Kakisu E.; De Antoni G. L. and Pérez P. F.** 2008. Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in vitro. *Lett Appl Microbiol.* **46**: 613-619.
94. **Husmark, U. and Rönner U.** 1990. Forces Involved In Adhesion of *Bacillus cereus* Spores To Solid Surfaces Under Different Environmental Conditions, *J. of Applied Bacteriology*. **69**: 557-562.
95. **InfoStat (2004).** InfoStat versión 2004. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
96. **Isberg, R. and Tran Van Nhie, G.** 1994. Two Mammalian Cell Internalization Strategies Used By Pathogenic Bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **27**: 395-422.
97. **Isberg, R. R.** 1991. Discrimination Between Intracellular Uptake and Surface Adhesion of Bacterial Pathogens. *Science*. **252**: 934-938.

98. **Jackson, S.** 1993. Rapid Screening Test for Enterotoxin-Producing *Bacillus cereus*. *J. of Clinical Microbiology*. **31**: 972-974.
99. **Jacob-Dubuisson, F.; Locht, C. and Antoine, R.** 2001. Two-Partner Secretion In Gram-Negative Bacteria: A Thrifty, Specific Pathway For Large Virulence Proteins. *Mol. Microbiol.* **40**: 306-313.
100. **Jensen, G. B.; Hansen, B. M.; Eilenberg, J. and Mahillon, J.** 2003. The Hidden Lifestyles of *Bacillus cereus* And Relatives. *Environm. Microbiology*. **5**: 631-640.
101. **Kadurugamuwa, J. L.; Mayer, A.; Messner, P.; Sara, M.; Sleytr, U. B. and Beveridge, T. J.** 1998. S-Layered *Aneurinibacillus* and *Bacillus* spp. Are Susceptible to Affinity For Potassium At Physiological Plasma Concentration. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **210**: 39 – 46.
102. **Kansau, I.; Berger, C.; Hospital, M.; Amsellem, R.; Nicolas, V. Servin, L. and Bernet-Camard, M.** 2004. Zipper-Like Internalization of Dr-Positive *Escherichia coli* by Epithelial Cells Is Preceded by an Adhesin-Induced Mobilization of Raft-Associated Molecules in the Initial Step of Adhesion. *Infection and Immunity*. **72**: 3733–3742.
103. **Kaper, J. B. and Karmali, M. A.** 2008. The Continuing Evolution Of A Bacterial Pathogen. *PNAS*. **105**: 4535-4536.
104. **Kim, K and Loessner, M. J.** 2008. *Enterobacter sakazakii* Invasion in Human Intestinal Caco-2 Cells Requires the Host Cell Cytoskeleton and Is Enhanced by Disruption of Tight Junction. *Infection and Immunity*. **76**: 562–570.
105. **Ko, K. S.; Kim, J.; Kim, J.; Kim, W.; Chung, S.; Kim, I. J. and Kook, Y.** 2004. Population Structure of the *Bacillus cereus* Group as Determined by Sequence Analysis of Six Housekeeping Genes and the *plcR* Gene. *Infection and Immunity*. **72**: 5253–5261.
106. **Kotiranta A.; Lounatmaa, K. and Haapasalo, M.** 2000. Epidemiology and Patogénesis of *Bacillus cereus* Infections. *Microbes and Infection*. **2**: 189-198.
107. **Kotiranta, A.; Haapasalo, M.; Kirsti, K.; Kerosuo, E.; Olsen, I.; Sorsa, T.; Meurman, J.; and Lounatmaa, K.** 1998. Surface Structure, Hydrophobicity, Phagocytosis, and Adherence to Matrix Proteins of *Bacillus cereus* Cells With And Without The Crystalline Surface Protein Layer. *Infection and Immunity*. **66**: 4895-4902
108. **Kramer, J. M and Gilbert, R. J.** *Bacillus cereus* Gastroenteritis. Chapter 6 in Food Poisoning. Handbook of Natural Toxins. Volume 7. Ed. by A. T. Tu. Marcel Dekker, Inc. NY, 1992. p. 119-153.
109. **Krauss, G.** Intracellular Messenger Substances : « Second Messengers » . Chapter 6 in Biochemistry of Signal Transduction and Regulation. Ed Wiley-VCHGermany, 1999. p. 216-246
110. **Kurzchalia, T.** 2003. Anthrax Toxin Rafts Into Cells. *The Journal of Cell Biology*. **160**: 295-296.
111. **Kusters, J. ; Mulders-Kremers, G. ; van Doornik, C. ; and van der Zeijst, B.** 1993. Effects of Multiplicity of Infection, Bacterial Protein Synthesis, and Growth Phase on Adhesion to and Invasion of Human Cell Lines by *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity*. **61**: 5013-5020.

112. **Maródi, L.** 2006. Neonatal Innate Immunity to Infectious Agents. *Infection and Immunity*. **74**: 1999–2006
113. **Lee, Y.K.; Lim, C. Y.; Teng, W. L. Ouwehand, A. C.; Tuomola, E. M.; and Salminen, S.** 2000. Quantitative Approach in the Study of Adhesion of Lactic Acid Bacteria to Intestinal Cells and Their Competition with Enterobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 3692-3697.
114. **Lehto, M. T. And Sharom, F. J.** 1998. Release of The Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Enzyme Ecto-5-Nucleotidase By Phospholipase C: Catalytic Activation And Modulation By The Lipid Bilayer. *Biochem. J.* **332**: 101-109.
115. **Liévin-Le Moal, V.; Amsellem, R.; Servin, A. L. and Coconnier, M-H.** 2002. *Lactobacillus acidophilus* (strain LB) From The Resident Adult Human Gastrointestinal Microflora Exerts Activity Against Brush Border Damage Promoted By A Diarrhoeagenic *Escherichia coli* in Human Enterocyte-Like Cells. *Gut*. **50**: 803-811.
116. **Lindbäck, T.; Fagerlund, A.; Rodland, M. S. and Granum, P. E.** 2004. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe Enterotoxin. *Microbiology*. **150**: 3959-3967.
117. **Lund, T. and Granum, P. E.** 1997. Comparison Of Biological Effect Of The Two Different Enterotoxin Complexes Isolated From Three Different Strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology*. **143**: 3329-3336.
118. **Lund, T.; De Buyser, M-L and Granum, P. E.** 2000. A New Cytotoxin From *Bacillus cereus* That May Cause Necrotic Enteritis. *Mol. Microbiol.* **38**: 254-261.
119. **MacMillan, D.; Chalmers, S.; Muir, T. C. and McCarron, J. G.** 2005. IP3-mediated Ca²⁺ Increases Do Not Involve The Ryanodine Receptor, But Ryanodine Receptor Antagonists Reduce IP3-Mediated Ca²⁺ Increases In Guinea-Pig Colonic Smooth Muscle Cells. *J Physiol*. **569**: 533–544.
120. **Madden, J., Ruiz, N. and Caparon, M.** 2001. Cytolysin-Mediated Translocation (CMT): A Functional Equivalent of Type III Secretion in Gram-Positive Bacteria. *Cell*. **104**: 143-152.
121. **Maldonado Galdeano, C. and Perdígón, G.** 2006. The Probiotic Bacterium *Lactobacillus casei* Induces Activation of the Gut Mucosal Immune System through Innate Immunity. *Clinical and Vaccine Immunology*. **13**: 219–226.
122. **Manning, S. D.; Motiwala, A. S.; Springman, A. C.; Qi, W.; Lacher, D. W.; Ouellette, L. M.; Mladonicky, J. M.; Somsel, P. S.; Rudrik, J. T.; Dietrich, S. E.; Zhang, W.; Swaminathan, B.; Alland, D. and Whittam, T. S.** 2008. Variation In Virulence Among Clades of *Escherichia coli* O157:H7 Associated With Disease Outbreaks. *PNAS*. **105**: 4868–4873.
123. **Mäntinen, V. and Lindström, K.** 1998. A Rapid PCR-based DNA Test For Enterotoxic *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1634-1639.
124. **Manual de medios de cultivo.** MERCK. 1994
125. **McCallum, S. and Theriot, J.** Bacterial Manipulation of the Host Cell Cytoeskeleton. Chapter 10 in *Cellular Microbiology*. Ed. Cossart, P.; Boquet, P.; Normark, S. and

- Rappuoli, R. ASM Press, Washington, DC. 2000. p. 171-191.
126. **Meynell, G. G. and Meynell, R.** Bacterial growth. Counts of stained films in Theory and Practice in Experimental Bacteriology. 2nd Ed. University Press, Cambridge. 1970.
127. **Mikami, T.; Horikawa, T.; Murakami, T.; Matsumoto, T.; Yamakawa, A.; Murayama, S.; Katagiri, S.; Shinagawa, K. and Suzuki, M.** 1994. An Improved Method For Detecting Cytostatic Toxin (Emetic Toxin) of *Bacillus cereus* and Its Application To Food Samples. FEMS Microbiology Letters. **119**: 53-58.
128. **Moyer, A. L.; Ramadan, R. T.; Thurman, J.; Burroughs, A. and Callegan, M. C.** 2008. *Bacillus cereus* Induces Permeability of an In Vitro Blood-Retina Barrier. Infection and Immunity. **76**: 1358-1367.
129. **Müller, D.; Hagedorn, P.; Brast, S.; Heussipp, G.; Bielaszewska, M.; Friedrich, A. W.; Karch, H. and Schmidt, M. A.** 2006. Rapid Identification and Differentiation of Clinical Isolates of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), Atypical EPEC, and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* by a One-Step Multiplex PCR Method. Journal of Clinical Microbiology. **44**: 2626-2629.
130. **Notermans, S. and Batt, C. A.** 1998. A Risk Assessment Approach For Food-Borne *Bacillus cereus* and Its Toxins. J. of Applied Microbiology Symposium Supplement. **84**: 51S-61S.
131. **Økstad, O.A.; Gominet, M.; Purnelle, B.; Rose, M.; Lereclus, D. and Kolstø, A.** 1999. Sequence Analysis of Three *Bacillus cereus* Loci Carrying PlcR-Regulated Genes Encoding Degradative Enzymes And Enterotoxin. Microbiology. **145**: 3129-3138.
132. **Paananen, A.; Mikkola, R.; Sareneva, T.; Matikainen, S.; Hess, M. Andersson, M.; Julkunen, I.; Salkinoja-Salonen, M. S. and Timonen, T** 2002. Inhibition of Human Natural Killer Cell Activity By Cereulide, An Emetic Toxin From *Bacillus cereus*. Clin Exp Immunol. **129**: 420-428.
133. **Pece, S.; Chiariello, M.; Murga, C. and Gutkind, J. S.** 1999. Activation of the Protein Kinase Akt/PKB by the Formation of E-cadherin-mediated Cell-Cell Junctions. Evidence for The Association Of Phosphatidylinositol 3-Kinase With The E-Cadherin Adhesion Complex. The Journal of Biological Chemistry. **274**: 19347-19351.
134. **Peiffer, I., A. L. Servin, and M. F. Bernet-Camard.** 1998. Piracy of Decay-Accelerating Factor (CD55) Signal Transduction By The Diffusely Adhering Strain *Escherichia coli* C1845 Promotes Cytoskeletal F-Actin Rearrangements In Cultured Human Intestinal INT407 Cells. Infect. Immun. **66**: 4036-4042.
135. **Pellegatta, F.; Chierchia, S. L. Zocchi, M. R.** 1998. Functional Association of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 and Phosphoinositide 3-Kinase in Human Neutrophils. The Journal of Biological Chemistry. **273**: 27768-27771.
136. **Periago, P., van Schaik, W., Abee, T. And Woters, J.** 2002. Identification of Proteins Involved in the Heat Stress Response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. Applied and Environmental Microbiology. **68**: 3489-3495.

137. **Pinto, M. ; Robine-Leon, S. ; Appay, M-D. ; Kedinger, M. ; Triadou, N. ; Dussaulx, E. ; Lacroix, B. ; Simon-Assmann, P. ; Haffen, K. ; Fogh, J. ; and Zweibaum, A.** 1983. Enterocyte-like Differentiation and Polarization of the Human Colon Carcinoma Cell Line Caco-2 in Culture. *Biol. Cell.* **47**: 323-330.
138. **Pizarro-Cerdá, J. and Cossart, P.** 2004. Subversion Of Phosphoinositide Metabolism By Intracellular Bacterial Pathogens. *Nature Cell Biology.* **6**: 1026-1032.
139. **Plano, G.; Day, J. and Ferraci, F.** 2001. Type III export : New Uses For And Old Pathway. *Mol. Microb.* **40**: 284-293.
140. **Polverino De Laureto, P.; Scaramella, E.; De Filippis, V.; Bruix, M.; Rico, M. and Fontana, A.** 1997. Limited Proteolysis Of Ribonuclease A With Thermolysin In Trifluoroethanol. *Protein Science.* **6**: 860-872.
141. **Pool-Zobel, B. ; Munzner, R. and Holsapfel, W.** 1993. Antigenotoxic Properties Of Lactic Acid Bacteria In Vivo In The Gastrointestinal Tract Of Rats. *Nutr. Cancer* **20**: 271-281.
142. **Preissner, K. T. and Chaatwal, G. S.** Extracellular Matrix and Host Cell Surfaces: Potencial Sites of Pathogen Interaction. Chapter 3 in *Cellular Microbiology.* Ed. Cossart, P.; Boquet, P.; Normark, S. and Rappuoli, R. ASM Press, Washington, DC. 2000. p: 49-65.
143. **Prescott, L.; Harley, J. P.; Klein, D. A.** Asociaciones simbióticas: parasitismo, patogenicidad y resistencia. Capítulo 29 en *Microbiología.* McGraw- Hill. Interamericana. Ed. IV. Madrid. 1999^a. p.: 598-624.
144. **Prescott, L.; Harley, J. P.; Klein, D. A.** Respuesta inmunitaria: antígenos y anticuerpos Capítulo 30 en *Microbiología.* McGraw- Hill. Interamericana. Ed. IV. Madrid. 1999^b. p.: 626-646.
145. **Priest, F. and Austin, B.** Numerical taxonomy. Chapter 2 in *Modern Bacterial Taxonomy.* Ed. Chapman & Hall. U.K. 1993. p. 14-49.
146. **Prüb, B. M.; Dietrich, R. ; Nibler, B.; Martlbauer, E. and Scherer, S.** 1999. The Hemolytic Enterotoxin HBL Is Broadly Distributed Among Species Of The *Bacillus cereus* Group. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5436-5442.
147. **Ramarao, N. and Lereclus, D.** 2006. Adhesion and Cytotoxicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* to Epithelial Cells Are FlhA and PlcR Dependent, Respectively. *Microbes and Infection.* **8**: 1483-1491.
148. **Rappuoli, R. and Pizza, M.** Bacterial Toxins. Chapter 11 in *Cellular Microbiology.* Ed. Cossart, P.; Boquet, P.; Normark, S. and Rappuoli, R. ASM Press, Washington, DC. 2000. p. 193-222.
149. **Rasko, D.; Altherr, M.; Han, C.; and Ravel, J.** 2005. Genomics of the *Bacillus cereus* Group Of Organisms. *FEMS Microbiology Reviews.* **29**: 303-329.
150. **Rowan, N. ; Deans, K. ; Anderson, J. ; Gemmell, C. ; Hunter, I. and Chaithong, T.** 2001. Putative Virulence Factor Expression by Clinical and Food Isolates of *Bacillus spp.* After Growth in Reconstituted Infant Milk Formulae. *Applied and Environmental Microbiology.* **67**: 3873-3881.

151. **Rumbo, M. and Schiffrin, E. J.** 2005. Ontogeny of Intestinal Epithelium Immune Functions: Developmental and Environmental Regulation. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 1288–1296.
152. **Salyers, A. A. and Whitt, D. D.** The Second Line of Defense: Antibodies and Cytotoxic T Cells. Chapter 6 in *Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach*. Ed. 2°. ASM Press, Washington, DC. 2002^a. p. 84-100.
153. **Salyers, A. A. and Whitt, D. D.** Bacterial Strategies for Evading or Surviving the Defense Systems of the Human Body. Chapter 8 in *Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach*. Ed. 2°. ASM Press, Washington, DC. 2002^b. p. 115-130.
154. **Salyers, A. A. and Whitt, D. D.** Bacterial Exotoxins: Important but Still a Mystery. Chapter 9 in *Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach*. Ed. 2°. ASM Press, Washington, DC. 2002^c. p. 131-149.
155. **Salyers, A. A. and Whitt, D. D.** *Yersinia pestis*, the Cause of Plague, and Its Relatives. Chapter 13 in *Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach*. Ed. 2°. ASM Press, Washington, DC. 2002^d. p. 202-215.
156. **Sandkvist, M.** 2001. Biology of Type II secretion. *Mol, Microb.* **40**: 271-283.
157. **Sansonetti, P. J.** 2006. The Innate Signaling Of Dangers And The Dangers Of Innate Signaling. *Nature Immunology.* **7**: 1237-1242.
158. **Scherrer, R. and Gerhardt, P.** 1971. Molecular Sieving by the *Bacillus megaterium* Cell Wall and Protoplast. *Journal of Bacteriology.* **107**: 718-735.
159. **Schesser, K.; Francis, M. S.; Forsberg, A. and Wolf-Watz, H.** Type III Secretion Systems in Animal and Plant Interacting Bacteria. Chapter 13 in *Cellular Microbiology*. Ed. Cossart, P.; Boquet, P.; Normark, S. and Rappuoli, R. ASM Press, Washington, DC. 2000. p. 239-263.
160. **Schmolke, M.; Fabian, J. and Lehr, M.** 2008. High-Performance Liquid Chromatographic Assay With Ultraviolet Spectrometric Detection For The Evaluation of Inhibitors of Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C. *Analytical Biochemistry.* **375**: 291–298.
161. **Schoeni, J. L. and Lee Wong, A. C.** 2005. *Bacillus cereus* Food Poisoning and Its Toxins *Journal of Food Protection,* **68**: 636–648.
162. **Schultz, S. G. and Solomon. A. K.** 1961. Determination of the Effective Hydrodynamic Radii of Small Molecules by Viscometry. *The J. of Gen. Physiology.* **44**: 1189-1199.
163. **Sergeev, N.; Distler, M.; Vargas, M.; Chizhikov, V.; Herold, K.; and Rasooly, A.** 2006. Microarray Analysis of *Bacillus cereus* Group Virulence Factors. *J. of Microbiological Methods.* **65**: 488-502.
164. **Servin, A.** 2005. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews.* **18**: 264-292.
165. **Sheth, P.; Basuroy, S.; Li, C.; Naren, A. P. and Rao, R. K.** 2003. Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Oxidative Stress-induced Disruption of Tight Junctions. *The Journal of Biological Chemistry.* **278**: 49239–49245.
166. **Shinagawa, K., Ichikawa, K., Matsusaka, N., Sugii, S.** 1991. Purification And Some Properties of a *Bacillus cereus* Mouse Lethal Toxin. *J. Vet. Med. Sci.* **53**: 469-474.
167. **Slamti, L. and Lereclus, D.** 2002. A Cell-Cell Signaling Peptide

- Activates The PlcR Virulence Regulon In Bacteria of The *Bacillus cereus* group. The EMBO Journal. **21**: 4550-4559.
168. **Slamti, L. and Lereclus, D.** 2005. Specificity and Polymorphism of the Plc-R-PapR Quorum-Sensing System in the *Bacillus cereus* Group. J. of Bacteriology. **187**: 1182-1187.
169. **Slamti, L.; Perchat, S.; Gominet, M.; Vilas-Bôas, G. ; Fouet, A. ; Mock, M. ; Sanchis, V. ; Chaufaux, J. ; Gohar, M. and Lereclus, D.** 2004. Distinct Mutations In PlcR Explain Why Some Strains Of The *Bacillus cereus* Group Are Nonhemolytic. J. Bacteriol. **186**: 3531-3538.
170. **Sleytr, U. B. and Beveridge, T. J.** 1999. Bacterial S-layers. Trends in Microbiology. **7**: 253-260.
171. **Stenfors Arnesen, L. P.; Fagerlund, A. and Granum, P. E.** 2008. From Soil To Gut: *Bacillus cereus* And Its Food Poisoning Toxins. FEMS Microbiol Rev. **32**: 579-606
172. **Stryer, L.** Mecanismos de acción enzimática. Capítulo 9 en Bioquímica. Ed. 3°. Reverté S. A. Barcelona, 1990. p 207-238.
173. **Szabo, R. A.; Speirs, J. I. and Akhtar, M.** 1991. Cell Culture Detection And Conditions For Production of a *Bacillus cereus* Heat-Stable Toxin. J. Food Prot. **54**: 272-276.
174. **Tang, P.; Sutherland, C. L.; Gold, M. R. and Finlay, B. B.** 1998. *Listeria monocytogenes* Invasion of Epithelial Cells Requires the MEK-1/ERK-2 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. Infection and Immunity. **66**: 1106-1112.
175. **te Giffel, M. C.; Beumer, R. R.; Klijn, N.; Wagendorp, A.; Rombouts, F. M.** 1997. Discrimination Between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Using Specific DNA Probes Based On Variable Regions of 16S rRNA. FEMS Microbiology Letters. **146**: 47-51.
176. **Teplova, V. V.; Mikkolaa, R.; Tonshina, A. A.; Sarisa, N. L. and Salkinoja-Salonena M. S.** 2006. The Higher Toxicity of Cereulide Relative To Valinomycin Is Due To Its Higher affinity for potassium at physiological plasma concentration. Toxicology and Applied Pharmacology **210**: 39 – 46.
177. **Thaenthanee, S.; Lee Wong, A. C. and Panbangred, W.** 2005. Phenotypic And Genotypic Comparisons Reveal A Broad Distribution And Heterogeneity of Hemolysin BL Genes Among *Bacillus cereus* Isolates. Int. J. Food Microbiol. **105**: 203-212.
178. **Tourasse, N.J., Helgason, E., Økstad, O.A., Hegna, I.K. and Kolstø, A.-B.** 2006. The *Bacillus cereus* Group: Novel Aspects Of Population Structure And Genome Dynamics. Journal of Applied Microbiology. **101**: 579-593
179. **Tran Van Nhieu, G. and Sansonetti, P. J.** Cell Adhesion Molecules and Bacterial Pathogens. Chapter 6 in Cellular Microbiology. Ed. Cossart, P.; Boquet, P.; Normark, S. and Rappuoli, R. ASM Press, Washington, DC. 2000. p. 98-113.
180. **Vassileva, M.; Torii, K.; Oshimoto, M.; Okamoto, A.; Agata, N.; Yamada, K.; Hasegawa, T. and Ohta, M.** 2007. A New Phylogenetic Cluster of Cereulide-Producing *Bacillus cereus* Strains. Journal of Clinical Microbiology. **45**: 1274-1277.

181. **Vermes, I. ; Haanen, C. ; Steffens-Nakken, H. ; and Reutelingsperger, C.** 1995. . A Novel Assay for Apoptosis. Flow Cytometric Detection Of Phosphatidylserine Expression On Early Apoptotic Cells Using Fluorescein Labelled Annexin V. *J. of Immunological Methods.* **184**: 39-51.
182. **Virtanen, S. M.; Roivainen, M.; Andersson, M. A.; Ylipaasto, P.; Hoornstra, D.; Mikkola, R.; Salkinoja-Salonen, M. S.** 2008. In Vitro Toxicity Of Cereulide On Porcine Pancreatic Langerhans Islets. *Toxicol.* **51**:1029–1037.
183. **Welch, R. A.** RTX Toxin Structure and Function: A Story of Numerous Anomalies and Few Analogies in Toxin Biology in Pore-Forming Toxins. Ed. G. van der Goot, Switzerland, 2001. p.: 85-111.
184. **Wells, C. L.; van de Westerlo, E. M.; Jechorek, R. P.; Feltis, B. A.; Wilkins, T. D.; Erlandsen, S. L.** 1996. *Bacteroides fragilis* Enterotoxin Modulates Epithelial Permeability And Bacterial Internalization By HT-29 Enterocytes. *Gastroenterology.* **110**: 1429-437.
185. **Wiencek, K. M.; Klapes, N. A. and Foegeding, P. M.** 1991. Adhesion of *Bacillus* Spores To Inanimate Materials: Effects Of Substratum And Spore Hydrophobicity. *Biofouling.* **3**: 139-149.
186. **Wijnands, L. M.; Dufrenne, J. B.; van Leusden, F. M. and Abee, T.** 2007. Germination of *Bacillus cereus* Spores Is Induced by Germinants from Differentiated Caco-2 Cells, a Human Cell Line Mimicking the Epithelial Cells of the Small Intestine. *Applied and Environmental Microbiology.* **73**: 5052–5054.
187. **Williams, P. H. and Clarke, S. C.** 1998. Why do microbes have toxins?. *J. of Applied Microbiology Symposium Supplement.* **84**: 1S-6S.
188. **Wu, G. D.; Wang, W. and Traber, P. G.** 1992. Isolation and Characterization of the Human Sucrase-Isomaltase Gene and Demonstration of Intestine-specific Transcriptional Elements. *The Journal of Biological Chemistry.* **267**: 7863-7870.
189. **Yin, H. L. and Janmey, P. A.** 2003. Phosphoinositide Regulation of The Actin Cytoskeleton. *Annu. Rev. Physiol.* **65**: 761–789.
190. **Zaiss, D. M. W.; Sijts, A. J. and Mosmann; T. R.** 2008. Enumeration of Cytotoxic CD8 T Cells Ex Vivo during the Response to *Listeria monocytogenes* Infection. *Infection and Immunity.* **76**: 4609–4614.
191. **Zenewicz, L. A.; Wei, Z.; Goldfine, H. and Shen, H.** 2005. Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C of *Bacillus anthracis* Down-Modulates the Immune Response. *The Journal of Immunology.* **174**: 8011-8016.

Cuando se indican medidas debe decir siempre μm en lugar de um

Pagina II:

Donde dice: A600

Debe decir: A₆₀₀

Pagina II:

Donde dice: aosciación

Debe decir: asociación

Pagina V:

Donde dice: A600

Debe decir: A₆₀₀

Pagina V:

Donde dice: infectadas

Debe decir: infectados

Pagina VI:

Donde dice: cálulas

Debe decir: células

Pagina VI (Figura 50):

Donde dice: la

Debe decir: las

Pagina VIII

Agregar: DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

Pagina VIII:

Donde dice: Microscopía de barrido

Debe decir: Microscopía electrónica de barrido

Pagina VIII:

Donde dice: Microscopía de transmisión

Debe decir: Microscopía electrónica de transmisión

Pagina 5:

Donde dice: son secretadas al el medio de cultivo

Debe decir: son secretadas al medio de cultivo

Pagina 6:

Donde dice: toxinas como de colérica

Debe decir: toxinas como la colérica

Pagina 6:

Donde dice: Hacker and Koper, 1999

Debe decir: Hacker and Kaper, 1999

Pagina 6:

Donde dice: Henderson et al, 1999⁶

Debe decir: Henderson et al, 1999^e

Pagina 12:

Donde dice: caracterizada

Debe decir: caracteriza

Pagina 13:

Donde dice: bateriana

Debe decir: bacteriana

Pagina 14:

Donde dice: *Bacillus weihenstephannensis*,

Debe decir: *Bacillus weihenstephanensis*,

Pagina 15:

Donde dice: infecciones

Debe decir: infecciones

Pagina 16:

Donde dice: En lo que respecta a los toxoinfecciones

Debe decir: En lo que respecta a las toxoinfecciones

Pagina 16:

Donde dice: sintetisa

Debe decir: sintetiza

Pagina 18:

Donde dice: Day, 1994

Debe decir: Day et al., 1994

Pagina 18:

Donde dice: Rowan et al, 2007

Debe decir: Rowan et al, 2001

Pagina 18:

Donde dice: Sergeev et al, 2005

Debe decir: Sergeev et al, 2006

Pagina 22:

Donde dice: $(A_M/A_{100\%}) \times 100$

Debe decir: $[(A_{0\%} - A_M)/(A_{0\%} - A_{100\%})] \times 100$ donde $A_{0\%}$ es la absorbancia del control 0% de hemólisis

Pagina 26:

Donde dice: durante 2 hs

Debe decir: durante 2 hs o 3 hs

Pagina 27:

Donde dice: EM

Debe decir: EN

Pagina 30:

Donde dice: dejaró

Debe decir: dejó

Pagina 32 (Item III. 2 D.1):

Luego de la 5° viñeta continúa en la 2° columna y en la 3° viñeta de la 2° columna donde dice: Para esto, luego de la 0.45 μm

Debe decir: Para esto, luego de la infección, se extrajo al medio de cultivo cuidando de no tomar células, se filtró por membrana de 0.45 μm y se incubó durante 2 hs a 37°C en 5% de CO₂ sobre una monocapa de 15 días de incubación.

Pagina 33:

Donde dice: DO

Debe decir: A_{600nm}

Pagina 40:

Donde dice: ND

Debe decir: NDp

Pagina 54:

Donde dice: el complejo NHE es el factor tóxico mecanismo se postula..

Luego de factor tóxico continúa en la 2° columna.

Y al final de la 2° columna, párrafo anteúltimo donde dice “Este”

Debe decir: Este mecanismo se postula para la estreptolisina O de *Streptococcus pyogenes* (Madden et al., 2001).

Pagina 54:

Donde dice: formadoreas

Debe decir: formadoras

Pagina 56:

Donde dice: EM

Debe decir: EN

Pagina 60:

Donde dice: T1;

Debe decir: T1.

Pagina 62:

Donde dice: em uma

Debe decir: en una

Pagina 62:

Donde dice: apreciaclaramente

Debe decir: aprecia claramente

Pagina 71:

Donde dice: bacterias adheridas
Debe decir: bacterias asociadas

Pagina 89:

Donde dice: sobre la que cual
Debe decir: sobre la cual

Pagina 102:

Donde dice: *B. vulgatus*
Debe decir: *Bacteroides vulgatus*

Pagina 104:

Donde dice: posibilidad
Debe decir: posibilidad

Pagina 104:

Donde dice: activadasque
Debe decir: activadas que

Pagina 115:

Donde dice: sobre la expresión de del mismo
Debe decir: sobre la expresión del mismo

Pagina 115:

Donde dice: genotípicaspermitiría
Debe decir: genotípicas permitiría

Pagina 121:

Donde dice: diracta
Debe decir: directa

Pagina 125:

Donde dice: coracón
Debe decir: corazón

Pagina 126:

Donde dice: carn
Debe decir: carne

Pagina 127:

Donde dice: amonoácidos
Debe decir: aminoácidos

Pagina 126:

Donde dice: mirosopio
Debe decir: microscopio

MATERIALES Y MÉTODOS

Referencias bibliográficas:

Experimentos de protección osmótica: **Zitzer, A.; Walev, I.; Palmer, M. and Bhakdi, S.** 1995. Characterization of *Vibrio cholerae* El Tor cytolysin as an oligomerizing pore-forming toxin. *Microb. Immun.* **184**: 37-44

Microscopía electrónica de barrido: Pérez, P. F.; Minnaard, J.; Rouvet, M.; Knabenhans, C.; Brassart, D.; De Antoni, G. L. and Schiffrin, E. J. 2001. Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from lactobacilli: an in vitro study. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5037-5042.

Medición de actividad deshidrogenasa mitocondrial: Finlay et al., 1999

Marcación de fosfatidilserina de la membrana citoplasmática. Diferenciación entre apoptosis y necrosis: Vermes et al., 1995

Cuantificación de la adhesión: Guignot et al., 2001.

Cuantificación de la invasión: Guignot et al., 2001.

Hidrofobicidad superficial: Pérez et al., 1998

Naturaleza de las estructuras involucradas en la asociación: Bibiloni et al., 1999.

Efecto del calcio sobre la asociación: Dramsi and Cossart, 2003

BIBLIOGRAFÍA

La cita 112 debe ubicarse luego de la cita 124

Luego de la cita 90 agregar la siguiente cita:

Horwood, P. F.; Burgess, G. W. and Oakey, H. J. 2004. Evidence for non-ribosomal peptide synthetase production of cereulide (the emetic toxin) in *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters.* **236**: 319-324

Luego de la cita 76 agregar la siguiente cita:

Hacker, J. and Kaper, J. B. The Concept of Pathogenicity Islands. Chapter 1 in *Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements*. Edited by Kaper, J. B. and Hacker J., ASM, Washinton, D.C. 1999. p: 1-11.

Luego de la cita 38 agregar la siguiente cita:

Cowan, C.; Jones, H. A.; Kaya, Y. H.; Perry, R. D. and Straley, S. C. 2000. Invasion of Epthelial Cells by *Yersinia pestis*: Evidence for a *Y. pestis*-Specific Invasin. *Infection and Immunity.* **68**: 4523-4530.

Luego de la cita 135:

Pérez, P.; Minnaard, J.; Disalvo, E. De Antoni, G. 1998. Surface Properties of Bifidobacterial Strains of Human Origin. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**,: 21-26.