

**Tesis Doctoral  
2004**



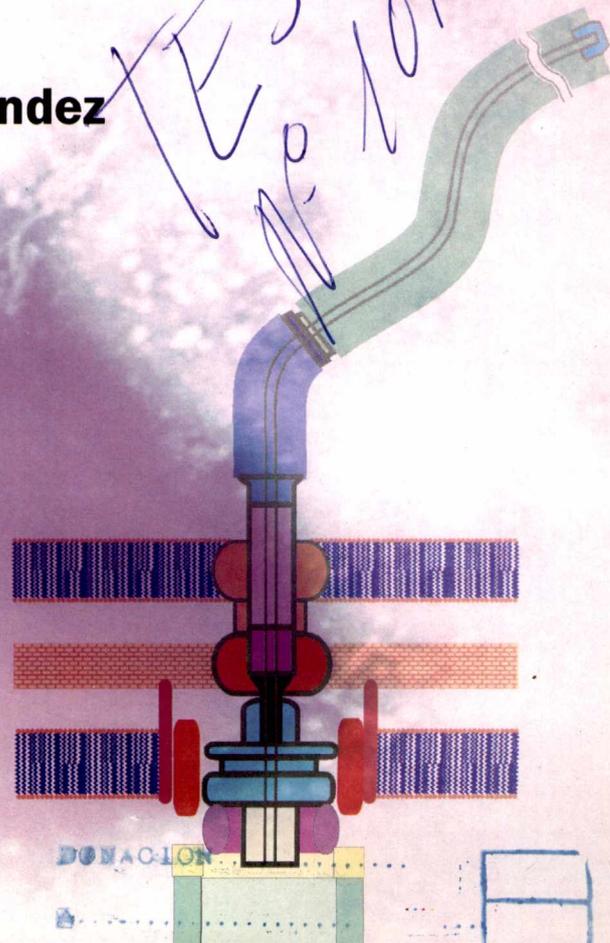
**Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas  
Departamento de Ciencias Biológicas**



Biblioteca Central  
Fac. Cs. Exactas  
U.N.L.P.

**Patogénesis y persistencia de *Bordetella bronchiseptica*  
en el hospedador: requerimientos de la variación  
fenotípica y de los factores de avirulencia**

**Julieta Fernández**



DONACION

Fecha 07-04-05

Inv. 57396

*El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata bajo la Dirección de la Dra. Daniela Hozbor y la Co - dirección del Dr. Osvaldo Yantorno*

---

A Fede por ser mi compañero en la vida, por tanto tiempo dedicado, por enseñarme a no desesperarme ante las dificultades, pero especialmente por tanto amor.

A Valentino por ser la cosita más linda del mundo, por las horas que soportó en el laboratorio, y por las horas de mamá que le faltaron, especialmente en este último tiempo.

A los dos, por hacerme tan feliz.

---

Mi reconocimiento:

Al Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) y a la Facultad de Ciencias Exactas, por haberme brindado el ámbito propicio para desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de las becas que posibilitaron mi dedicación exclusiva a la investigación científica.

Mi agradecimiento:

A la Dra. Daniela Hozbor, por dirigir mi trabajo y mi formación académica, por transmitirme la pasión por las *Bordetellas* y la ciencia en general, por su dedicación para que este trabajo de Tesis haya sido posible, su estímulo permanente y su confianza y por el optimismo y el empuje que trasmite día a día. Pero especialmente por tanto cariño que nos brinda a los tres...  
Por todo esto y muchas cosas más.  
Muchas gracias Dani!!!!

Al Dr Osvaldo Yantorno por haber aceptado co-dirigir este trabajo de Tesis.

Al Dr. Antonio Lagares por permitirme trabajar con comodidad en su laboratorio, por la cesión constante de las computadoras y por sus consejos y apoyo desinteresado.

A Federico Sisti por su colaboración permanente, especialmente en los ensayos con ratones y por ayudarme a preparar los gráficos de este trabajo.

A Maria Florencia Del Papa por estar siempre dispuesta a dar una mano, por tantas horas compartidas de charlas y consejos, y su cariño y apoyo cotidiano.

A Mariano Pistorio por las alegrías y enojos compartidos durante todo este tiempo...y por las torrecitas!

A Augusto Pich Otero por la buena disposición que tiene siempre, por los momentos compartidos ... y por la sangre de los medios!

A Walter Draghi por sus chistes y su buena onda.

A María Laura Molinari por su compañerismo y permanente disponibilidad para colaborar.

A Aníbal Lodeiro por su colaboración inevitable en esta Tesis, por su cariño y los consejos brindados.

A Silvina López García por los eneros y fines de semana compartidos y su compañerismo.

A Tirso Vazquez por su divina locura.

A Ignacio Quelas, Elías Mongiardini y Julia Althabegoiti por su afecto y por darme siempre una mano cuando la necesité.

A Matías Fingermann, Daniela Bottero y María Emilia Gaillard por su interés en nuestro trabajo y por su buena onda.

A Juan Carlos López por los litros y litros de sangre de caballo que utilizamos en los medios de cultivo.

A la Dra. María Eugenia Rodríguez por los ensayos con células de los capítulos IV y V.

A los profesores Gabriel Favelukes, Oscar Grau, Victor Romanowski y Mario Aguilar, por sus consejos y permitirme utilizar sus equipos.

Al CINDEFI por permitirme utilizar los equipos.

A todos mis compañeros del IBBM que de alguna u otra manera me ayudaron durante todos estos años: Laura Balagué, Pablo Riccilo, Juan Carlos López, Verónica López, Cecilia Muglia, Katy López, Mónica Collavino, Germán Robles, Pedro David Gara, Daniel Grasso, Vanina Perez, Omar Riva, Gonzalo Legarreta, Daniel Ghiringuelli, Selma Gago Zachert, María Laura García, Verónica El Mujtar, Diego Posik, Alejandra Manzán, Silvia Moya, Alejandra Tortoricci, Eloisa Arana, Christina Mc Carthy, Cecilia Zaneck, Marina Biedma, Eduardo Peña, Eitel Peltzer, Nora Martinez, Karina Reyes, Laura Diberto, Alicia Cap, Carlitos Illiano, Rubén Bustos y Catalina López.

A todos con los que alguna vez compartí las tardes en la Cátedra de Biología General.

A mis compañeros de Bioquímica I y II, por las horas de clases y de reuniones compartidas.

A mis padres, por estar incondicionalmente dispuestos a ayudarme cuando los necesito, por preocuparse y estar pendientes de todo lo que me pasa, pero fundamentalmente por tanto amor que me dan.

A mi hermana Caro por ser mi compinche de toda la vida, por acompañarme en todo momento, y porque la quiero mucho. Y a Federico por la buena onda.

A Fer, Mariela, Joaquín y Ramiro por los buenos momentos que compartimos y por el cariño que me brindan.

A Juli y Santi por su cariño y por cuidar tantas veces a Valentino.

A Lidi y Mario por su apoyo y cariño.

**INDICE****CAPITULO I**

<b>Introducción</b>	<b>1</b>
Infección bacteriana	3
Estrategias de evasión de la respuesta inmune desarrolladas por el patógeno	9
Interacción <i>Bordetella</i> spp – hospedador	13
Ciclo infeccioso de <i>Bordetella bronchiseptica</i>	16
Factores de virulencia del género <i>Bordetella</i>	17
Adhesinas	17
Hemaglutinina filamentosa (FHA)	17
Fimbrias (Fim)	20
Pertactina (PRN)	21
Otras proteínas autotransportadoras: BrkA, TcfA y Vag8	23
Toxinas	24
Adenilato ciclasa – Hemolisina (AC-Hly)	24
Toxina dermonecrótica (TDN)	27
Toxina citotraqueal (TCT)	28
Toxina pertussis (PTX)	29
Lipopolisacárido	30
Sistemas más complejos que participan en la virulencia	32
Sistema de secreción tipo III	32
Otros factores bacterianos	34
Ureasa	34
Mecanismos de adquisición de hierro	35
Proteínas de membrana externa	36
Flagelo	36
Enzimas asociadas al metabolismo	36
Regulación de la expresión de los factores de virulencia y avirulencia	37
Variación de la expresión de diferentes factores bacterianos <i>in vivo</i>	45
Objetivos de este trabajo de Tesis	46
Objetivos específicos	47
Significado de esta investigación	48

**CAPITULO II**

Microorganismos y condiciones de cultivo	49
Plásmidos y ADN genómico	51
Purificación de plásmidos	51
Extracción del ADN genómico	51
Determinación de la concentración de ADN plasmídico o genómico	51
Electroforesis de ADN	52
Revelado de los genes	52
Tratamientos enzimáticos sobre las preparaciones de ADN	52
Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa	52
Electrotransformación de <i>E. coli</i> . Preparación de células electrocompetentes	52
Aislamiento de diferentes componentes bacterianos y obtención de antisueros específicos	53
Aislamiento de estructuras flagelares	53
Obtención de AC-Hly de <i>B. bronchiseptica</i> mediante cromatografía de afinidad en sistema batch	53
Aislamiento del lipopolisacárido de <i>Bordetella</i> y análisis en geles de SDS-PAGE.	54
Obtención de sueros específicos contra antígenos bacterianos	55
Construcción de mutantes de <i>B. bronchiseptica</i> defectivos en la expresión de un único factor bacteriano	55
Análisis génico de las construcciones realizadas	57
Complementación de los fenotipos alterados en los mutantes defectivos de <i>B. bronchiseptica</i> mediante el empleo de una biblioteca genómica construida en vectores movilizables y replicativos en <i>Bordetella</i>	58
Caracterización fenotípica de los mutantes obtenidos	58
Funcionalidad del sistema BvgAS	58
Expresión de factores de virulencia	59
Expresión de factores de avirulencia	60
Obtención de las proteínas secretadas en los sobrenadantes de cultivo.	61

Identificación de proteínas por huella peptídica	61
Curvas de crecimiento en medios líquidos de la cepa parental Bb 9.73 y los diferentes mutantes defectivos	62
Ensayos de supervivencia en medios líquidos de la cepa parental Bb 9.73 y de los mutantes defectivos.	62
Ensayos de adhesión e invasión a células epiteliales de la cepa parental Bb 9.73 y los mutantes defectivos	63
Ensayos de infección de la cepa parental Bb 9.73 y los mutantes defectivos empleando el modelo de infección intranasal en ratones	64
Determinación de la dosis letal cincuenta (DL50)	64
Cinética de colonización en pulmones murinos	65
Detección de bacterias en los pulmones murinos mediante PCR	65
Análisis estadístico	65
<b>CAPITULO III</b>	
<b>Introducción</b>	66
<b>Resultados</b>	69
Construcción de mutantes de <i>B. bronchiseptica</i> defectivos en la expresión del transductor de señales bvgA y del factor de avirulencia flagelina	69
1- mutante defectivo en la expresión de bvgA	69
2-mutante defectivo en la expresión de flagelina	72
Complementación de los mutantes BbBvgA y Bbfla <sup>-</sup>	73
Análisis de la modulación de fase en cada uno de los mutantes defectivos obtenidos	73
Análisis del perfil electroforético del lipopolisacárido en los mutantes defectivos BbBvgA y Bbfla <sup>-</sup>	74
Análisis de la expresión de los principales factores de virulencia (AC-Hly, FHA y PRN)	75
Análisis de la supervivencia de <i>B. bronchiseptica</i> en cultivos líquidos	76
Metodología general utilizada en todos los ensayos de supervivencia	76
Análisis de la supervivencia de la cepa parental <i>B. bronchiseptica</i> CIP 9.73 en el medio de cultivo sintético de Stainer - Scholte	77
Análisis de la supervivencia de <i>B. bronchiseptica</i>	79

CIP 9.73 en PBS	
Análisis de la supervivencia de <i>B. bronchiseptica</i> CIP 9.73 en medios líquidos partiendo de inóculos bacterianos bajos	80
Análisis de la supervivencia de <i>B. bronchiseptica</i> CIP 9.73 en medios líquidos partiendo de inóculos bacterianos con predominio de fase virulenta	82
Análisis de la supervivencia de <i>B. bronchiseptica</i> CIP 9.73 en medios líquidos partiendo de inóculos con predominio de fase avirulenta	83
Análisis de la supervivencia en medios líquidos de una cepa de <i>B. bronchiseptica</i> que se encuentra bloqueada en la fase avirulenta	84
Análisis de la supervivencia en medios líquidos de una cepa de <i>B. bronchiseptica</i> defectiva en la expresión de un factor de avirulencia	85
Búsqueda de señales inductoras de predominio de fase avirulenta a fase virulenta en sobrenadantes de cultivo	89
<b>Discusión</b>	93
<b>CAPITULO IV</b>	
<b>Introducción</b>	97
Flagelo: estructura	97
Biosíntesis de los diferentes componentes del flagelo. Regulación	100
Ensamblaje del flagelo	102
Funcionalidad del flagelo. Control de la movilidad	103
Flagelo como sistema de secreción. Similitud del sistema flagelar con el sistema de secreción tipo III	103
Flagelo de <i>B. bronchiseptica</i>	105
<b>Resultados</b>	107
Adhesión de <i>Bbfla</i> <sup>-</sup> a células epiteliales en cultivos <i>in vitro</i>	107
Supervivencia de <i>Bbfla</i> <sup>-</sup> en células epiteliales en cultivos <i>in vitro</i>	108
Dosis letal cincuenta y cinética de colonización de <i>Bbfla</i> <sup>-</sup> empleando el modelo de infección intranasal de <i>B. bronchiseptica</i> en ratones	109
Análisis de la reactividad de <i>Bbfla</i> <sup>-</sup> a sueros obtenidos de animales infectados	111
Análisis del perfil de secreción de <i>Bbfla</i> <sup>-</sup> mediante geles de poliacrilamida	111

---

Identificación de algunos polipéptidos diferenciales presentes en los perfiles secretorios de <i>Bbfla</i> <sup>-</sup> y de la cepa parental.	113
<b>Discusión</b>	114
<b>CAPITULO V</b>	
<b>Introducción</b>	119
<b>Resultados</b>	122
Detección del gen de <i>bvgR</i> en el genoma de <i>B. bronchiseptica</i>	122
Construcción de un mutante de <i>B. bronchiseptica</i> defectivo en la expresión del gen <i>bvgR</i>	122
Expresión simultánea de marcadores de virulencia y avirulencia en el mutante <i>BbBvgR</i> <sup>-</sup>	124
Cinética de crecimiento del mutante <i>BbBvgR</i> <sup>-</sup>	127
Adhesión y supervivencia de <i>BbBvgR</i> <sup>-</sup> en cultivos <i>in vitro</i>	128
Estudio del comportamiento de <i>BbBvgR</i> <sup>-</sup> <i>in vivo</i> empleando el modelo de infección intranasal en ratones	129
<b>Discusión</b>	131
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	
<b>Conclusiones Generales</b>	135
<b>REFERENCIAS</b>	
<b>Referencias</b>	139

# **INTRODUCCIÓN**

## **Capítulo I**

## Introducción

Durante la mayor parte de la historia humana las enfermedades infecciosas constituyeron la principal causa de muerte, aparte de las ocasionadas por la guerra. Con la invención de las vacunas (197,328), por un momento pareció haberse derrotado a las enfermedades infecciosas pero a pesar de ello aún quedan dolencias de vieja data por erradicar. Una de ellas es pertussis, tos convulsa o coqueluche, que es una enfermedad infecciosa aguda de las vías respiratorias causada principalmente por *Bordetella pertussis*. Esta enfermedad no sólo no se ha podido erradicar, pese al uso masivo de vacunas desde 1940, sino que en la actualidad ha reemergido (96,97,132,304). Mundialmente se registran por año 60 millones de casos de pertussis, de los cuales 500.000 resultan ser fatales, ocupando el octavo lugar como causa de muerte en niños. Varias son las causas que podrían explicar dicha reemergencia, estando la mayoría de ellas asociadas a deficiencias en la vacuna: baja efectividad, corta duración de la inmunidad conferida e inmunoselección de variantes del agente causal con diferencias inmunogénicas respecto de la cepa vacunal, variantes que incluso pueden implicar un cambio en la sensibilidad a los antibióticos recomendados como terapia (92,94,196,260,267,287,427). Esta situación además se ve agravada porque otras especies del género menos estudiadas, contra las cuales la vacuna no protegería de forma eficiente, también pueden producir infecciones respiratorias en el hombre. *B. parapertussis*, por ejemplo, causa infecciones en humanos con sintomatología similar a pertussis. *B. bronchiseptica*, primeramente descrito como un patógeno de animales, también puede producir enfermedades respiratorias en el hombre y de hecho el número de casos reportados se ha incrementando considerablemente desde 1980 (95,123,159,160,285).

Este incremento significativo de las infecciones causadas por *Bordetella* ha determinado la necesidad de intensificar la búsqueda de mejores estrategias de prevención de las infecciones causadas no sólo por *B. pertussis* sino por las otras especies del género que tienen relevancia epidemiológica. Para ello es necesario contar con un conocimiento acabado acerca de la interacción *Bordetella* - hospedador durante todo el ciclo infeccioso, incluyendo los estadios crónicos por ser los principales focos de contagio de la enfermedad. Sin embargo, el conocimiento disponible es escaso sobre todo en las otras especies del género diferentes de *B. pertussis* que hoy representan un grave problema en el área de salud. *B. bronchiseptica* por ejemplo, requiere de especial atención ya que este microorganismo ahora no sólo es considerado como patógeno del hombre con incidencia creciente, sino que las infecciones causadas por este microorganismo presentan la particularidad de ser persistentes, con la consecuente diseminación de la bacteria entre la población susceptible. Estas bacterias capaces de persistir contribuyen a la existencia de focos silenciosos de contagio dificultando la erradicación efectiva de la enfermedad.

Al igual que para otros microorganismos, la etapa de persistencia de *Bordetella* en el hospedador ha sido la menos estudiada, pero no por ello la menos importante. Es sabido que para que se induzcan enfermedades crónicas las bacterias deben realizar



procesos de implantación, multiplicación, destrucción de las defensas y/o inducción de lesiones en el hospedador y en todas esas etapas el patógeno debe evadir la respuesta inmune del hospedador. Para desarrollar cada uno de estos procesos las bacterias necesitan de múltiples factores (factores de virulencia), entre los que se puede mencionar a componentes de superficie, adhesinas, toxinas y ciertas propiedades más complejas, como la movilidad, el sistema de secreción tipo III, la invasión intracelular, etc. La expresión de cada uno de ellos debe estar regulada en el tiempo en forma precisa, ya que no todos son necesarios simultáneamente en una determinada etapa de la infección. Más aún, se ha propuesto que la capacidad de variar propiedades fenotípicas en respuesta a señales del entorno permitiría a la bacteria optimizar la interacción con el hospedador y así establecer una infección productiva. Es gracias a esta capacidad que se cree que ciertos patógenos, entre los que se puede mencionar a algunas especies del género *Bordetella*, pueden persistir en el hospedador por largos períodos, contribuyendo a la existencia de estadíos crónicos de la infección. El cambio del perfil de expresión de diversos factores además favorecería a la evasión de la respuesta inmune.

En el caso de *B. bronchiseptica* se ha propuesto que el cambio de expresión es esencial para desarrollar el ciclo infeccioso (32,254,397,400). En concordancia con esta hipótesis se ha observado que en casos de infecciones en los cuales se determinó el fenómeno de persistencia, las bacterias aisladas en los estadíos tempranos de la enfermedad expresaban adhesinas y toxinas que no estaban en las bacterias que lograron persistir aún cierto tiempo después de que los síntomas de la enfermedad habían desaparecido (159,160). Ensayos *in vitro* demostraron por otra parte, que la expresión de los factores de virulencia está regulada por un sistema de transducción de señales de dos componentes denominado BvgAS (21,42,101), que en respuesta a señales externas puede alternar entre tres fases fenotípicas diferentes (denominadas virulenta, intermedia y avirulenta). Sin embargo, se desconoce la naturaleza de las señales que inducen el cambio de expresión de los diversos factores *in vivo*. Actualmente se considera a la fase denominada avirulenta como la más apta para persistir en condiciones de escasez de nutrientes, y por lo tanto se la postula como forma de supervivencia en el medio ambiente, entre un hospedador y el siguiente (84,81) o en nichos intracelulares, a salvo de la respuesta inmune humoral del hospedador. Sin embargo, el rol de la fase avirulenta a lo largo del ciclo infeccioso de *B. bronchiseptica* no ha sido completamente determinado.

Para esclarecer estos aspectos hemos dirigido este trabajo de Tesis hacia el análisis tanto *in vitro* como *in vivo* de la colonización y sobrevivencia de cepas salvajes de *B. bronchiseptica* y de mutantes defectivos en la expresión de factores bacterianos regulados por BvgAS construidos por nosotros.

Para una mejor comprensión de nuestro trabajo a continuación haremos una breve descripción de las infecciones microbianas respiratorias en general, de sus etapas y de

los factores en ellas implicados, para luego abordar específicamente la interacción *Bordetella bronchiseptica* – hospedador.

### **Infección bacteriana**

La interacción entre bacterias patogénicas y organismos superiores es un proceso dinámico muy complejo que transcurre a través de una serie de eventos que involucran la participación de múltiples factores bacterianos y de numerosos mecanismos de defensa generados por el hospedador. Un desequilibrio en esta relación entre el microorganismo y el hospedador desencadena un proceso infeccioso. El grado de severidad de la infección varía de acuerdo a la agresividad del microorganismo y al estado inmunológico del hospedador para hacer frente a dicha infección. Algunos agentes infecciosos son de por sí altamente agresivos, independientemente del nivel de defensas del individuo. Otros microorganismos, si bien no producen una infección seria en un paciente previamente sano, se hacen potencialmente agresivos cuando encuentran un individuo con sus defensas disminuidas.

De esta forma, la acción de un microorganismo puede conducir a un breve y autolimitado desbalance en la homeostasis del hospedador de forma que la infección sea de corta duración. Si bien estos casos suelen ser considerados como un triunfo del hospedador sobre el patógeno, los patógenos aprovechan las cortas infecciones agudas para diseminarse, infectando a otros hospedadores susceptibles de forma de perpetuarse en el tiempo. Algunos microorganismos pueden establecer una **infección crónica o persistente**, para ello deben evadir la respuesta del hospedador y a su vez evitar causarle un daño letal al mismo, de forma de mantener un entorno en el cual el patógeno pueda sobrevivir. Los microorganismos desarrollan así lo que se ha definido como "patogenicidad equilibrada" (110) durante la cual el patógeno y el hospedador conviven durante largos períodos de tiempo. Los patógenos denominados oportunistas, es decir bacterias consideradas no - patógenas en condiciones normales, también pueden conducir a infecciones persistentes cuando ocurre un "accidente ecológico", en el cual un microorganismo adaptado a un ambiente dado encuentra inesperadamente, en otro ambiente o en otro hospedador, condiciones que le permiten iniciar un proceso infeccioso.

La relación entre la persistencia de un patógeno y la capacidad de diseminación de la enfermedad en la población puede describirse con la siguiente relación matemática (242):

$$R_0 = B N (\alpha + b + v)^{-1}$$

En la cual  $R_0$  es el número de infecciones secundarias causadas por cada infección primaria,  $B$  es la tasa de transmisión del patógeno,  $N$  es la densidad de la población susceptible,  $\alpha$  es la tasa de mortalidad inducida por el patógeno,  $b$  es la tasa de mortalidad independiente del patógeno y  $v$  es la tasa de recuperación del hospedador

infectado. De acuerdo con esta ecuación, **la persistencia** del patógeno disminuye por un lado los valores de  $\alpha$  debido a que las infecciones persistentes generan un estado de convivencia con el hospedador, causando daños menores y por otro el de  $v$  ya que el paciente no se recupera hasta que no elimine totalmente al microorganismo. En las infecciones crónicas además la transmisión del patógeno ( $B$ ) se ve favorecida debido a que usualmente generan pacientes con síntomas leves o asintomáticos, que en consecuencia no reciben tratamiento, permitiendo que continúen diseminando al microorganismo por largos períodos de tiempo. Por otra parte, la persistencia de un patógeno en el hospedador se ve favorecida cuando las posibilidades de transmisión disminuyen es decir cuando decrece el número de hospedadores susceptibles ( $N$ ).

Un claro ejemplo de este comportamiento es el de *Salmonella enterica* serovar Typhi, donde los pocos pacientes que presentan infección crónica son un reservorio importante y una fuente de contagio muy eficiente, infectando a 16 millones de personas anualmente (185).

Para desencadenar un proceso infeccioso agudo o crónica, el patógeno debe desarrollar una serie de etapas en las que en todo momento debe evadir la respuesta que el hospedador desarrolla frente a su presencia (61,330,462). Estas etapas consisten en: colonización (implantación, adhesión y multiplicación), destrucción de las defensas y / o inducción de lesiones en el hospedador, invasión / persistencia y transmisión a individuos susceptibles o reinfección.

Como primera etapa en la infección, el patógeno ingresa al hospedador, se **adhiere y coloniza** los tejidos que encuentra en la vía de acceso al hospedador (ej. el tracto genital, el tracto digestivo, el tracto respiratorio y la conjuntiva). Una vez dentro del hospedador, el microorganismo se adhiere al tejido del mismo a través de dos etapas sucesivas, según se ha propuesto recientemente (186). En primer lugar se produce una primera adhesión que se caracteriza por ser débil y por ocurrir a través de interacciones inespecíficas y reversibles. Luego, se produce la adhesión definitiva o anclaje, que resulta irreversible y está mediada por la presencia de interacciones específicas adhesina-receptor. Este receptor para la adhesina de la bacteria generalmente consiste en un residuo glucosídico o peptídico que está presente en la membrana de la célula eucariota del hospedador y la adhesina bacteriana consiste en un compuesto macromolecular. La existencia de ambos componentes otorga al proceso de adhesión una alta especificidad y como consecuencia trae aparejada la presencia de tropismo celular e incluso de selectividad de la especie o de la raza del hospedador.

Dentro de las adhesinas la principal familia está representada por sialoglicoconjugados entre las que podemos mencionar a las lectinas microbianas que se encuentran en un gran número de patógenos de mucosas, como *B. pertussis*, *Haemophilus influenzae* y *Escherichia coli* (150,204,371,441). En conjunto estas proteínas se designan como "proteínas microbianas de unión a glicosaminoglicanos" (Gac-p) las cuales interactúan con carbohidratos de los proteínoglicanos sin ligarse a

proteínas. En la Tabla I.1 se detallan a modo de ejemplo algunas de las adhesinas descritas para diferentes patógenos.

Tabla I.1. Adhesinas y sus receptores de diferentes patógenos.

Microorganismo	Enfermedad	Adhesina/Receptor	Célula o tejido del hospedador donde ocurre la adhesión
<i>Bordetella pertussis</i>	Coqueluche.	Hemaglutinina filamentosa, pertactina, fimbrias/?.	Epitelio respiratorio.
		Hemaglutinina filamentosa/CR3	Macrófagos.
Virus influenza	Influenza.	Hemaglutinina viral/ácido neuramínico.	Epitelio respiratorio.
Virus Epstein-Bar	Fiebre Glandular.	Proteína de envoltura viral/CR2.	Células B.
VIH	SIDA.	gp120/CD4.	Células T CD4 <sup>+</sup>
<i>Chlamydia spp</i>	Conjuntivitis, uretritis.	glicosaminoglicano similar a heparina(GAG)/receptor de GAG.	Conjuntiva, epitelio uretral.
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Neumonía atípica.	Pie del micoplasma/ácido neuramínico.	Epitelio respiratorio.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Gonorrea.	Pili tipo IV/residuos de glucosamina.	Epitelio uretral.
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera.	Pili (N-metilfenilalanina)/ Carbohidratos con fucosas o manosas.	Epitelio intestinal.
<i>Escherichia coli</i> (EPEC)	Diarrea.	Intimina/?. Fimbria Tipo I/Carbohidratos.	Epitelio intestinal.
<i>Escherichia coli</i> (UPEC)	Pielonefritis.	Fimbria P/Gal( $\alpha$ 1-4)Gal. Pili P/Globobiosa presente en ceramida.	Tracto urinario.
<i>Escherichia coli</i> (EHEC)	Colitis hemorrágica, SUH.	Intimina/?.	Epitelio colónico.
<i>Salmonella typhimurium</i>	Gastroenteritis.	Fimbrias tipo I y II/receptor de EGF.	Epitelio intestinal.
<i>Salmonella typhi</i>	Fiebre entérica.	Fimbria tipo I/?.	Epitelio intestinal.
<i>Streptococcus mutans</i>	Caries.	Glicosil transferasa/glicoproteína	Dientes.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Neumonía.	Proteína de membrana/N.acetilhexosamina-galactosa.	Epitelio mucoso.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Diferentes enfermedades.	Internalina/?.-	
<i>Yersinia spp</i>	Diarrea.	Invasina, Ail (membrana asociada a membrana), Adhesina de <i>Yersinia</i> /?.	Epitelio intestinal.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Diferentes enfermedades.	Proteína de membrana/Extremo N-terminal de fibronectina.	Epitelio mucoso.
<i>Plasmodium falciparum</i>	Malaria.	merozoito/glicoporina A, B.	Eritrocitos.
<i>Babesia</i>	Babesiosis en gatos.	Adhesión mediada por complemento al receptor de C3b.	Eritrocitos.
<i>Giardia lamblia</i>	Diarrea.	Taglina/manosa-6-P.	Epitelio yeyunal o duodenal.
<i>Entamoeba histolytica</i>	Disentería.	Lectina/conjugados de N-acetilglucosamina.	Epitelio colónico.

Ref. Mims Pathogenesis of Infections Diseases. Fourth Edition. Stephen Ed. 1995, Academic Press. NY.

Además de adhesinas específicas, ha sido descrito que muchas bacterias pueden secretar sustancias de alta viscosidad que facilitan la adhesión no específica. Sería el caso de la cápsula de alginato producida por *Pseudomonas aeruginosa* en los pulmones de los pacientes que sufren Fibrosis quística (80) y de la producción de una membrana de polisacáridos (biofilm) por parte de *Staphylococcus epidermidis* cuando coloniza catéteres endovenosos (318). Por otra parte es muy frecuente encontrar múltiples adhesinas en un mismo patógeno que pueden cumplir funciones complementarias (otorgándole tropismo por diferentes tejidos), o sinérgicas, permitiendo una mayor adhesión a un tejido particular (368).

Una vez adherido de manera específica al tejido blanco, el patógeno se **multiplica**. Para ello utiliza los nutrientes del medio circundante dentro del hospedador. En principio es posible suponer que los fluidos corporales son excelentes medios de cultivo, pero sin embargo, existe limitación en el hierro biodisponible ya que este ión se encuentra secuestrado por moléculas específicas del hospedador (Ej: transferrinas, lactoferrinas). En estas condiciones numerosas bacterias sintetizan y secretan complejantes de hierro con alta afinidad (sideróforos) que compiten por este ión con los quelantes propios del hospedador (56). De esta forma las bacterias son capaces de captar el hierro circulante y utilizarlo para su crecimiento. La delección de estos mecanismos de adquisición de hierro genera cepas que se denominan avirulentas y que no son capaces de inducir infección (178,184,426).

El siguiente paso de una infección es la **diseminación** del patógeno en el hospedador, etapa que requiere en general de un proceso de invasión de la célula a la que previamente se había adherido. Esta capacidad del patógeno de ingresar a una célula puede dar lugar a la infección de un solo tejido, o ser el primer paso de la diseminación del patógeno al resto del organismo. Para ello, algunos patógenos expresan ciertas adhesinas que estimulan la internalización a la célula blanco, por ejemplo la bacteria Gram negativa *Listeria monocytogenes*, a través de dos proteínas InlA y ActA es capaz de introducirse en células epiteliales, inducir la polimerización de actina de la célula y utilizarla para movilizarse entre diferentes células epiteliales (401).

Otros patógenos bacterianos utilizan la inducción de un daño tisular como factor de invasión y es este daño el que produce la enfermedad. La lesión tisular se produce en la mayor parte de los casos producto de la liberación de toxinas. Dentro de estas toxinas están las exotoxinas que son sustancias extracelulares (enzimas) cuyos efectos suelen ser agudos, pudiendo llevar a la muerte del hospedador (ej: botulina, toxina colérica, toxina diftérica). Las exotoxinas son producidas en su mayoría por bacterias Gram positivas. En cambio, las endotoxinas son componentes tóxicos de la membrana celular de las bacterias Gram negativas, siendo el ejemplo más importante el lipopolisacárido (35,340,459). La consecuencia más grave de la acción de las endotoxinas para el hospedador es el shock séptico, que causa hipotensión, fiebre y coagulación intravascular diseminada, llegando generalmente a la muerte. Algunos ejemplos de las toxinas más importantes han sido resumidos en la Tabla I.2.

Tabla I.2. Clasificación de los principales grupos de toxinas bacterianas conocidas hasta el momento.

Clase de toxina	Ejemplo	Modo de acción	Referencia
Endotoxina	Componente lipídico del LPS (lípidio A) de bacterias Gram negativas	Inducción de IL-1, TNF- $\alpha$ , mediada por LBP-CD14-TLR-4	14,39
Exotoxina	Hemolisinas	Formadoras de poros en la membrana o fosfolipasas	279,280, 303
	ADP-ribosilasas. (toxinas colérica y pertussis y toxina de <i>Salmonella</i> ).	Inactivación de proteínas G mediante ADP-ribosilación de las mismas.	240, 251, 308
Moduladoras de actividad enzimática	Adenilato ciclasas. (AC-Hly de <i>B. pertussis</i> , factor edematoso de Anthrax)	Aumento de la cantidad citosólica de AMP <sub>c</sub> .	309.
	Proteín fosfatasas (YopH de <i>Yersinia spp</i> )	No determinado	79,460
	Proteasas de IgA, peptidasa de C5a.	Proteólisis de IgA o C5a	220,320.
Enzimas convertidoras	Toxina botulínica y tetánica.	Bloqueo de neurotransmisión por clivaje de sinaptobrevina	380
	Toxina shiga	Degradación de ARNr	319,321.
Inductoras de vacuolación	VacA de <i>Helicobacter pylori</i>	Desconocido	93,324

La última etapa de un proceso infeccioso es la búsqueda de un nuevo hospedador por parte del patógeno. En este proceso de **reinfección**, el patógeno es capaz de trasladarse desde un hospedador a otro, causando la propagación de la enfermedad. Este es un paso importante del proceso infeccioso ya que permite perpetuar la existencia del patógeno más allá del ciclo de vida del hospedador. El pasaje desde un hospedador a otro en ocasiones requiere de una estadía previa en el exterior del hospedador. Las diferentes situaciones en que puede encontrarse el patógeno marcan la necesidad de una regulación precisa de los diferentes factores involucrados en cada estadio. Esta regulación se encuentra mediada por factores de origen bacteriano o ambientales o ambos. Los primeros incluyen factores involucrados en señalizaciones entre bacterias como el fenómeno de *quorum sensing* (108,180). La concentración de componentes bacterianos particulares hasta un nivel crítico inducen la expresión de determinados genes en toda la población bacteriana. Esta inducción posee la particularidad de ser simultánea en toda la población actuando de esta manera como un todo y no como bacterias particulares. Esto le permite a toda la población responder ante eventos que suceden en el medio ambiente como un aumento importante de la población total, con la consecuente limitación en las fuentes de carbono y energía. En general los componentes utilizados para la señalización de *quorum sensing* son específicos para cada especie, pero en ocasiones es posible observar actividad entre diferentes especies del mismo género (106).

Los factores de origen ambiental pueden ser fisicoquímicos, como temperatura, pH u osmolaridad, o moleculares como la presencia de determinados iones o moléculas más complejas (138,154). Los mecanismos a través de los cuales las bacterias son capaces de sentir la presencia de alguno de los factores ambientales pueden ser clasificados según su ubicación celular. Uno de estos mecanismos está representado

por los sistemas de transducción de señales de dos componentes que tienen un sensor a nivel de membrana que detecta señales externas al microorganismo y un regulador de respuesta citoplasmático. Ambos se activan mediante una cascada de fosforilación y de esta forma activan y / o reprimen la expresión de diferentes genes (179). Entre los sistemas de dos componentes más estudiados se encuentran el sistema PhoP/PhoQ de *Salmonella* (290) y el sistema BvgAS de *Bordetella* (449).

*Vibrio cholerae* presenta activadores transcripcionales ubicados en la membrana plasmática que también responden a señales ambientales, el sistema ToxRS (291).

A continuación (Tabla I.3) se resumen los principales mecanismos de reconocimiento descriptos hasta el momento.

Tabla I.3. Mecanismos de reconocimiento de señales extracelulares por parte de patógenos bacterianos.

Mecanismo de reconocimiento de señales	Ejemplo	Referencia
Mecanismos transmembrana		
Sistemas de dos componentes	PhoPQ ( <i>Salmonella spp</i> )	290
	BvgAS ( <i>Bordetella spp</i> )	449
	SrrAB ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	338
Proteínas activadoras de membrana	ToxRS ( <i>Vibrio spp</i> )	291
	PsaEF ( <i>Yersinia spp</i> )	464
	CCadC/LysP ( <i>E. coli</i> )	447
Mecanismos intracelulares.		
	Proteínas tipo AraC	137
	UreR (Uropatógenos Gram negativos)	107
	VirF ( <i>Yersinia spp</i> )	78
	ToxT ( <i>V. cholerae</i> )	104

La expresión regulada de los diferentes factores bacterianos no sólo es necesaria para el ciclo infección-reinfección sino también a lo largo de todo el proceso infeccioso ya que no en todo momento el patógeno necesita del mismo grupo de factores. Las estrategias de regulación permiten al patógeno el logro de un ciclo infeccioso efectivo.

El delgado equilibrio presente entre los dos protagonistas, patógeno y hospedador, puede perdurar en el tiempo originándose una infección crónica o persistente. De hecho es en esta fase en donde el microorganismo se disemina silenciosamente, producto de procesos adaptativos tendientes a no generar un daño en el hospedador que resulte al final perjudicial para el patógeno. A su vez en estos estadios de la enfermedad, la respuesta inmune por parte del hospedador, al menos, no es suficiente para eliminar al patógeno. El periodo crónico de la enfermedad resultaría así de una evolución conjunta de los dos participantes de la interacción patógeno - hospedador. Un patógeno que perjudica gravemente la salud de su hospedador sólo podrá reproducirse y necesitará de la presencia de un número considerable de hospedadores susceptibles. En cambio, el patógeno que es capaz de persistir de manera crónica dentro del hospedador no necesita de la presencia de un número importante de individuos susceptibles y utiliza al portador asintomático como

reservorio hasta el momento adecuado en que puede diseminarse hacia otro individuo. Esta estrategia de supervivencia del patógeno requiere de una alta especialización de distintos factores necesarios para las diferentes etapas del ciclo infeccioso y por ello una regulación muy estricta de la expresión de los mismos.

### **Estrategias de evasión de la respuesta inmune desarrolladas por el patógeno**

El éxito de un patógeno en causar una infección depende del resultado de todos los pasos antes descritos. Para ello el patógeno debe superar la defensa desarrollada por el hospedador como consecuencia de la presencia y actividad del patógeno.

La respuesta de un hospedador ante un patógeno puede clasificarse en:

a) respuesta inmune innata, que se desencadena ante la presencia de antígenos extraños y microorganismos, y no resulta modificada ante sucesivos contactos. Comprende barreras anatómicas (mucosas y piel intacta y factores mecánicos como peristaltismo a nivel gastrointestinal y movimiento de cilias a nivel respiratorio), moléculas secretadas (que incluyen ácidos orgánicos, proteínas secuestrantes de hierro como lactoferrina y transferrina, y moléculas circulantes como complemento y citoquinas) y componentes celulares como células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), células NK (Natural Killer) y eosinófilos.

b) respuesta inmune adquirida, que es inducida por exposición a antígenos y se ve incrementada ante sucesivos contactos con el mismo antígeno. En ella intervienen anticuerpos específicos, linfocitos T citotóxicos, y citoquinas producidas por los linfocitos T (como IFN- $\gamma$  e IL-4).

Cuando un organismo se encuentra en contacto con una bacteria patógena, las primeras líneas de defensa son los mecanismos de la respuesta inmune innata. Uno de los componentes de esta respuesta son los epitelios que tapizan las superficies del cuerpo, que establecen una barrera física entre el interior del organismo y el medio exterior. Estos epitelios forman la piel y las mucosas que recubren el tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio, el tracto genitourinario y la conjuntiva. En este último caso, existen diversos mecanismos de defensa antibacteriana, uno de ellos es la producción de lactoferrina, una proteína que secuestra hierro, elemento esencial para el desarrollo bacteriano, también se encuentran enzimas como la lisozima y la lactoperoxidasa que actúan eliminando a las bacterias o evitando su crecimiento. Además, el mucus contiene inmunoglobulinas secretorias (mayormente IgA) producidas por las células del tejido submucoso a partir del contacto con las bacterias que colonizan las superficies. El pH ácido de estómago y las enzimas digestivas presentes en el duodeno son una importante barrera para la mayoría de los microorganismos que ingresan por la vía digestiva. Las mucosas a su vez, se encuentran normalmente colonizadas por microorganismos no-patógenos que también actuarían como defensa no sólo porque compiten con los patógenos por los nutrientes presentes en el medio y por la adhesión a las células epiteliales, sino que muchos

también producen sustancias bactericidas, como las colicinas sintetizadas por *E. coli* (399).

Otra barrera importante para el establecimiento de un patógeno en un hospedador son los movimientos peristálticos a nivel gastrointestinal, y el movimiento ciliar del epitelio ciliado a nivel respiratorio. En este último caso se suma la producción de tos como forma de depuración de las vías aéreas cuando el movimiento ciliar se encuentra disminuido o impedido. Ambos mecanismos ejercen fuerzas mecánicas que dificultan la interacción de los patógenos con los epitelios y perjudican así la adhesión de los microorganismos a la célula blanco.

Además de las enzimas y proteínas que se encuentran a nivel de los epitelios, existen varias moléculas que participan de la respuesta inmune innata, como las que forman el sistema de complemento y las citoquinas. El sistema de complemento está formado por más de 25 proteínas producidas por diferentes tejidos y células. Estas proteínas son activadas en forma de cascada por una gran variedad de sustancias, con el fin último de destruir a un microorganismo causando la lisis del mismo, o logrando que sea eliminado por una célula fagocítica. Además, varias citoquinas participan de la respuesta inmune innata, atrayendo a las células fagocíticas al sitio de infección y regulando la actividad de las mismas.

Las células que participan de la respuesta inmune innata son numerosas, y cada una tiene una función particular. Los neutrófilos (polimorfonucleares: PMN) son las células fagocíticas más importantes en la destrucción de bacterias y son las primeras células que acuden al sitio de una infección. Los PMN deben entrar en contacto con la bacteria para poder fagocitarla, esto lo logran a través de receptores que reconocen los lipopolisacáridos de la pared bacteriana o mediante unión a moléculas del hospedador que se encuentran opsonizando al patógeno. Luego entran en juego una gran variedad de mecanismos intracelulares para eliminarlo, que incluyen el estallido respiratorio (moléculas que producen la oxidación de los componentes bacterianos y su destrucción), la acción de enzimas proteolíticas y la acción de lisozima, entre otras. Además de los PMN, existen varias células que participan de la respuesta inmune innata, como las células NK (Natural Killer), importantes en la defensa contra virus, los eosinófilos, que actúan contra parásitos, y los macrófagos derivados de monocitos circulantes, que actúan a nivel de tejidos.

Una segunda línea de defensa, íntimamente relacionada con la respuesta innata, es la respuesta inmune específica o adquirida, que puede tardar varios días en responder a una infección primaria. La respuesta inmune adquirida se caracteriza por la producción de anticuerpos específicos por parte de los linfocitos B, que se conoce como respuesta inmune humoral, y por la respuesta mediada por células en la cual los linfocitos T citotóxicos reconocen al patógeno y lo destruyen. La respuesta a una segunda infección es a menudo más rápida que a la infección primaria debido a la activación de las células T y B de memoria. El funcionamiento en conjunto de los diferentes tipos celulares del sistema inmune es posible gracias a la acción de las citoquinas, lográndose de esta manera una respuesta inmune coordinada.

Por su parte, ciertos patógenos microbianos son capaces de evadir o suprimir casi todos los componentes del sistema inmune humano descritos anteriormente. Nataro y colaboradores (314) han sugerido una clasificación de las estrategias utilizadas por los patógenos para evadir las defensas del hospedador como a) aislamiento, b) evasión de la respuesta inmune humoral, y c) evasión de la respuesta inmune celular.

Aislamiento. Algunas infecciones sobre todo las de tipo crónico se caracterizan por la presencia de una barrera física entre el patógeno y el hospedador, que puede ser un biofilm formado por el microorganismo o por el órgano que infecta. Asimismo, algunas bacterias se encuentran aisladas en abscesos, regiones poco profundas o hueso. Este aislamiento es una barrera a la penetración de la respuesta humoral y un obstáculo para la llegada efectiva de las células fagocíticas. Ejemplos de este mecanismo son la placa dental bacteriana, el biofilm formado por *P. aeruginosa* en los pulmones de pacientes fibroquísticos, y la osteomielitis causada por *S. aureus*.

Evasión de la respuesta inmune humoral. Los patógenos extracelulares deben evitar la acción del complemento y los anticuerpos, incluyendo inhibición de la opsonización, lisis mediada por complemento y citotoxicidad celular mediada por anticuerpos. Ciertos microorganismos tienen moléculas que pueden unirse a los anticuerpos, evitando su acción o mecanismos que inhiben directamente la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B. Los mecanismos mediante los cuales los patógenos evaden la respuesta inmune humoral son muy variados y los patógenos adaptados a la persistencia utilizan generalmente más de un mecanismo, algunos ejemplos se encuentran en la Tabla I.4.

Una estrategia de evasión de la respuesta humoral muy utilizada por diversos patógenos, especialmente los que logran estadios de persistencia en el hospedador, es la variación antigénica. Ésta consiste en cambiar el perfil de antígenos que se expresan en las distintas etapas de una infección. Esta variación puede ocurrir a través de mutaciones o recombinaciones a nivel génico que permiten la variación de la estructura de determinados antígenos en general presentes en la superficie bacteriana (165,219,367) o a través de sistemas de traducción de señales que median la alternancia entre dos estados fenotípicos diferentes (Tabla I.3).

Evasión de la respuesta inmune celular. Todos los patógenos (en particular los que son intracelulares) deben ser capaces de evadir la respuesta inmune celular del hospedador para lo cual han desarrollado diversos mecanismos. Entre ellos se puede mencionar inhibición de alguna de las etapas involucradas en la fagocitosis (contacto, envoltura, formación del fagosoma, fusión del lisosoma con el fagosoma, digestión y muerte). De esta forma muchas bacterias y parásitos pueden sobrevivir y multiplicarse dentro de las células fagocíticas, dentro del fagosoma, o escapando hacia el citoplasma. Otra estrategia desarrollada por los patógenos es causar la muerte de las células de defensa por ejemplo a través de la inducción del fenómeno de apoptosis. La muerte puede ser causada por exotoxinas liberadas por el microorganismo antes de ser fagocitado, o cuando se encuentra dentro del fagosoma.

En la Tabla I.4 se describen algunos ejemplos de evasión de la respuesta celular.

Tabla I.4. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune celular

Mecanismo del hospedador	Mecanismo del patógeno	Bacteria o producto bacteriano purificado
Anticuerpo	Inhibición de adhesión	<i>H. pylori</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>V. cholerae</i>
	Inhibición de la producción	<i>L. monocytogenes</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>S. aureus</i>
	Producción policlonal	Endotoxina de <i>S. enterica</i> serovar Typhi, <i>M. leprae</i> , <i>T. pallidum</i>
Células presentadoras de antígenos	Interferencia de la adquisición de antígenos	<i>H. pylori</i> , <i>S. enterica</i> serovar Typhi
	Interferencia en el procesamiento de antígenos	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium
	Interferencia en la presentación del antígeno	<i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>S. enterica</i> serovar Enteritidis, <i>S. aureus</i>
Complemento	Inhibición de la unión	<i>E. coli</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Citoquinas	Clivaje	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i>
	Inhibición de la unión	<i>Y. pestis</i>
	Mecanismo desconocido	EPEC, EHEC, lactobacilli, <i>M. bovis</i> , <i>V. cholerae</i>
Células dendríticas	Inducción de apoptosis	<i>L. monocytogenes</i>
Linfocitos	Inducción de apoptosis	LPS de bacterias Gram negativas
	Inhibición de la proliferación	<i>B. pertussis</i> , EPEC, EHEC, <i>L. monocytogenes</i> , <i>M. leprae</i> , <i>S. enterica</i> serovar Typhi, <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium, <i>S. enterica</i> serovar Enterica
Macrófagos	Inducción de apoptosis	<i>B. pertussis</i> , EPEC, EHEC, <i>L. pneumophila</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium, <i>S. enterica</i> serovar Enterica, <i>S. aureus</i>
	Inhibición de la inducción de apoptosis	<i>M. bovis</i> BCG, <i>M. tuberculosis</i>
Células NK	Inhibición funcional	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium
Fusión fagosoma – lisosoma	Inhibición de la fusión	<i>B. pertussis</i> , <i>L. pneumophila</i> , <i>M. avium</i> , <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium, <i>Y. enterocolitica</i>
Polimorfonucleares	Inducción de apoptosis	<i>B. pertussis</i> , <i>E. coli</i>
	Inhibición funcional	LPS de <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>Y. pestis</i> , <i>Y. enterocolitica</i>
Células T	Inducción de apoptosis	Toxina A de <i>C. difficile</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>S. flexneri</i>
	Inhibición funcional	<i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>T. Pallidum</i>
Linfocitos B	Inducción de apoptosis	Verotoxinas de <i>E. coli</i> , <i>S. flexneri</i>

Ref. Persistent bacterial infections. Nataro J.P., Blaser M.J. Cunningham-Rundles, S Ed. 2000 ASM Press, Washington, D. C.

La coevolución de los diferentes mecanismos de evasión bacteriana junto a los desarrollados por el hospedador para evitar ser infectados han permitido la aparición de enfermedades del tipo crónico. Estas patologías se destacan por la casi ausencia de

sintomatología y una transmisión moderada de la enfermedad que le permite al patógeno sobrevivir a lo largo del tiempo.

### **Interacción *Bordetella* spp – hospedador**

El género *Bordetella* pertenece a la subclase  $\beta$  de las Proteobacterias y se caracteriza por estar formado por diferentes especies que siguiendo las etapas antes mencionadas inducen procesos infecciosos en una diversidad de hospedadores. Las bacterias del género *Bordetella* se presentan como cocobacilos pequeños (0,2  $\mu\text{m}$  por 0,7  $\mu\text{m}$ ), Gram negativos, aerobios estrictos con metabolismo no fermentativo, asociados a infecciones en humanos y animales. Dentro de este grupo se encuentran también los géneros *Achromobacter* y *Alcaligenes*, que junto a *Bordetella* forman un grupo de organismos muy relacionados entre sí al que se ha denominado complejo *Alcaligenes – Achromobacter – Bordetella* (AAB) (444).

Hasta el momento, han sido reportadas ocho especies dentro del género *Bordetella*. El contenido de GC de las diferentes especies se encuentra entre 61 y 68% y su temperatura de crecimiento óptimo se encuentra comprendido en el rango de 35 a 37° C. Todas las especies aglutinan los eritrocitos de una gran variedad de mamíferos. Son patógenos principalmente de mamíferos, siendo el humano el único hospedador conocido para *B. pertussis*. Varias de las especies se pueden distinguir fácilmente a través de pruebas bioquímicas, entre las que se pueden mencionar prueba de ureasa, catalasa, oxidasa, movilidad y posibilidad de reducir el nitrato (Tabla I.5).

*B. pertussis* es el agente etiológico de la tos convulsa o coqueluche, una enfermedad altamente contagiosa que se caracteriza por episodios de tos paroxística o tos quintosa. Es un patógeno obligado del hombre y no hay evidencia hasta el momento de nichos animales o ambientales para esta bacteria. *B. parapertussis* produce en humanos una sintomatología más leve que *B. pertussis* (37) y en ovejas una neumonía crónica (70). A diferencia de lo que ocurre con *B. pertussis* y *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* presenta un amplio rango de hospedadores posibles, causando enfermedad respiratoria en diversos mamíferos incluyendo a perros, roedores, caballos y cerdos. Recientemente se ha detectado la presencia de *B. bronchiseptica* en humanos, con un claro aumento de su incidencia en dicho hospedador en los últimos años (147,160,461).

A pesar de las diferencias presentadas respecto al rango de hospedadores y de la variedad en los síntomas de la enfermedad, se ha sugerido considerar a estos tres patógenos como subespecies de *B. bronchiseptica* con diferentes adaptaciones. Distintos métodos incluyendo hibridaciones ADN-ADN, comparación de las secuencias de ARN ribosomal 16S y 23S, de las subunidades  $\beta$  de la ARN polimerasa y de la girasa (GyrB), además de los genes involucrados en la virulencia, así lo demuestran (19,311,312,313,463) De aquí en más mencionaremos a las tres especies en su conjunto como pertenecientes al grupo *B. bronchiseptica* como ha sido sugerido por otros autores (325,444) o indistintamente como el grupo de las *Bordetellas* clásicas por ser las más estudiadas.

Los miembros del grupo *B. bronchiseptica* están muy cercanos entre sí genéticamente, sin embargo se pueden observar diferencias entre los genomas que podrían indicar la manera en que se han diferenciado evolutivamente estas especies (413). Quizás el ejemplo más sorprendente se trate de la diferencia en los tamaños de los genomas de estas bacterias (Tabla I.5). Se ha determinado a través de electroforesis de campo pulsante y más recientemente mediante secuenciación que el genoma de *B. pertussis* es varios cientos de kilobases menor respecto al resto de los aislamientos del grupo *B. bronchiseptica* (325). Esto sugiere que la adaptación de *B. pertussis* a un único hospedador podría estar relacionada con esta gran reducción del tamaño de su genoma. La falta de material genético se podría correlacionar con los requerimientos más exigentes para el cultivo *in vitro* de *B. pertussis* y su sensibilidad aumentada a condiciones ambientales respecto al resto del género (334,390). Esta reducción, con la consecuente pérdida en la versatilidad metabólica, ya ha sido reportada para otras bacterias como *Rickettsia spp*, *Mycoplasma spp* y *Chlamydia spp* (16,393).

Tabla I.5.. Principales características de las especies del género *Bordetella*

	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. hinzii</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. trematum</i>	<i>B. petril</i>
Hospedador	Humanos	Humanos, oveja	Mamíferos, incluyendo al humano	¿Humanos?	Aves, humanos	Aves y reptiles	¿Humanos?	Desconocido
Enfermedad	Tos convulsa	Tos convulsa leve	Rinitis atrófica en cerdos, tos ferina en perros y gatos, infecciones respiratorias en humanos	Septicemia, enfermedad respiratoria	Septicemia	Enfermedad respiratoria en el pavo	Desconocido	Desconocido
Lugar de aislamiento	Tracto respiratorio	Tracto respiratorio	Tracto respiratorio, sangre	Tracto respiratorio, sangre	Tracto respiratorio, sangre	-	Heridas, infecciones de oído	-
Contenido G+C (% en moles)	66-68	66-68	66-68	61,5-62,3	65-67	62	64-65	63,8
Tamaño del genoma (kpb) <sup>a</sup>	4086	4773	5338	ND	ND	ND	ND	ND
Crecimiento en agar MacConkey	-	+	+	-/+	+	+	+	ND
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	ND
Oxidasa	+	-	+	-	+	+	-	ND
Asimilación de Citrato	+	+	+	+	+	+	-	ND
Movilidad	-	-	+	ND	ND	+	ND	ND

En general existe muy poca evidencia de adquisición de grandes fragmentos de ADN y de hecho las diferencias observadas entre las distintas subespecies se deberían a eventos independientes de inactivación génica y pérdida de fragmentos de ADN sobre todo por parte de *B. pertussis* y *B. parapertussis*. La presencia de secuencias de inserción rodeando las zonas afectadas apoyan esta hipótesis y sugieren que las deleciones y rearrreglos genómicos resultaron de la recombinación entre dichas secuencias. Este alto grado de rearrreglos observados en estas dos especies no tiene precedentes entre bacterias del mismo género (325).

Estudios más acabados sobre los genomas de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* y su funcionalidad se espera provean suficiente información para estimar el proceso adaptativo de las diferentes especies.

En los últimos años, cinco nuevas especies han sido incluidas en el género *Bordetella*: *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. petrii* y *B. trematum* (Tabla I.5) (23,439,440,456). *B. avium* es el agente causal de enfermedad del tracto respiratorio de las aves de corral, especialmente de pavos. Estudios recientes también la describen como agente causal de infecciones en aves salvajes (343). Los análisis fenotípicos y genotípicos demuestran que *B. avium* es una especie relacionada pero en forma lejana con el resto del grupo *B. bronchiseptica*. Al igual que otras especies del género, *B. avium* sintetiza un conjunto de factores de virulencia regulables por un sistema de traducción de señales de dos componentes y presenta un fuerte tropismo hacia el epitelio traqueal ciliado (23).

*B. hinzii* también se ha podido aislar del tracto respiratorio de aves de corral y en humanos en donde causaría septicemias (206) y ha sido aislada en pacientes inmunocomprometidos (76,134,135). *B. holmesii* se aisló de sangre de pacientes adultos jóvenes y ocasionalmente en esputos o en lavados nasofaríngeos. En algunos casos también se la ha asociado a síntomas coqueluchoides en humanos (273,421,456,465). El primer aislamiento de *B. holmesii* se obtuvo en 1983 y a partir de ese momento el número de aislamientos ha ido aumentando considerándose por ello como un patógeno emergente (273,456).

*B. petrii* es el primer integrante del género *Bordetella* que no fue aislado a partir de una infección en humanos o en algún otro animal. Esta bacteria fue aislada de un biorreactor en condiciones anaerobias (443). La facultad de crecer en medios anaeróbicos presentada por *B. petrii* es interesante ya que introduce un punto de unión entre el grupo clásicamente aerobio de las *Bordetellas* y el presentado por las especies de *Achromobacter*, anaerobias facultativas, integrante del complejo AAB.

*B. trematum* es la especie que más recientemente se ha incorporado al género. Esta especie ha sido aislada de infecciones de oído o heridas en humanos, pero nunca a partir de infecciones del tracto respiratorio. Aún es poco lo que se conoce acerca de este patógeno (439).

A continuación haremos una descripción del estado de conocimiento de la infección causada por *B. bronchiseptica* ya que sobre esta especie desarrollamos nuestro trabajo. La elección del modelo de estudio *B. bronchiseptica* – hospedador se basó en: i) que sobre esta especie, ahora también considerada patógeno del hombre, es menos lo que se conoce comparado con *B. pertussis* ii) que para ella existe un modelo natural de infección animal lo que facilita la interpretación de los resultados y iii) porque presenta un claro período de persistencia en el hospedador que molecularmente es poco conocido.

### **Ciclo infeccioso de *Bordetella bronchiseptica***

*B. bronchiseptica* al igual que las otras especies del género es un cocobacilo Gram negativo aerobio que no utiliza a los hidratos de carbono como fuente de carbono. Es la única especie dentro del grupo de las *Bordetellas* clásicas que en determinadas condiciones ambientales es móvil. Se caracteriza por sobrevivir en condiciones de escasez de nutrientes, logrando persistir por largos períodos de tiempo en buffer fosfato y en agua de fuentes naturales sin agregado de nutrientes (334). Esta alta supervivencia en el medio ambiente es un problema desde el punto de vista epidemiológico, ya que el medio ambiente actuaría como reservorio de este patógeno dificultando la erradicación de las infecciones que causa.

Esta bacteria produce enfermedades respiratorias en una gran variedad de animales domésticos y en ganado porcino pero se ha reportado también que este microorganismo puede causar infección en humanos (95,285). Las infecciones humanas por *B. bronchiseptica* se caracterizaron originalmente por presentarse en personas en contacto con animales infectados, sin embargo la frecuencia de aislamientos ha aumentado considerablemente en las últimas décadas aún en personas sin contacto con animales. Este aumento se observa principalmente en pacientes inmunocomprometidos, por un lado debido al advenimiento de los pacientes infectados con VIH y a los avances de la medicina que permiten una mayor supervivencia, en general, de pacientes inmunodeprimidos. Sin embargo, también se han reportado casos en pacientes inmunocompetentes (408).

Al igual que otros patógenos, el proceso infeccioso de esta bacteria comienza con la colonización y culmina en fenómenos de persistencia y/o diseminación a otros hospedadores. Esto es, la bacteria ingresa a las vías aéreas del hospedador mediante gotitas o aerosoles que contienen al patógeno y una vez dentro del hospedador se adhiere a la mucosa nasofaríngea causando una inflamación leve en la zona. Esta fase de adhesión constituye, como en toda infección, la etapa inicial y crítica de la colonización. Además de presentar tropismo por el epitelio traqueal, *B. bronchiseptica* se adhiere a otros tipos celulares como los macrófagos alveolares, las células dendríticas y diferentes líneas de células epiteliales no ciliadas (59,163,271,349,437).

Una vez adheridas, las bacterias proliferan y luego se diseminan en el tracto respiratorio inferior. Se adhieren al epitelio ciliar y liberan toxinas causando ciliostasis, daño en el epitelio respiratorio e inhibición de funciones de células del sistema inmune del hospedador. En el modelo murino de infección intranasal de *B. bronchiseptica*, se ha podido observar que el pulmón infectado presenta una inflamación perivascular y peribronquial generalizada, con un gran número de células infiltrativas, predominando entre ellas los polimorfonucleares (156). Éstos están distribuidos en todo el pulmón y en algunas áreas se presentan en franco proceso necrótico (156). Varios estudios indican que *B. bronchiseptica* es capaz de invadir y sobrevivir dentro de células epiteliales y fagocíticas (25,163,164,375,382). En este medio intracelular quizás sea donde *B. bronchiseptica* persista y desarrolle la infección crónica característica de esta

especie (265,269). El tipo de respuesta inmune desarrollada en este modelo animal avala el comportamiento intracelular *B. bronchiseptica*.

Para el desarrollo de cada una de las etapas de infección la bacteria requiere de una serie de factores, muchos de los cuales ya han sido identificados y caracterizados. A continuación describiremos los aspectos más sobresalientes de cada uno de ellos.

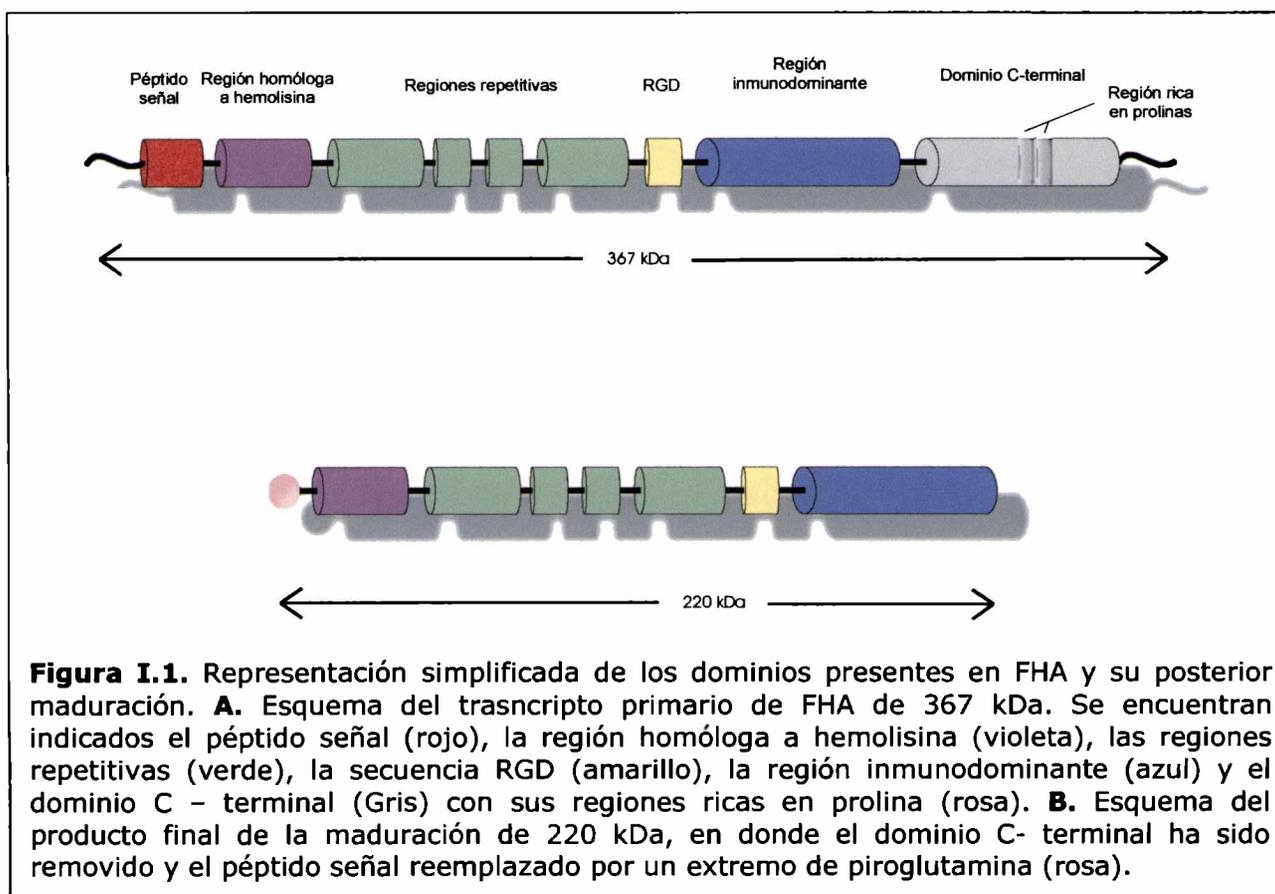
### Factores de virulencia del género *Bordetella*

Las bacterias del género *Bordetella* expresan una serie de factores, denominados factores de virulencia, involucrados en la interacción patógeno -hospedador. Entre los factores de virulencia se encuentran adhesinas, como hemaglutinina filamentosa, fimbrias y pertactina y toxinas como adenilato ciclasa - hemolisina, toxina dermonecrótica, toxina *pertussis* (sólo en *B. pertussis*) y lipopolisacárido, así como sistemas más complejos como el sistema de secreción tipo III.

La primera etapa de una infección es la adhesión del patógeno al epitelio del hospedador. Para ello los patógenos expresan adhesinas que facilitan esta interacción. A continuación se describen las adhesinas presentes en las bacterias del género *Bordetella*.

### Adhesinas

**Hemaglutinina filamentosa (FHA).** Esta proteína (220 kDa) es considerada la adhesina más importante en el proceso infeccioso de *Bordetella*. Está asociada a la



superficie de la bacteria y además es secretada al medio extracelular para facilitar la adhesión del patógeno a las células epiteliales ciliadas (87). Presenta una estructura filamentosa de 2 nm de diámetro y 45-50 nm de longitud que consiste en 19 hojas  $\beta$  plegadas que formarían un barril  $\beta$  que atraviesa la membrana externa (261). El modelo actualmente aceptado es que esta estructura se forma por el plegamiento de la cadena polipeptídica formando una horquilla dividida en tres partes. Las regiones C y N terminal de la cadena polipeptídica forman la cabeza de la horquilla, la región RGD (debe su nombre a la presencia de un triplete arginina - glicina - aspártico) forma la cola y el resto forma la región central, que mantiene la integridad de la estructura (261).

El gen estructural de esta adhesina, *fhaB* tiene aproximadamente 10.1 kb y codifica para una proteína precursora de FHA de 367 kDa, FhaB. Este precursor sufre una serie de modificaciones antes de que la proteína madura, que corresponde a las dos terceras partes del extremo N terminal de FhaB sea secretada al exterior (Fig. I.1) (98,353).

La secreción es dependiente de la expresión de una proteína accesoria, FhaC, cuyo gen se encuentra río abajo de *fhaB* en un cluster de genes accesorios involucrados en la secreción tanto de FHA como de las fimbrias (253,457). La secreción de FHA requiere de una región de 115 aminoácidos presente en el extremo N-terminal de FhaB que posee homología con regiones presentes en las hemolisinas de otras bacterias, como *Serratia marcescens* y *Proteus mirabilis* (98). Por otra parte FhaC presenta homología con una proteína que facilita la exportación de una adhesina de *Haemophilus influenzae*, HMWA (26). Los precursores de ambas adhesinas, además, presentan una región homóloga formada por 22 aminoácidos iniciales, seguida de un segmento catiónico y un fragmento hidrofóbico. Esta región actuaría como un péptido señal de inusual tamaño (71 aminoácidos) que es removido antes de la exportación (194). La proteólisis del péptido señal se realiza en un sitio consenso para la denominada peptidasa de región líder (Lep), lo cual sugiere que FhaB atraviesa la membrana interna por un mecanismo sec dependiente (234). El tercio C-terminal de FhaB actuaría como chaperona en este proceso de secreción, estabilizando a la proteína, previniendo el plegado incorrecto de la misma y permitiendo el reconocimiento por parte del sistema Sec (354). Esta región también podría estar involucrada en el anclaje de la proteína a la capa de peptidoglicano, debido a que presenta una zona rica en prolina que cumpliría esta función en proteínas de membrana externa de bacterias Gram positivas, como la proteína M de estreptococos (105).

Por otra parte, la liberación de FHA al medio extracelular parece requerir de la presencia de una proteasa de membrana denominada SphB1 (88). Ha sido reportado que bacterias deficientes en la expresión de esta proteasa no liberan FHA al medio extracelular, aunque sí es posible detectar la presencia de estructuras pertenecientes a FHA en la membrana (88). Además, la actividad de SphB1 jugaría un rol importante

durante el proceso infeccioso de *Bordetella*, permitiendo la liberación de la bacteria para colonizar otras zonas del epitelio (87).

Varios son los dominios de FHA que están involucrados en el pegado a las superficies del hospedador. Estos incluyen unión a fagocitos mediada por integrinas, unión a azúcares sulfatados de la matriz extracelular y de las células epiteliales y adhesión a células epiteliales ciliadas (403). La región responsable de esta adhesión es un dominio tipo lectina que se denomina CRD (por la sigla en inglés Carbohydrate Recognition Domain) y se encuentra entre los residuos 1141 y 1279 de FHA. Este dominio tiene afinidad particular por carbohidratos y glicolípidos (especialmente lactosilceramidas) y participa en la unión de la bacteria a las células ciliadas y a los macrófagos (339). FHA también puede unirse a heparina y a glicolípidos sulfatados no cargados (281). La región que permite esta adhesión comprende los aminoácidos 442-863 ubicados en el extremo amino terminal de la proteína, que también es responsable de la actividad hemaglutinante de FHA (168).

El dominio RGD ya mencionado participa en la unión a receptores de la familia de las integrinas (190,192,370). Estos receptores se encuentran en la superficie de los macrófagos alveolares y en las células ciliadas del epitelio respiratorio y contienen un dominio glucosídico con afinidad por los glicolípidos unidos a lactosa (57,339,353). Se ha demostrado que este dominio RGD facilitaría la unión de FHA al receptor CR3 presente en la superficie de los macrófagos, y la formación de un complejo formado por la integrina LRI y su proteína asociada CD47 junto CR3 presentes en la membrana del leucocito (191,352,374). La acción cooperativa de FHA y fimbrias permitiría la unión de la bacteria a los macrófagos, su posterior internalización y persistencia intracelular, sin activar el mecanismo de estallido respiratorio. Además la unión a CR3 permitiría que una menor cantidad de toxinas liberadas eliminen eficientemente a neutrófilos y macrófagos, redundando en un ahorro de recursos para el patógeno (407,430).

FHA es capaz de unirse también a la proteína C4BP que es conocida como un regulador de la activación del sistema de complemento. C4BP actúa inhibiendo la vía clásica del complemento, evitando la formación del complejo de anclaje en la membrana del patógeno (38). La manera en que *Bordetella* utiliza esta unión es aún desconocida, pero demuestra la complejidad de la interacción de esta bacteria con el sistema inmune del hospedador.

Si bien la participación de FHA en la patogénesis de *Bordetella* ha sido históricamente circunscripta a su rol de adhesina, durante los últimos años se han logrado avances con respecto a otras actividades de esta molécula (86). La capacidad de *Bordetella* para inhibir la proliferación de los linfocitos T a antígenos exógenos ha sido demostrada recientemente, y FHA participaría en este mecanismo (46). Además, la interacción de esta proteína con los receptores de macrófagos inhibiría la liberación de IL-12 y estimularía la liberación de IL-10, IL-6 y TNF- $\alpha$  (274). FHA también sería capaz de inducir un franco proceso apoptótico en monocitos y células epiteliales de pulmón, probablemente a través de TNFR1, uno de los receptores de TNF- $\alpha$  (1). Por

otra parte, la respuesta humoral lograda en las infecciones con mutantes defectivos de FHA es significativamente superior a la observada durante la infección con la cepa salvaje (85). Esta posible actividad inhibitoria de la respuesta inmune por parte de FHA le permitiría a la bacteria resistir los mecanismos de defensa del hospedador, por lo que FHA tendría una participación fundamental en la persistencia de la bacteria en el hospedador.

**Fimbrias (Fim).** Las fimbrias o aglutinógenos son estructuras filamentosas de naturaleza proteica que se extienden desde la superficie bacteriana y participan en la adhesión de *Bordetella*. Las fimbrias están formadas por subunidades mayores y menores. Las subunidades mayores, Fim2 y Fim3 se disponen en forma apilada para formar la estructura helicoidal característica de las fimbrias. Estas subunidades son proteínas de 22 kDa y 22,5 kDa codificadas en dos loci no ligados, *fim2* y *fim3*, respectivamente (247,278). Existe otro locus, *fimX*, que es expresado sólo en bajos niveles y recientemente fue identificado un nuevo locus *fimN* en *B. bronchiseptica* (201,355).

Los genes *fim* están sujetos a variación de fase por corrimiento del marco de lectura dentro de una región rica en citocinas ubicadas entre las regiones -10 y -35 de los promotores de *fim2*, *fim3*, *fimX* y *fimN*. En *B. pertussis* se encuentra además un gen truncado, *fimA*, ubicado en el extremo 5' del cluster *fimBCD*. Recientemente ha sido descrito que *B. bronchiseptica* es capaz de expresar esta subunidad, sin embargo este gen no estaría sometido a variación de fase, ya que no presenta la región rica en citocinas (46). De acuerdo a esta variación de fase la bacteria puede expresar en cualquier momento Fim2, Fim3, FimX, FimN, o combinaciones de las mismas. Por otra parte, todas las fimbrias comparten la subunidad menor, FimD, de aproximadamente 40 kDa, que se ubica en el extremo distal de la estructura.

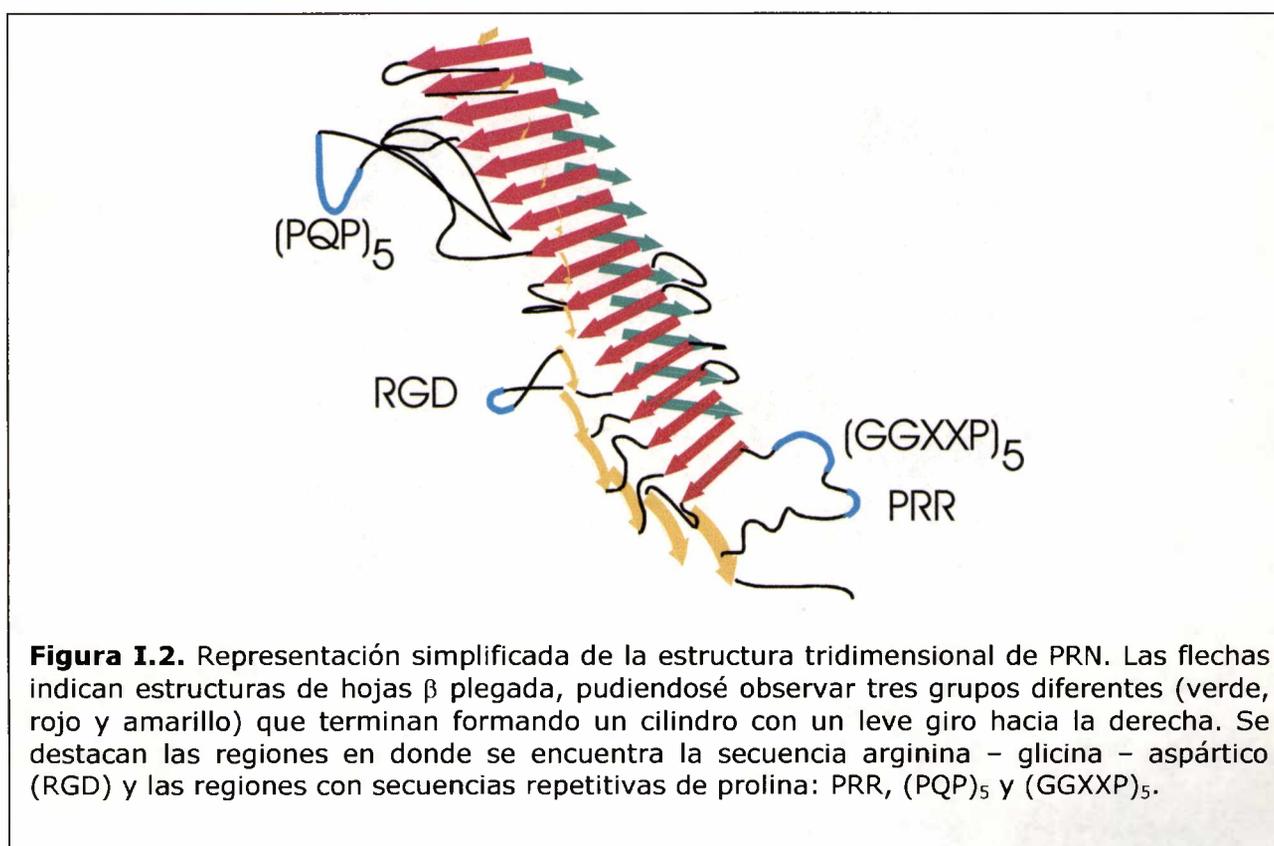
Si bien los genes *fim* se encuentran dispersos a lo largo de todo el cromosoma de *Bordetella*, las proteínas son ensambladas y secretadas a través de un mismo sistema codificado por el cluster *fimBCD* que se encuentra intercalado dentro del responsable de la expresión de otra adhesina, FHA (457). Más aún, tanto *fimBCD* como *fhaC* se encuentran sometidos a la acción del promotor de *fimB* y son transcritos en forma acoplada (253). Los productos del cluster *fimBCD* presentan homología con los productos de los genes *pap* de *E. coli*, involucrados en la producción del pili de esta bacteria (189,253). En base a la homología de secuencia de aminoácidos, se ha propuesto que FimB, como su homólogo PapD, actuaría como chaperona responsable de evitar la degradación de la fimbrias en el espacio periplásmico. Por su parte FimC, permitiría el transporte de las subunidades de la fimbria a través de la membrana y participaría del posterior anclaje a la misma, como PapC (457).

Las fimbrias participan en las primeras etapas del proceso infeccioso de *Bordetella*, mediando la adhesión entre la bacteria y las células del hospedador. La subunidad menor, FimD, estaría involucrada en la adhesión a células epiteliales y monocitos (172), mientras que las subunidades mayores son capaces de adherirse a heparán

sulfato, condroitín sulfato y dextrán sulfato, oligosacáridos presentes en el tracto respiratorio de todos los mamíferos (141).

El cluster *fimBCD* sería el único locus implicado en la biogénesis de las fimbrias, ya que las mutaciones realizadas sobre cualquiera de los genes que lo componen dan como resultado bacterias con ausencia completa de estas estructuras. Estos mutantes  $Fim^-$  han sido utilizados para el estudio *in vivo* del rol de las fimbrias en la infección y se ha determinado que la habilidad de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* para multiplicarse y persistir en la nasofaringe y tráquea del hospedador estaría directamente relacionada con la presencia de esta adhesina (140,271,305). Además, las fimbrias estarían involucradas en la generación de la respuesta inmune del hospedador, ya que la respuesta humoral desarrollada en las infecciones realizadas con estos mutantes es cualitativamente diferente y cuantitativamente inferior a la desarrollada con las cepas parentales (271). Estos resultados sugieren que las interacciones mediadas por las fimbrias con células epiteliales y con monocitos / macrófagos participarían en la naturaleza y magnitud de la respuesta inmune del hospedador.

**Pertactina (PRN).** La PRN es una proteína presente en la membrana externa de *Bordetella* spp. que participa en el proceso de adhesión de la bacteria al hospedador. Esta proteína tiene un peso molecular de 68 kDa en *B. bronchiseptica* (303), 69 kDa en *B. pertussis* (68) y de 70 kDa en *B. parapertussis* (244). La estructura de la PRN de *B. pertussis* obtenida por cristalografía indica que está formada por 16 cadenas



beta con una sección transversal en forma de V, siendo la mayor estructura beta descrita hasta el momento (Fig. I.2) (111). La estructura secundaria contiene dos regiones inmunodominantes de repeticiones. La primera, (GGXXP)<sub>5</sub> se encuentra ubicada a continuación del tripéptido RGD, y la segunda, (PQP)<sub>5</sub> se encuentra en el extremo C-terminal. La segunda región es considerada el epítope más importante de esta proteína (68).

El polipéptido precursor de la PRN, p93, tiene 93.5 Kda y es codificado a partir del gen *prn* (68). Este polipéptido sufre la eliminación de un péptido señal de 34 aminoácidos del extremo N-terminal y de un polipéptido de 30 KDa (p30) del extremo C-terminal (262). Ha sido sugerido que el péptido p30 participaría en el mecanismo de secreción de la pertactina debido a que ha sido detectada su presencia en la membrana externa de la bacteria (67). La comparación de las secuencias del gen *prn* entre las diferentes especies de *Bordetella* reveló una alta homología entre los mismos, siendo la porción correspondiente a p30 la más conservada, sugiriendo que esta porción cumpliría una función relevante en estos microorganismos (243).

La PRN es la primera proteína caracterizada en el género *Bordetella* dentro del grupo de proteínas que se autotransportan hacia la membrana externa. Estas proteínas son secretadas al espacio periplásmico por un mecanismo Sec dependiente y posteriormente se autoprocenan mediante clivaje proteolítico sobre su extremo C-terminal (176). Varios patógenos Gram negativos expresan estas proteínas que cumplen diferentes funciones, como por ejemplo las proteasas IgA de *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae* y la elastasa de *Pseudomonas aeruginosa* (209,335).

En cuanto a la función de esta proteína como adhesina existen datos contrapuestos que muestran que mutantes defectivos en la expresión de PRN (*B. pertussis* PRN<sup>-</sup>) no presentan alteraciones en la cinética de colonización en los ensayos de infección *in vivo* (356). Esta diferencia con otros estudios que marcan su rol como adhesina puede deberse en parte a que la pertactina no es la única adhesina expresada por *Bordetella*, por lo que su deficiencia puede verse sobrepuesta por otras adhesinas como lo son FHA o las fimbrias.

La importancia de la pertactina reside además en que actúa como antígeno inmunoprotector (68,175,303,317). Esta particularidad ha permitido que PRN haya sido utilizada como antígeno vacunal en inmunizaciones realizadas en ratones (317,357). Asimismo, varios ensayos clínicos de vacunas humanas sugieren que la inclusión de la pertactina es fundamental en el desarrollo de vacunas acelulares (152,435). Por otra parte, esta proteína presenta regiones polimórficas que han dirigido la atención de numerosas investigaciones hacia la relevancia de las mismas en la protección inmune (52,66,132,216,304). Estos trabajos han revelado una divergencia entre la pertactina presente en las bacterias circulantes en la población y la presente en las cepas vacunales hoy en uso (304,306). Estas divergencias parecerían ser una de las causas del aumento de incidencia de *Bordetella* que viene

registrándose desde hace varios años en diferentes países, incluyendo a la Argentina tal como lo ha descripto nuestro grupo (123).

**Otras proteínas autotransportadoras: BrkA, TcfA y Vag8.** Las proteínas autotransportadoras constituyen una familia compuesta por proteínas que son exportadas al exterior de la célula a través de un mecanismo común pero que presentan funciones tan diversas como adhesinas, proteasas, proteínas con actividad protectora frente a la respuesta del hospedador, entre otras (176,256).

Todas estas proteínas son sintetizadas como un precursor polipeptídico que es sometido a clivaje proteolítico liberando un extremo C-terminal de 30 KDa. El dominio C-terminal de la proteína forma barriles de hoja  $\beta$ -plegada en la membrana externa de la bacteria y la exportación se realiza sin la participación de proteínas accesorias, de allí el nombre de proteínas autotransportadoras.

La secuencia de pasos propuesta para la secreción de estas proteínas indica que la secuencia consenso presente en el extremo N-terminal permite la translocación del precursor polipeptídico a través de la membrana citoplasmática. El clivaje de la proteína se realiza en el espacio periplásmico y el extremo C-terminal se inserta en la membrana externa donde forma un poro a través del cual se exporta el extremo N-terminal. Este extremo sufre luego o bien un clivaje autoproteolítico o bien dependiente de otra proteasa, según el caso, pero la proteína permanece anclada a la membrana (102).

Entre los ejemplos de esta familia de proteínas autotransportadoras podemos citar a la proteasa de inmunoglobulina A de *Neisseria gonorrhoeae* (220) y *Haemophilus influenzae* (335), a la citotoxina vacuolante, VacA, de *Helicobacter pylori* (89), IcsA de *Shigella flexneri*, involucrada en la reorganización de la polimerización de actina de la célula eucariota (95), EspP, serin proteasa extracelular de *E. coli*, el factor de colonización traqueal (127), pertactina (67) y la proteína de resistencia la suero, BrkA (120), de *B. pertussis*.

La proteína BrkA participa en la protección de *Bordetella* contra la respuesta inmune innata y adquirida presente en las mucosas luego de una infección. Esta proteína impide la lisis mediada por la vía clásica del complemento, conocida como acción bactericida del suero nativo del hospedador y en menor medida previene la lisis por péptidos microbicidas (121). Sin embargo, la relevancia que esta protección posee durante un proceso infeccioso *in vivo* es aún discutida, ya que en ensayos *in vitro* se ha observado que *B. pertussis* no es capaz de resistir la acción bactericida del suero aún en presencia de esta proteína autotransportada (169).

Vag8 es una proteína autotransportadora de 95 kDa que contiene la secuencia RGD involucrada en procesos de adhesión (125). A diferencia de las otras proteínas autotransportadoras de *Bordetella*, su dominio C-terminal no es clivado durante el proceso de secreción. Ensayos *in vivo* de infección en ratones utilizando mutantes defectivos en esta proteína arrojaron resultados contradictorios según la construcción genética empleada. Mientras que una inserción con un transposon en el gen *vag8*

genera un mutante con dificultades de colonización, la delección de una porción interna del gen no presenta diferencias significativas de colonización respecto a la cepa parental (125). Al presente, la participación de esta proteína en el proceso infeccioso de *Bordetella* aún no ha sido esclarecida.

El factor de colonización traqueal (Tcf) es una proteína autotransportadora expresada exclusivamente por *B. pertussis*. Ensayos de colonización en el modelo murino empleando un mutante defectivo en la expresión de Tcf (126,127) muestran que la ausencia de esta proteína, previamente denominada vag34 produce una disminución en la colonización y persistencia de la bacteria en la tráquea de los ratones (127).

La escasa información disponible acerca de los roles que presentan cada una de las proteínas autotransportadas descritas (BrkA, Tcf y Vag8) indica que la investigación de estos factores debe ser profundizada a fin de determinar su relevancia en el proceso de patogénesis de *Bordetella*.

## Toxinas

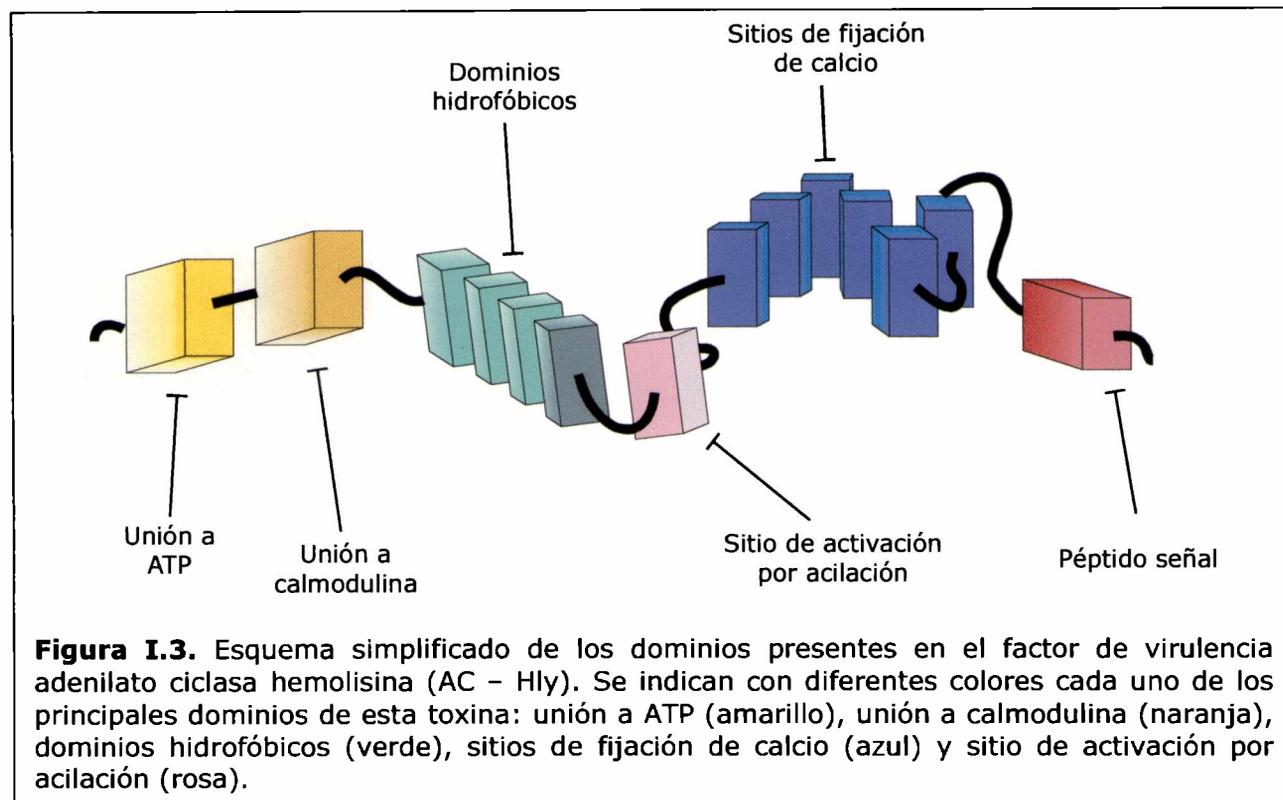
Luego de adherirse, un patógeno debe multiplicarse e invadir las células eucarióticas. Durante estas etapas las bacterias liberan una serie de toxinas que producen daños al hospedador. Las toxinas expresadas por las especies del género *Bordetella* se describen a continuación.

**Adenilato ciclasa–Hemolisina (AC - Hly).** La AC - Hly es una proteína bifuncional secretada por *Bordetella* que pertenece al grupo de toxinas RTX (repetición en toxina), que también incluye a las hemolisinas de *E. coli* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* y a las leucotoxinas de *Pasteurella haemolytica* y *A. actinomycetemcomitans* (453). La AC -Hly es un monómero de 1706 aminoácidos con un peso molecular que oscila entre 175 y 220 kDa (139,144). Se caracteriza por ser sintetizada y secretada sólo en el estado virulento de la bacteria (ver más abajo) y por ello es considerada un marcador de la existencia de dicho estado.

El gen *cyaA*, que codifica para la toxina AC-Hly, forma parte de un operón junto a varios genes cuyos productos están involucrados en la secreción y activación de esta proteína (144,145,232). La secreción de la toxina sólo ocurre cuando se expresan los genes *cyaB*, *cyaD* y *cyaE*. La expresión de *cyaC* es necesaria para activar a la AC - Hly y está involucrado en una modificación postraducciona de la toxina, más específicamente cataliza la adición de un residuo del ácido palmítico en la Lys<sub>983</sub> de la cadena peptídica (27,166).

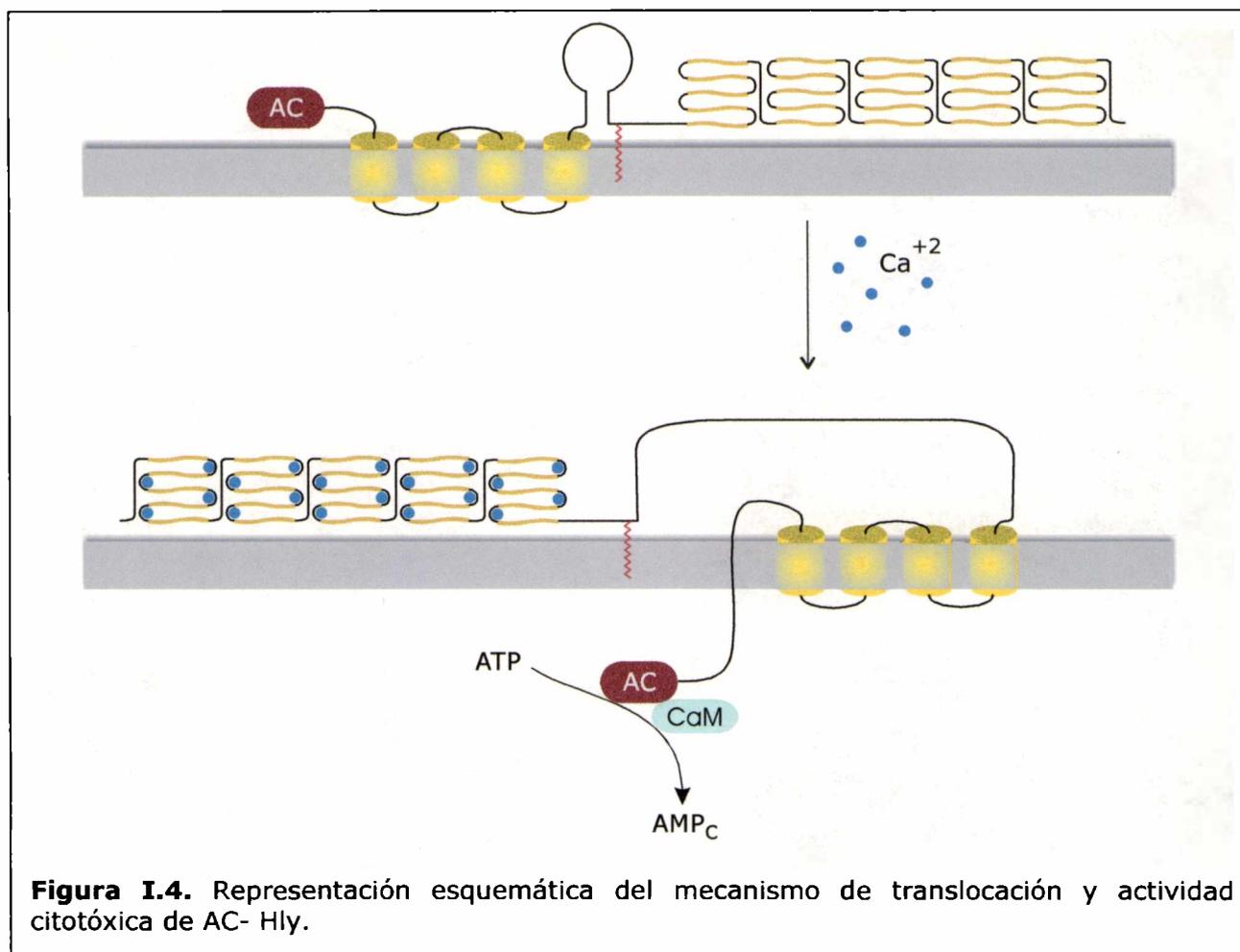
La actividad adenilato ciclasa está localizada en los primeros 400 aminoácidos del extremo amino terminal y es activada por calmodulina (Fig. I.3) (144,231). La alta afinidad que presenta por la calmodulina llevó en un principio al concepto erróneo de que esta molécula estaba involucrada en la translocación de la toxina dentro de la célula eucariota, pero evidencias posteriores descartaron esta posibilidad (177). Sin embargo, la calmodulina es indispensable para que la enzima incremente su actividad

hasta 100 veces (153,299). El sitio catalítico adenil ciclasa está formado por dos subdominios, T25 y T18 que pueden ser obtenidos *in vitro* mediante proteólisis controlada. Es posible formar un complejo ternario activo al asociar los dos subdominios mencionados con calmodulina (230). T25 (residuos 1-224) contiene el sitio catalítico, mientras que T18 (residuos 225-399) posee el sitio de unión a calmodulina (299).



Los aminoácidos restantes de la toxina forman el dominio hemolisina (residuos 400-1706) (Fig. I.3), que es capaz de formar canales selectivos en las membranas de los eritrocitos, causando hemólisis. Este dominio interviene también en la adhesión e internalización de la toxina dentro de la célula eucariota (362). Esta multiplicidad de funciones ha llevado a dividir este dominio en cuatro subregiones: 1) una región formadora del poro que contiene cuatro regiones hidrofóbicas; 2) una región en donde es adicionado un residuo de ácido graso; 3) 38-42 copias del nonapéptido glicina-aspartico, característico de las toxinas RTX, siendo éste el dominio de pegado a  $\text{Ca}^{+2}$  de la proteína y 4) el péptido señal de secreción sin procesar (299) (Fig. I.3).

El ingreso de adenilato ciclasa-hemolisina a la célula hospedadora no ocurre a través de una vía endocítica mediada por receptores (148) sino que utiliza un sistema especializado, dependiente de calcio y temperatura (360). Este consta de tres etapas: inserción, translocación, y clivaje (Fig. I.4).



En la inserción la toxina es integrada a la membrana plasmática, posiblemente a través de gangliósidos presentes en la superficie de la célula eucariota. Para que el proceso de inserción sea exitoso es necesaria la modificación transcripcional realizada por CyaC y la integridad de la región C-terminal. La inserción del monómero de AC-Hly permite la salida de  $K^+$ , este proceso es necesario para la posterior oligomerización de la toxina responsable de la actividad hemolítica presente en eritrocitos de carnero (151). El poro a través del cual será traslocada la toxina es formado por la oligomerización de al menos tres monómeros de CyaA que se encuentran insertos en la membrana. La posterior traslocación a través de la membrana plasmática requiere la presencia de concentraciones milimolares de calcio y temperaturas superiores a los  $15^{\circ}\text{C}$  (299,322). La región rica en glicina y aspartato que caracteriza a las toxinas RTX posee una alta afinidad por los iones calcio y presenta cambios conformacionales al producirse la unión del ión, lo que sugiere su participación en este proceso (362). Un trabajo reciente sugiere la carga electrostática de los residuos 224-242 de AC-Hly también cumpliría un rol en la traslocación de la toxina (203). Estos resultados afirman los obtenidos por otros autores, sugiriendo que el campo eléctrico a través de la membrana es la fuerza impulsora utilizada para entrar a las células blanco (322). Una vez dentro de la célula, la AC - Hly es clivada por una proteasa intracelular, liberando de esta forma el dominio ciclasa catalítico

presente en un fragmento de 45 kDa. Así, luego de ser activado por la calmodulina, comenzará la formación de AMPc.

Tanto la actividad hemolítica como la de ciclasa son esenciales para el inicio de la infección de *Bordetella* (158,212). Se ha observado que mutantes defectivos en la expresión de AC-Hly presentan menor virulencia en el modelo de infección murino (450). Además se observaron diferencias en la respuesta inmune desarrollada por ratones enfrentados a las cepas mutantes, presentando menor número de células inflamatorias a nivel pulmonar (210). Más aún, los períodos de colonización de *B. pertussis* en el tracto respiratorio del ratón se vieron significativamente acortados cuando los animales habían sido inmunizados activa o pasivamente con la proteína purificada o con anticuerpos anti-AC-Hly (162). La participación de AC – Hly en la evasión de la respuesta inmune del hospedador ha sido estudiada en numerosos trabajos. Ensayos en modelos animales demostraron que inmunizaciones con esta proteína protegen al hospedador contra una infección de *Bordetella* (161,162,316). Además, AC-Hly participaría también en las etapas posteriores a la colonización modulando la respuesta del hospedador. Ensayos *in vivo* utilizando animales deficientes en distintos componentes del sistema inmune, demostraron la importancia de esta proteína en la evasión de la respuesta inmune innata (170). En particular esta toxina actuaría sobre los neutrófilos polimorfonucleares, sobre los cuales tendría además una actividad proapoptótica. Esta capacidad de inducir apoptosis se extiende a varios tipos de células eucariotas y ha sido demostrada tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* (158,211,213). Este mecanismo de inducción de la muerte celular programada sería una de las estrategias desarrollada por *Bordetella* para escapar de la acción antibacteriana de los macrófagos (157). Sin embargo queda aún por esclarecer la importancia que presenta la inducción de apoptosis de las células del huésped durante el desarrollo de la infección.

**Toxina dermonecrótica (TDN).** La toxina dermonecrótica, también denominada Toxina termolábil por su sensibilidad al calor (se inactiva al exponerla 10 minutos a 56°C) es una proteína de localización estrictamente citoplasmática sintetizada por las diferentes especies del género *Bordetella* (90). Debe su nombre a que causa lesiones necróticas al ser inoculada en forma intradérmica en ratones, conejos, y otros animales de laboratorio (248). Las TDN de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* están formadas por una única cadena polipeptídica de aproximadamente 140 kDa (183,471).

Estudios *in vitro* realizados con TDN purificada mostraron la capacidad de esta toxina de inducir en las células eucarióticas un aumento de la replicación del ADN celular, de la síntesis proteica y del ensamblaje de las fibras de actina, dando como resultado un aumento en la división celular junto a la presencia de células multinucleadas (181,182). Estas alteraciones celulares se deben a la acción sobre la organización de las fibras de actina, proceso regulado por la GTPasa Rho. Estas GTPasas funcionan como reguladores globales del citoesqueleto de actina y actúan

como interruptores moleculares en varias funciones celulares. La toxina dermonecrótica desamida un residuo de glutamina de la GTPasa en un proceso en el que participa la porción C-terminal de la TDN y cataliza la transglutaminación de ésta y otras GTPasas (382). Por otra parte, la porción N-terminal de la toxina sería responsable de la unión específica a un receptor de membrana de la célula eucariota (270). A través de este mecanismo la TDN modifica los procesos de migración, morfogénesis y fagocitosis de la célula eucariota, manteniendo permanentemente a las GTPasas en su forma activa e impidiendo que se hidrolice el GTP (167,268).

A pesar de ser considerada un factor de virulencia, mutantes defectivos en la expresión de esta toxina no presentan diferencias con la cepa parental en ensayos de infección en modelos murinos. Sin embargo, recientemente se observó que sólo las cepas de *B. bronchiseptica* productoras de TDN eran capaces de producir neumonía y atrofia nasal en cerdos, indicando que esta toxina participaría de forma sustancial en el proceso infeccioso de *Bordetella* (60).

**Toxina citotraqueal (TCT).** Esta toxina es la responsable de la destrucción de las células ciliadas del epitelio respiratorio durante la infección por *Bordetella*. Está constituida por un fragmento de peptidoglicano de 921 Da de peso molecular formado por un disacárido unido a un tetrapéptido (75). La producción de esta toxina se debe simplemente al resultado del crecimiento normal de la bacteria, y por lo tanto no se encuentra regulada. La TCT pertenece a la familia de los muramilpéptidos tanto por homología estructural como funcional. Si bien todas las bacterias Gram negativas producen una capa de peptidoglicano, la liberación de fragmentos en forma de muramilpéptidos durante la fase exponencial de crecimiento ha sido descrita solamente en *Bordetella* (363) y *Neisseria gonorrhoeae* (396). La destrucción de las cilias y del epitelio respiratorio causada por la TCT produce ciliostasis y tos persistente. La actividad tóxica se encuentra restringida a la región peptídica de la molécula, como ha sido demostrado en ensayos utilizando células derivadas de tráquea de hámster, mientras la porción glucídica es irrelevante para esta función (257). La toxicidad es inducida por un mecanismo indirecto, a través de la inducción de un aumento en la producción de IL-1 (174). Esta interleuquina activa a la enzima óxido nítrico sintasa, produciendo grandes cantidades de radicales NO (173). Estos radicales destruyen enzimas dependientes de iones y eventualmente inhiben la función mitocondrial y la replicación del ADN de las células que se encuentran en contacto con la bacteria (174). Esta toxina también actúa sobre otras células, inhibiendo la función de los neutrófilos a bajas concentraciones y produciendo efectos tóxicos a concentraciones altas (91).

Las grandes cantidades de TCT producidas por *Bordetella* serían suficientes para causar un aumento desmesurado de óxido nítrico que llevaría a la destrucción de la célula eucariota (128). Esto genera un beneficio evidente en el ciclo infeccioso de *Bordetella*, proveyendo una vía eficiente de propagación por inducción de tos en el hospedador. Si bien desde el punto de vista evolutivo esta toxina puede ser solamente

un producto secundario a la síntesis de peptidoglicano, la TCT es considerada un componente fundamental en la patogénesis de *Bordetella*.

**Toxina pertussis (PTX).** Dentro del género *Bordetella*, *B. pertussis* es la única que sintetiza y secreta esta toxina. Si bien el operón que la codifica se encuentra en *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis*, una cantidad importante de mutaciones en la región promotora de estos genes provoca su silenciamiento en estas especies (19). PTX tiene un peso molecular de 106 kDa y está formada por seis polipéptidos, denominados S1 - S5 presentes en una proporción 1:1:1:2:1 (420). Cada subunidad es sintetizada con una secuencia señal N-terminal, lo que sugiere que el transporte hacia el espacio periplásmico ocurre a través de un mecanismo análogo al sistema Sec de *E. coli*. Una vez clivado el péptido señal, la toxina es ensamblada en el espacio periplásmico y transportada a través de la membrana externa por un sistema de secreción tipo IV (62,115). Este sistema involucra nueve proteínas accesorias (PtlA-I) (114,451) homólogas a proteínas involucradas en exportación de proteínas y/o ADN, siendo el sistema VirB de *Agrobacterium tumefaciens* el mejor descrito hasta el momento. A su vez se ha reportado recientemente que la secreción de PTX al medio extracelular durante el crecimiento *in vitro* sería dependiente del metabolismo del glutatión (410)

PT es una ADP ribosiltransferasa y pertenece a la familia de las toxinas A-B entre las que se pueden citar a la toxina diftérica, la toxina colérica, la exotoxina A de *Pseudomonas* y la enterotoxina de *E. coli* (240,251,308). La porción A de PT está compuesto por la subunidad S1 y es responsable de la ADP-ribosilación de proteínas G inhibitoria (251,252,420). La porción B está formada por las subunidades S2, S3, S4 y S5 en una proporción 1:1:2:1 respectivamente y es la responsable de la unión de la toxina a las células blanco. El mecanismo de unión a las células linfocitarias sería compartido en algunos aspectos con el utilizado por el virus VIH-1, ya que esta porción es capaz de inhibir la entrada y replicación del virus en estas células (10). Luego del proceso de adhesión, la porción A de la toxina es traslocada al citosol de la célula blanco, en un proceso independiente de la endocitosis celular. La unión de ATP al oligómero B de la toxina causa la liberación de la subunidad S1 en el citosol, que es activada luego de sufrir la reducción de su puente disulfuro (205). La actividad ribosilante de S1 utiliza NAD<sup>+</sup> como donador de ribosil-ADP y a proteínas G como aceptores (252). Los efectos bioquímicos que se suceden como resultado de la ADP ribosilación de las distintas proteínas G incluyen hipersecreción de insulina, liberación de ácidos grasos, inhibición de la quimiotaxis, respuesta oxidativa y liberación del contenido lisosomal en neutrófilos y macrófagos, así como estimulación de la síntesis y secreción de TNF $\alpha$ , IL-1 y IL-6 (44,53,55,278,405,425). Esta toxina ha sido descrita también como adhesina frente a macrófagos humanos y a células epiteliales de tracto respiratorio (429). El proceso de adhesión se produciría a través de dominios que reconocerían carbohidratos presentes en las subunidades S2 y S3 (441). Esta función sería redundante con la que cumplen otra adhesinas como FHA. Sin embargo, ensayos *in vivo* han demostrado que para que se produzca la redundancia entre

ambos factores, PTX y FHA, es necesaria la actividad enzimática de PTX y no la actividad adhesiva observada *in vitro* (12). Esto indicaría que existe más bien una complementación entre la actividad adhesiva de FHA y la actividad enzimática de PTX.

La mayor parte de los síntomas presentes en la tos convulsa han sido atribuidos a la acción de la toxina *pertussis* (331), así la infección causada por *B. pertussis* ha sido considerada muchas veces como una infección mediada por PTX. Sin embargo, el rol de esta toxina en la colonización, infección y / o transmisión de este patógeno no ha sido aún completamente determinado.

**Lipopolisacárido (LPS).** El LPS constituye el componente estructural mayoritario de las membranas externas de las bacterias Gram negativas. La fracción de LPS representa entre un 10-15% del total de moléculas presentes en la membrana externa y se estima que ocupa un 75% de la superficie bacteriana.

El LPS es una molécula anfifílica formada por el lípido A, a través del cual se inserta en la membrana plasmática externa de la bacteria, un core o núcleo de naturaleza oligosacáridica y un extremo distal constituido por un polisacárido lineal denominado antígeno O.

Todas las especies de *Bordetella* expresan diferentes moléculas de LPS, hecho que sugiere que este factor jugaría un rol fundamental en la especificidad de especie presentada dentro del género (436). A diferencia de la mayoría de las bacterias Gram negativas, *B. pertussis* no presenta antígeno O, debido a que carece de los genes necesarios para su síntesis (286,341). Otras diferencias encontradas se refieren al número de grupos acilo que sustituyen la parte glucocídica del lípido A. *B. bronchiseptica* es la única del género que posee seis sustituyentes, al igual que otras bacterias Gram negativas como *E. coli*, mientras que el resto de las especies presenta sólo cinco (418). A su vez las longitudes de los mismos varían entre cada una de las especies. En cuanto a la estructura del core, ésta sólo ha sido descrita en su totalidad para una cepa de *B. pertussis* (64) y de manera parcial para *B. bronchiseptica* (63). La particularidad que presenta este core es la presencia de una única molécula de un azúcar característico de esta estructura, el ácido 2-ceto-D-mano-octulosónico (KDO). Esto la diferencia de otros géneros en donde puede haber hasta tres moléculas presentes en el core de su LPS (34,351,387).

Cuando se someten los LPS a corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida se puede observar una banda denominada B, compuesta por el lípido A y el core interno, y una banda A. La banda A está compuesta por la estructura de la banda B sustituida por un trisacárido formado por N-acetil-N-metil-fucosamina (FucNAcMe), ácido 2,3-dideoxi-di-N-acetilmanosaminurónico (2,3-diNAcManA) y N-acetilglucosamina (GlcNAc) (65,235). De esta manera queda completa la estructura del LPS presente en *B. pertussis*, en ocasiones denominado lipooligosacárido (LOS) dada su falta de antígeno O. Ésta porción del LPS es un homopolímero de ácido 2,3-dideoxi-di-N-acetil-galactosaminurónico y está presente en el resto de las especies del género, incluyendo a *B. bronchiseptica* (103).

En otras bacterias Gram negativas, los genes involucrados en la biosíntesis del LPS se encuentran generalmente agrupados según la porción que sintetizan pudiendo actuar con promotores comunes o no (387). En *Bordetella* esto se observa sólo en aquellos genes involucrados en la síntesis de las porciones glucosídicas más externas tales como el trisacárido y el antígeno O. Junto a estos genes, con un sentido de transcripción inversa al resto, se encuentran dos genes involucrados en la síntesis del core (*waaA* y *waaC*). Por otro lado alguno de los genes intervinientes en la síntesis del lípido A (*lpxA* y *pagP*) o del core (*waaF*) no se encontrarían formando un grupo de genes con funciones comunes. El resto de los genes necesarios para completar la síntesis del LPS aún no han sido descritos. La reciente publicación del genoma de *B. bronchiseptica* muestra la existencia de marcos de lectura que presentan homología con genes conocidos en otras bacterias, por lo que se requerirán futuras investigaciones a fin de determinar la participación de los mismos en la síntesis del LPS (325).

A diferencia de los componentes proteicos del género *Bordetella*, el rol del LPS en la patogénesis y en la protección de la enfermedad comenzó a estudiarse tardíamente (11,193,342,454). West y colaboradores (2000) fueron los primeros en utilizar en ensayos *in vivo* un mutante de *B. bronchiseptica* con una estructura de LPS alterada (454). La mutación se realizó sobre el gen que codifica para la fosfoglucomutasa, *pgp* que impide la síntesis de la banda A y del antígeno O de esta bacteria. Se pudo observar que la ausencia de estas estructuras en el modelo de infección en ratones impide la colonización efectiva de los pulmones, siendo eliminada la bacteria nueve días después del momento de la inoculación. El gen *pgp* sin embargo podría estar involucrado en otros procesos independientes de la síntesis del LPS por lo que la asignación de un rol para esta molécula no fue claro. Harvill y colaboradores (2000) construyeron cepas de *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* y *B. parapertussis* que presentaba un LPS compuesto sólo por la estructura lípido A - core. Estos mutantes presentaron una disminuida capacidad para colonizar la tráquea y los pulmones del modelo murino, pero fueron capaces de persistir por al menos 50 días en la cavidad nasal (171). Por otro lado, la ausencia de la mayor parte de las estructuras glucosídicas del LPS no permiten la efectiva colonización del hospedador (Nuestro laboratorio:397). Así, una bacteria cuyo LPS se encuentra compuesto de manera exclusiva por el lípido A y los dos primeros azúcares del core (KDO y heptosa) no es aislada del modelo animal más allá del quinto día posterior a la inoculación. Esta deficiencia en el proceso de infección se debería a una fuerte disminución en la capacidad que presenta esta bacteria para adherirse a células epiteliales de pulmón (Nuestro laboratorio:397). Sin embargo no sería ésta la única función del LPS durante el proceso de infección. Recientemente ha sido descrito que el LPS de *B. bronchiseptica* es capaz de inducir en ensayos *in vitro* la apoptosis de diferentes tipos celulares (epitelio pulmonar, monocitos y neutrófilos), en un fenómeno dependiente de la estructura del LPS expresada por la bacteria y del tipo de célula eucariota utilizada (398). Por otra parte, el LPS de *Bordetella*, como el de otras bacterias Gram

negativas, actúa como una potente endotoxina durante el proceso infeccioso, produciendo efectos pirogénicos, mitógenos y tóxicos, además de estimular la producción de factor de necrosis tumoral por parte de los macrófagos (446).

El conocimiento actual de las funciones que cumpliría el LPS a lo largo del proceso infeccioso de *Bordetella* parece indicar que esta molécula tiene una participación compleja en la patogénesis del microorganismo. Investigaciones futuras se espera profundicen los estudios del rol de este factor en la interacción patógeno -hospedador.

### **Sistemas más complejos que participan en la virulencia**

**Sistema de secreción tipo III.** Las bacterias Gram negativas utilizan diferentes mecanismos para secretar sustancias hacia el medio extracelular. Estas vías de secreción han sido clasificadas en cinco grupos principales: secreción tipo I, II, III, IV y los autotransportadores. Dicha clasificación se basa en la naturaleza molecular de las maquinarias de transporte y las reacciones que éstas catalizan (237). Sin embargo, estos grupos se pueden aún subdividir en dos grandes clases dependiendo del mecanismo que se utilice para el transporte a través de la membrana plasmática. Las vías Sec-dependientes, que utilizan el sistema de secreción denominado Sec, en el que las proteínas a secretarse presentan una secuencia señal o péptido líder en el extremo amino terminal; y las Sec-independientes en las que los sustratos se pueden translocar directamente desde el citosol hasta el exterior celular sin que exista un intermediario periplásmico, ni una secuencia señal en el amino terminal (223,422).

El sistema de secreción tipo III (SSTIII) constituye un área de intensa investigación en los últimos años. Es una vía Sec-independiente en la que la secreción ocurre en un solo paso desde el citosol hasta el exterior celular. Este sistema desempeña un papel central en la patogenicidad de muchas bacterias Gram-negativas (188) y ha sido identificado en una gran variedad de patógenos de humanos, animales y plantas, incluyendo especies de *Bordetella*, *Chlamydia*, *Erwinia*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhizobia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Xanthomonas* y *Yersinia*. La maquinaria de secreción está conservada entre los diferentes patógenos, sin embargo las proteínas secretadas difieren completamente, por lo que el mismo mecanismo de transporte puede generar una amplia gama de enfermedades (188). A través de este sistema la bacteria puede transferir determinantes de virulencia directamente al interior de la célula susceptible mediante una estructura similar a una aguja de inyección (136,72,333). Este proceso es inducido por el contacto de la bacteria con la superficie de la célula blanco a través de mecanismos aún no del todo caracterizados (224). Las proteínas liberadas a través de este sistema alteran la fisiología normal de la célula eucariota, dando como resultado cambios que le permiten a la bacteria, por ejemplo, evadir la respuesta inmune (236). Las proteínas a ser secretadas presentan una gran diversidad estructural y funcional. Si bien estas proteínas carecen de una señal de secreción definida, existen evidencias de que algunas de ellas presentan una señal en el dominio amino terminal (188). A pesar de esto, no ha sido posible identificar

secuencias conservadas en esta región y algunos datos sugieren que es más bien una propiedad fisicoquímica, como la anfipaticidad, la que es crítica para la secreción (249). La hipótesis de la señal de secreción en el amino terminal ha sido cuestionada y otros autores han propuesto que la señal se localiza en la región 5' codificante del RNA mensajero (13).

Por otro lado, en todos los SSTIII estudiados existen proteínas chaperonas que comparten características comunes, como bajo peso molecular, pI ácido y una alta predicción de estructura  $\alpha$ -hélice. La exportación de algunos sustratos es facilitada por dichas chaperonas manteniendo a las proteínas en una conformación adecuada para la secreción, previniendo además la agregación prematura en el citosol (323). Sin embargo, el papel directo de las chaperonas como posible señal de reconocimiento en la secreción, así como su rol en la organización de la jerarquía de translocación de los efectores, aún no ha sido demostrado.

El sistema de secreción tipo III (SSTIII) ha sido recientemente descrito en algunos miembros del género *Bordetella*, como *B. bronchiseptica* y en los aislamientos ovinos de *B. parapertussis* (469). Si bien *B. pertussis* presenta los genes que codifican para este sistema, hasta el momento no ha sido reportada su expresión (208,325).

Si bien las proteínas efectoras del SSTIII de *B. bronchiseptica* aún no se han caracterizado en su totalidad, se han atribuido al sistema algunas funciones. Este sistema induce citotoxicidad en varias líneas celulares (437,469), defosforilación de proteínas de la célula hospedadora (469) y activación de MAP quinasas, ERK1 y ERK2 (470). A su vez, durante las infecciones con *B. bronchiseptica* en células epiteliales de rata (L2) es posible observar una agregación citoplasmática aberrante del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (470). Este factor no es traslocado durante la infección con esta bacteria aún ante un estímulo como la presencia de TNF- $\alpha$ . Esta agregación, con la consecuente inhibición de la entrada de NF- $\kappa$ B al núcleo sería responsabilidad de efectores del sistema III de esta bacteria. Estos resultados son coincidentes con los reportados recientemente por Kuwae y colaboradores (2003) (227). Estos autores describen la caracterización de un mutante de *B. bronchiseptica* defectivo en la expresión de la proteína BopB, homóloga a YopB de *Yersinia* que trasloca a las proteínas secretadas por este sistema (227). Este mutante, a diferencia de la cepa parental, es incapaz de inducir necrosis en las células L2 y tiene disminuída la capacidad de producir hemólisis.

En ensayos *in vivo* se ha observado que el sistema tipo III contribuye a la colonización de la tráquea tanto en modelos murinos como en ratas (469,470). Las células inflamatorias que ingresan al pulmón durante la infección desarrollan un proceso apoptótico cuando la cepa utilizada posee el SSTIII activo. El número de células apoptóticas decrece significativamente si la cepa utilizada es un mutante defectivo en el gen *bscN*, homólogo al gen de *Yersinia* que proveería la energía para la secreción. Este mutante además, induce una respuesta humoral contra los principales antígenos de *B. bronchiseptica* más elevada que durante una infección normal (469,470). Sin embargo, se han descrito resultados que en principio parecen

contradictorios al observado en el modelo animal. En ensayos *in vitro* se ha observado que este sistema produce la muerte de diferentes células, ya sea derivadas de macrófagos o epiteliales, de manera independiente de la presencia de caspasa-1, enzima que participa en el proceso de apoptosis (414). A su vez no se ha observado la activación de caspasas intermedias y la morfología de la célula afectada obedece a un patrón de muerte necrótica y no a apoptosis. A pesar de que el mecanismo por el cual se logra la muerte de las células del hospedador debe ser aún determinado de manera fehaciente, es claro que el sistema tipo III se encontraría involucrado en la modulación de la respuesta inmune y podría contribuir en las etapas crónicas características de las infecciones de *B. bronchiseptica* (470).

### Otros factores bacterianos

Las distintas especies del género *Bordetella* expresan una serie de factores que no han sido relacionados con la patogénesis de estas bacterias. Por ello se denominan **factores de avirulencia**. La información disponible sobre los mismos es menor que la referida a los factores de virulencia quizás como consecuencia de la poca relevancia que parecen tener los mismos en la infección.

**Ureasa.** La ureasa es una enzima que cataliza la degradación de la urea a amonio y dióxido de carbono. En muchas bacterias el amonio liberado por esta reacción es utilizado como fuente de nitrógeno, mientras que en otras actúa como factor de virulencia debido a la capacidad de aumentar la concentración de amonio hasta niveles tóxicos o por el cambio de pH que ocurre en el medio circundante (276). La estructura de las ureasas bacterianas descritas hasta el momento, con la excepción del género *Helicobacter*, están formadas por tres subunidades, UreA, UreB y UreC dispuestas con la conformación  $(\alpha\beta\gamma)_3$  con un centro que contiene níquel. Además de los genes estructurales *ureA*, *ureB* y *ureC*, se requiere de la expresión de varios genes accesorios para la expresión de la enzima en su forma activa. Estos genes se encuentran ubicados en posiciones adyacentes a los genes estructurales y participarían en la asimilación del níquel y en la activación de la enzima. Si bien el número de genes accesorios es variable entre diferentes especies, *Helicobacter pylori* presenta siete genes accesorios y *Klebsiella aerogenes* sólo cuatro. Muchos de estos genes accesorios presentan alta homología entre sí (298).

Las ureasas de muchas bacterias participan en la patogénesis de varias enfermedades, como formación de cálculos urinarios, úlceras gástricas y encefalopatía (297). Asimismo, la ureasa es expresada por varios patógenos respiratorios como *Haemophilus influenzae* y *Mycobacterium tuberculosis*. Dentro del género *Bordetella* sólo *B. bronchiseptica* y algunas cepas de *B. parapertussis* presentan actividad ureasa. El cluster de genes que permiten la expresión de la ureasa en *B. bronchiseptica* codifica para tres proteínas estructurales UreA, UreB y UreC y cuatro proteínas accesorias UreD, UreE, UreF y UreG que participarían en la asimilación del níquel (276). En este mismo cluster y orientado en dirección opuesta al resto de los

genes se encuentra un gen que codifica para un activador transcripcional, BbuR. Si bien mutantes defectivos en BbuR no presentan actividad ureasa, se desconoce de qué forma participa este activador transcripcional en la expresión de la enzima. Por otra parte, la ureasa es un factor regulado negativamente por el sistema de dos componentes BvgAS (ver más abajo). La regulación global de la expresión de esta enzima y la relación entre ambos mecanismos no han sido aún determinadas.

La actividad ureasa participaría en la supervivencia intracelular de *B. bronchiseptica*. Ensayos *in vitro* indican que mutantes defectivos en la expresión de esta enzima presentan disminuida su capacidad para sobrevivir intracelularmente (275). Sin embargo, no se observaron diferencias entre cepas con y sin actividad ureasa en ensayos de colonización de cobayos y de ratones (277,301). Si bien estos resultados indicarían que la enzima ureasa no es necesaria en las primeras etapas de la infección, queda aún por analizar el rol de la misma en los estadios de cronicidad aún no estudiados hasta el momento.

**Mecanismos de adquisición de hierro.** El hierro es un mineral esencial para la mayoría de los patógenos y un hospedador infectado puede considerarse un ambiente con escasez de este mineral. En consecuencia, las bacterias han desarrollado mecanismos para lograr incorporar hierro en estas situaciones de escasez. Las especies del género *Bordetella* no son la excepción y expresan varios sistemas de adquisición de hierro. Así, *B. pertussis* es capaz de producir sideroforos alcalígenos para la adquisición de hierro (58,307), recuperar hierro complejado a sideroforos heterólogos (29,30) e incluso extraerlo de proteínas del hospedador como lactoferrina (348), transferrina (347,348), hemoglobina (315), y hemina (2,315). La mayoría de estos sistemas han sido identificados también en *B. bronchiseptica* (30,58,307,315).

El hierro proveniente de las diversas fuentes mencionadas es luego internalizado en la bacteria a través de un complejo protéico TonB/ExbB/ExbD conocido como sistema Ton. Este complejo interacciona con las moléculas involucradas en la adquisición de hierro y provee la energía necesaria para transferir el hierro hacia el interior celular (337).

Estos sistemas no sólo responden a la baja concentración de hierro en el medio, sino que ha sido descrita también una regulación a través del sistema de dos componentes BvgAS que describiremos más abajo. Así, la expresión de los sideroforos es reprimida por el sistema BvgAS en algunas cepas de *B. bronchiseptica*, mientras que un gen con homología por receptores de sideroforos en *B. pertussis* es activado por este mismo sistema (17,143).

La participación de algunos de estos sistemas en la patogénesis de *Bordetella* ha sido estudiada (336,350). A este respecto existen datos contradictorios, ya que mutantes de *B. bronchiseptica* defectivos en la expresión de sideroforos alcalígenos no presentan dificultades en la colonización del modelo murino de infección (336), mientras que en infecciones de cerdos se ha reportado una disminución de la virulencia (350). Por otra parte un mutante TonB<sup>-</sup> presenta una menor colonización

del tracto respiratorio de ratones (337). Estos resultados parecen indicar que de la multiplicidad de sistemas para la adquisición de hierro sólo algunos se encontrarían involucrados en los procesos de patogenicidad de *Bordetella*.

**Proteínas de membrana externa.** En *B. pertussis* han sido descritas una serie de proteínas que se encuentran ubicadas en la membrana externa (OMP) de la bacteria que se expresan exclusivamente en la fase avirulenta de la bacteria (ver más abajo), y son consideradas marcadores de esta fase (82). Asimismo, el patrón de OMP de *B. bronchiseptica* ha sido caracterizado, presentando un perfil diferencial entre la fase virulenta y avirulenta (84,326). Sin embargo, la participación de estas proteínas en el ciclo infeccioso de estos patógenos aún no ha sido determinado, limitándose su utilización a la caracterización de fenotípica de las bacterias.

**Flagelo.** Los flagelos bacterianos son largos apéndices filamentosos extracelulares responsables del desplazamiento en medios líquidos de la mayor parte de las bacterias móviles. Se encuentran anclados en la membrana bacteriana mediante un sistema complejo formado por más de 20 proteínas. La porción extracelular está formada principalmente por un filamento constituido por subunidades de la proteína flagelina. Además de otorgarle a la bacteria la capacidad de moverse y por lo tanto encontrar condiciones favorables para su desarrollo o escapar de entornos desfavorables, el flagelo cumple varias funciones adicionales. En la colonización por parte de microorganismos comensales, los flagelos actúan como medio de locomoción y / o como adhesina favoreciendo la interacción con distintas células del hospedador (300). Por otra parte, en los casos donde existe competencia entre diferentes especies bacterianas la movilidad proporcionada por el flagelo puede otorgarle una ventaja específica a la bacteria que lo expresa (300).

En muchas especies patógenas, el flagelo es un factor de virulencia importante. Así, ha sido descrita su participación en distintas etapas del proceso de patogénesis como adhesión, formación de biofilms, y colonización del hospedador, como en *P. aeruginosa*, *E. coli*, *V. cholerae*, *S. typhimurium* y *H. pylori*. (404).

Dentro de las especies del género *Bordetella*, sólo *B. bronchiseptica* y *B. avium* resultan móviles. *B. bronchiseptica* presenta flagelos peritricos que le otorgan movilidad a este patógeno. El flagelo de *B. bronchiseptica* es regulado negativamente por el sistema BvgAS, por lo que es considerado un factor de avirulencia (ver más abajo).

La estructura, síntesis y regulación de los flagelos de bacterias Gram negativas, así como el conocimiento actual acerca del flagelo expresado por *B. bronchiseptica* se encuentran detallados en el Capítulo IV de este trabajo de Tesis.

**Enzimas asociadas al metabolismo.** Recientemente han sido identificados un gran número de genes asociados a la fase avirulenta de *B. bronchiseptica* (391). Estos genes codifican para enzimas asociadas al metabolismo bacteriano. Una de ellas es la

isocitrato deshidrogenasa quinasa, enzima que interrelaciona dos vías metabólicas centrales, el ciclo del ácido cítrico y el ciclo del glioxilato. También han sido identificadas enzimas asociadas con el metabolismo de Acetil-CoA, transportadores de aminoácidos a través de la membrana, y enzimas modificadoras de aminoácidos. Hasta el momento no ha sido analizada la participación de estos factores en el ciclo de vida de la bacteria.

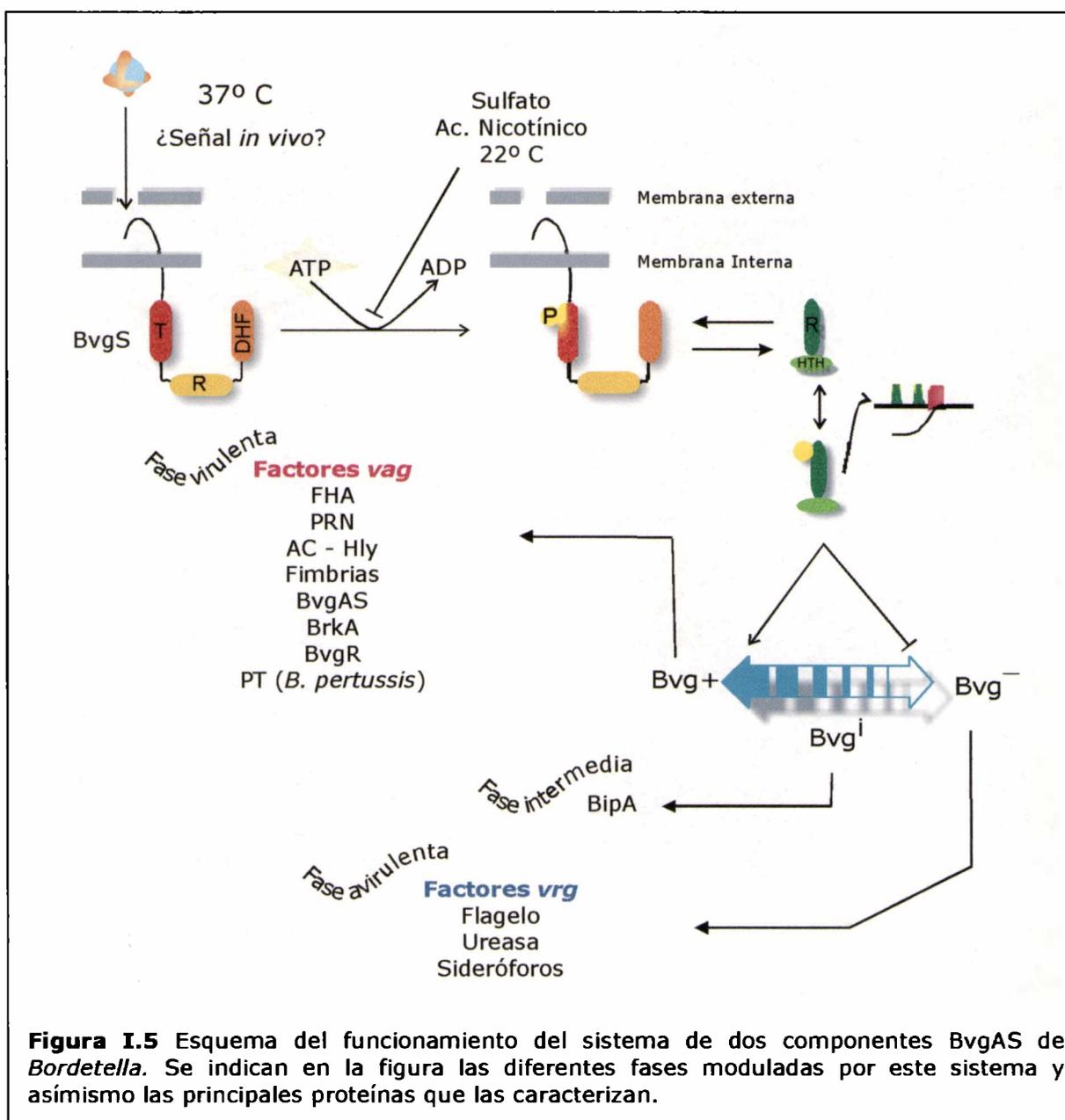
### **Regulación de la expresión de los factores de virulencia y avirulencia**

Como hemos descripto más arriba, el ciclo de vida de un patógeno es un proceso durante el cual la bacteria se enfrenta a diversos ambientes en los cuales se desarrolla. Es esperable que en cada uno de ellos la bacteria requiera de un conjunto de factores particulares por lo que la expresión de los mismos debe estar regulada en forma precisa. Varios son los mecanismos de regulación de la expresión de estos componentes que se han descripto para distintos patógenos (124,310,358,372). En el género *Bordetella* la mayoría de los factores descriptos anteriormente, a excepción de la citotoxina traqueal que es un producto de la síntesis del peptidoglicano y el LPS, se encuentran bajo el control de un locus denominado *Bordetella* virulence gene (*bvg*, antes designado *vir* por estar asociado con la regulación de la expresión de los factores de virulencia). Este locus *bvg*, que codifica para un sistema de dos componentes denominado BvgAS, fue identificado por Weiss y colaboradores (1989) (452) cuando observaron que la inserción del transposón Tn5 dentro del mismo, abolía simultáneamente la síntesis de PT, FHA, AC-Hly y TDN (denominados factores *bvg* activados). Posteriormente se demostró que la pertactina también es una proteína *bvg*-regulada (68). Se pudo observar además que las bacterias conteniendo mutaciones en el locus *bvg* que eliminan la expresión coordinada de los genes *bvg*-activados poseen menor capacidad para causar la enfermedad y por ello son designadas bacterias avirulentas.

Estas mutaciones pueden complementarse mediante la introducción de la región *bvg* salvaje en un plásmido capaz de replicarse en *Bordetella*, demostrándose de esta manera que los genes *bvg* actúan en *trans* (222).

Se ha descripto que mutaciones que ocurren espontáneamente a nivel del locus *bvg* pueden llevar a un fenómeno irreversible denominado **cambio de fase** (228,229,239,241). Este término se refiere a la aparición de variantes avirulentas genéticamente estables a través de los subcultivos, que no expresan los factores *bvg*-activados. La frecuencia de obtención de estos mutantes es de  $10^{-6}$  (146). Hasta el momento se han podido caracterizar dos tipos de mutaciones espontáneas que llevan a dichas variantes de fase: en *B. pertussis* es el resultado de un corrimiento del marco de lectura dentro de una cadena de citosinas (411), mientras que para *B. bronchiseptica* se debe a pequeñas deleciones (de unos 50 a 500 pb) en el gen *bvgS* (302). El significado de estas mutaciones en relación con la biología y la evolución de *B. pertussis* y de las otras especies de *Bordetella* aún no se ha esclarecido.

Otro fenómeno mediado por el locus *bvg* es la **modulación fenotípica** que consiste en la alternancia reversible entre dos fases fenotípicas diferentes denominadas  $Bvg^+$  o virulenta y  $Bvg^-$  o avirulenta (77). Este fenómeno ocurre en respuesta a ciertas señales del entorno denominadas agentes moduladores tales como temperatura, presencia de  $MgSO_4$  o ácido nicotínico en el medio de cultivo, que son sensadas por los productos BvgAS que codifica *bvg* (Fig. I.5) (21,22,84,409,431,432).



Recientemente se ha demostrado que BvgS puede sensar señales redox del medio ambiente (43). Esto provee una visión interesante respecto al origen evolutivo de este sistema en *Bordetella*. La regulación de genes metabólicos (citocromo d y c oxidasas) y genes de virulencia / avirulencia por parte de un mismo sistema sugiere que el

sistema BvgAS fue utilizado por el ancestro de la bacteria que hoy es patogénica (81,113). Los genes cuyos productos están involucrados en el ciclo infeccioso de la bacteria podrían haber sido adquiridos posteriormente y ser sometidos a la regulación de BvgAS previamente presente, probablemente debido los requerimientos simultáneos de la expresión de ciertos factores bacterianos y de las citocromo - oxidasas.

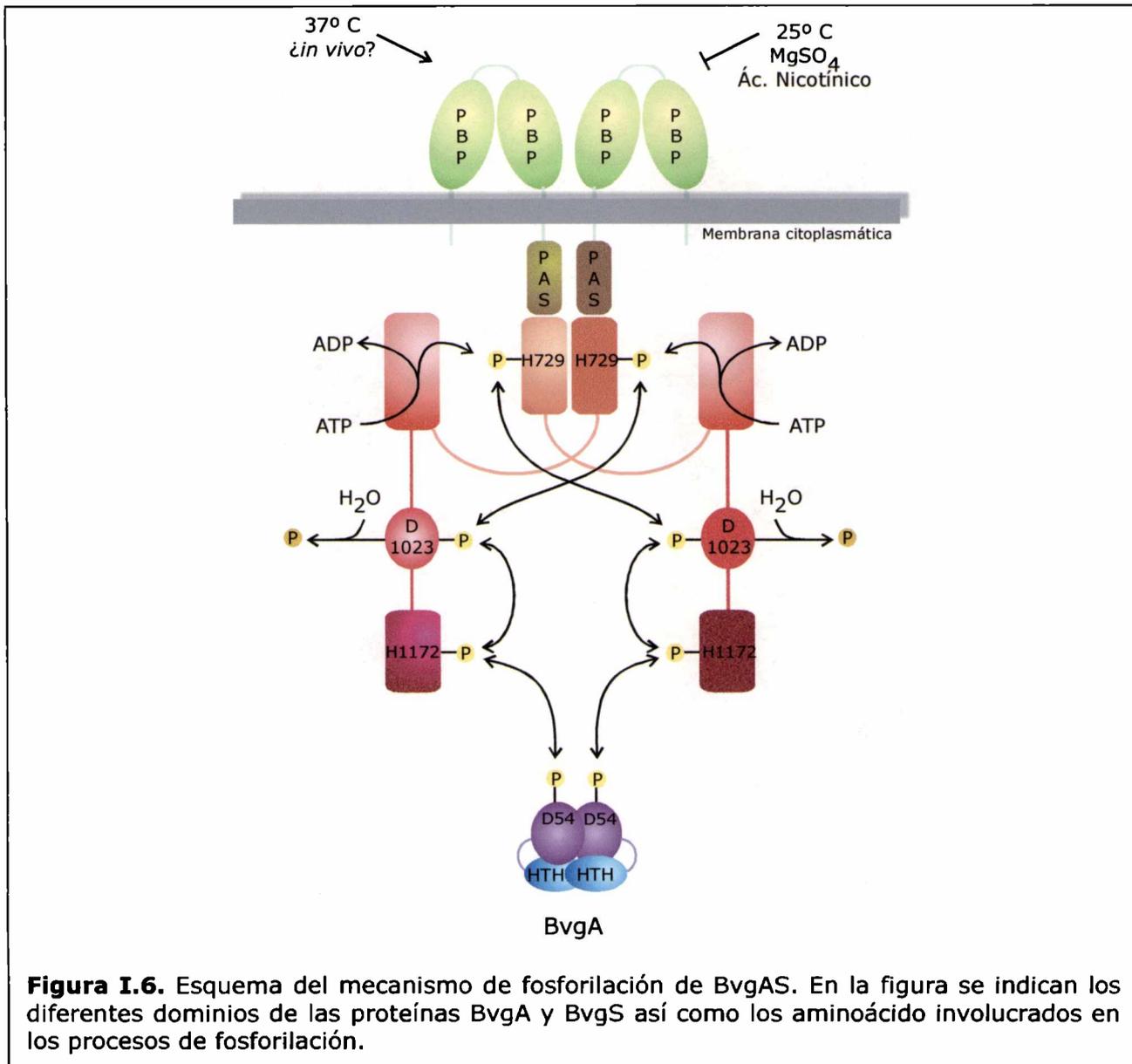
En ausencia de cualquiera de las señales descritas las proteínas BvgAS se expresan y regulan positivamente la expresión de los genes que codifican para factores de virulencia mencionados (denominados *vag* por *virulence-activated genes*). Además estas proteínas regulan negativamente la síntesis de algunas proteínas de membrana externa (genes denominados *vrg* por *virulence-repressed genes*) (22), citocromos y en forma particular a la flagelina, la ureasa y sideróforos en *B. bronchiseptica* (7,81,113,143,275). Así, la fase Bvg<sup>+</sup> o virulenta presente cuando BvgAS está activo, se caracteriza por la expresión de los genes que codifican para la mayoría de los factores asociados a la patogénesis del microorganismo, mientras que la fase Bvg<sup>-</sup> o avirulenta presente cuando BvgAS está inactivo se caracteriza por la ausencia de los productos codificados por los genes *vag* y por la expresión de los genes *vrg*. Sin embargo, mediante el empleo de diferentes concentraciones de los moduladores en condiciones de laboratorio es posible describir no sólo las fases Bvg<sup>+</sup> y Bvg<sup>-</sup>, sino además la fase intermedia o Bvg<sup>i</sup> (Fig. I.5). Esta última se caracteriza por expresar algunos factores de virulencia, como hemaglutinina filamentosa, pertactina y adenilato ciclasa - hemolisina y una proteína cuya expresión es máxima y casi exclusiva de esta fase denominada BipA (por la sigla en inglés *Bordetella intermediate protein*) (99,101). La caracterización de esta fase intermedia ha permitido describir al funcionamiento del sistema BvgAS como un mecanismo tipo reóstato y no del tipo interruptor de encendido y apagado observado en otros sistemas de dos componentes (82). Se ha sugerido que existe una graduación de fases entre la fase virulenta y la avirulenta, además de la fase intermedia descrita (99). Así, este sistema permitiría una gradual regulación del conjunto de genes durante el transcurso de la infección.

El componente sensor del sistema BvgAS es la proteína BvgS (135 KDa) y el regulador transcripcional citoplasmático es la proteína BvgA (20).

La proteína **BvgS** posee dos dominios transmembrana, un dominio linker y otras regiones usualmente relacionadas con el regulador de respuesta BvgA (20,33,411). La porción N-terminal de BvgS que se encuentra en el espacio periplásmico (411) junto a la región linker consecutiva, son las responsables de sensar y transmitir respectivamente la señal externa hacia la parte C-terminal presente en el citoplasma de la bacteria (263). La delección de esta última porción hace que BvgS no sea funcional (18). En el espacio citoplasmático BvgS se encuentra dividida en tres dominios diferentes, transmisor, receptor y el extremo C-terminal responsable de la transferencia final de un grupo fosfato a BvgA. Por lo tanto, BvgS pertenece al grupo de proteínas sensoras no ortodoxas que poseen dominios transmisores y receptores

unidos entre sí. La región receptora, el transmisor y el dominio C-terminal se encuentran separados por secuencias ricas en prolina y alanina de unos 15 aminoácidos de longitud (20). Este tipo de secuencias posibilitan la interacción entre diferentes dominios en otras proteínas debido a que forman zonas de alta flexibilidad.

La traducción de la señal se inicia en presencia de condiciones ambientales particulares con una fosforilación autocatalizada de BvgS dependiente de ATP en una histidina (H<sub>729</sub>) presente en el dominio transmisor (Fig. I.6). La transferencia del grupo fosfato hacia el dominio C-terminal es dependiente de la presencia del dominio receptor. Este último dominio no sólo regula de manera positiva esta transferencia, si no que puede revertir la transferencia refosforilándose a sí mismo retardando la activación de BvgA (Fig. I.6). Finalmente, el dominio C-terminal de BvgS traduce la señal fosforilando a BvgA. Esta forma fosforilada de BvgA, BvgA~P, es la que posee mayor afinidad por los sitios de unión presentes en los promotores de los factores de virulencia regulados por este sistema (48,50,202,409).



**Figura I.6.** Esquema del mecanismo de fosforilación de BvgAS. En la figura se indican los diferentes dominios de las proteínas BvgA y BvgS así como los aminoácidos involucrados en los procesos de fosforilación.

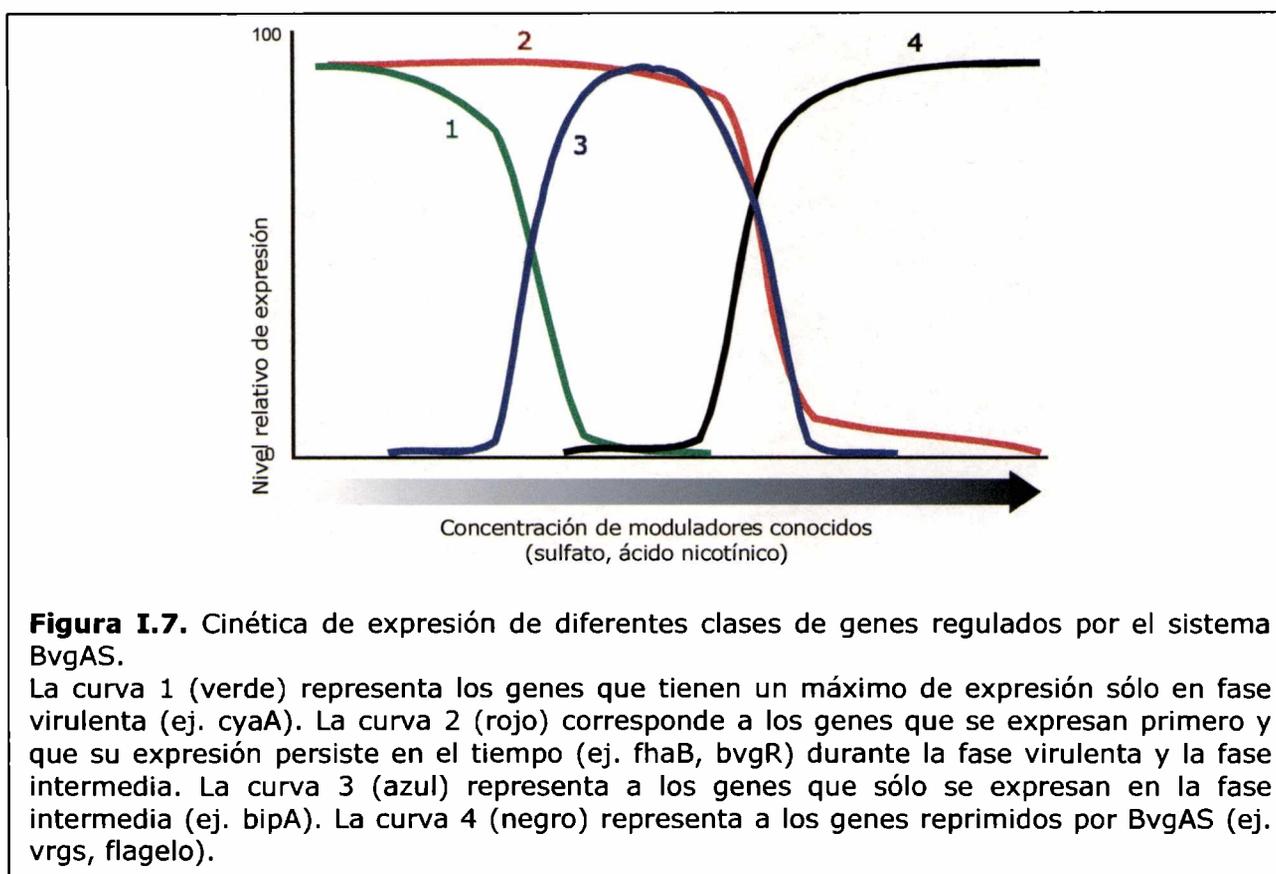
**BvgA** es una proteína citoplasmática de 23 kDa que contiene dos dominios, un dominio receptor en su extremo N-terminal, y un motivo hélice-turn-hélice (HTH) en su extremo C-terminal (432). Este motivo es característico de los reguladores de respuesta y es el que le permite a BvgA unirse al ADN en forma específica en las regiones promotoras de los genes activados por *bvg* (49,412). Los últimos 20 aminoácidos de la región C-terminal no son parte del motivo HTH pero también participan de la unión al ADN, posiblemente estabilizando esta interacción (49,200). El dominio HTH de BvgA tiene una secuencia similar a la de otros reguladores transcripcionales como FixJ de *Sinorhizobium meliloti*, UhpA y NarL de *E. coli* (200). Además presenta homología con la proteína LuxR de *Vibrio fischeri* (73) y con el extremo C-terminal de algunos factores  $\sigma$  bacterianos (400).

Como sitio de unión de BvgA se ha descrito una secuencia TTT(C/G)NTA de siete bases y secuencias homólogas que se encuentran de manera directa o invertidas en los genes regulados por BvgA (202,364). La unión de BvgA~P a estas secuencias induciría la oligomerización de BvgA (378). El dímero de BvgA~P presenta una mayor afinidad por la secuencia consenso de siete bases (48). Esta secuencia se encuentra en general alejada del inicio de transcripción, sin embargo una vez que se une un dímero de BvgA~P a la secuencia consenso se unen luego sucesivos dímeros hasta alcanzar el sitio de unión de la ARN polimerasa. Esta enzima a su vez interacciona con la molécula de BvgA~P adyacente al inicio de transcripción de manera de que este proceso se inicie con mayor eficiencia (49).

La transcripción del operón *bvgAS* es controlada por tres promotores auto-regulados, P<sub>1</sub>, P<sub>3</sub> y P<sub>4</sub>, y por un promotor independiente de *bvg*, P<sub>2</sub> (366,378). La transcripción a partir de P<sub>2</sub> es constitutiva, y mantiene un nivel basal de las proteínas BvgA y BvgS, aún durante la fase avirulenta de la bacteria. Los promotores P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> y P<sub>3</sub> participan de la transcripción de *bvgAS*, mientras que P<sub>4</sub> produce un ARN antisentido complementario al ARN producido por los otros tres promotores. La interacción ARN-ARN antisentido podría participar en la estabilización de los transcritos, evitando la formación de estructuras secundarias y favoreciendo la interacción con los ribosomas (378).

Los genes regulados por BvgA pueden ser agrupados en cuatro clases según la cinética de expresión (Fig I.7). Los primeros promotores que se expresan son los de la clase 2 presentes por ejemplo en la adhesina FHA y en las fimbrias. Mediante delecciones, ensayos de protección con ADNasa I y de movilidad retardada en geles se han identificado en la región promotora de estos genes secuencias repetidas e invertidas de siete nucleótidos TTT(C/G)NTA centradas en posición -88.5 (364). Estas secuencias son sitios de unión de alta afinidad para BvgA, que puede unirse a esta región aún cuando no está fosforilada. Sin embargo, la afinidad es mayor cuando la proteína se encuentra fosforilada (BvgA~P), ocupando la región entre -100 y -71 pares de bases. Otros dos dímeros de BvgA~P deben unirse a la zona adyacente ubicada en -35 para lograr la activación de este gen. Esta unión, a diferencia de la anterior, tiene carácter cooperativo y sería independiente de la secuencia nucleotídica

(47,51). Finalmente, la ARN polimerasa interacciona con uno de estos dímeros a través de su subunidad  $\alpha$  uniéndose a la otra cara de la hélice de ADN en forma cooperativa, logrando de esta forma la transcripción de genes como *fha* (47,49).



Los genes de la clase 1 como *cyaA* y *ptxA*, no poseen sitios de unión para BvgA de alta afinidad y en su lugar se encuentran múltiples secuencias con leves diferencias respecto a las de alta afinidad espaciadas a lo largo de la secuencia upstream de cada uno de los genes (155,202). BvgA debe estar fosforilado para unirse a estos sitios y la concentración de los dímeros es mucho mayor a la requerida para que se active *fhaB* y por ello se transcriben más tardíamente (48,155,202). Este requerimiento de mayores concentraciones de BvgA~P de las necesarias para activar la transcripción de los genes tempranos es debido a diferencias en las secuencias repetidas e invertidas de siete nucleótidos a los que se une BvgA~P, las cuales coinciden en sólo cinco de los siete nucleótidos consenso. Además estas secuencias se encuentran más alejadas del promotor y su ubicación determina que la distancia entre monómeros de BvgA~P no sea la óptima (473). Así el modelo sugerido activación transcripcional requiere de la unión cooperativa de múltiples dímeros fosforilados de BvgA~P a varios sitios de relativamente baja afinidad.

Los genes de clase 3 presentan un patrón de expresión más complejo. En el caso de un gen que codifica para una proteína característica de la fase intermedia BipA (*bipA*), se han descrito secuencias consenso de unión para BvgA de alta y baja afinidad (101). El primero se encuentra upstream del gen y actuaría de igual manera que en el caso de *fhaB*. Sin embargo los sitios de baja afinidad se encuentran

ubicados downstream del inicio del gen *bipA*. La unión de BvgA~P a estos sitios impediría la transcripción del gen, probablemente impidiendo de manera estérica la unión de la ARN polimerasa al sitio de inicio de la transcripción. A través de la detección de manera cuantitativa de los moduladores de BvgAS es posible regular la relación de concentraciones entre BvgA y BvgA~P. El delicado balance entre estas dos formas de BvgA permiten o no la expresión de los genes de la fase intermedia. Mientras que la concentración de BvgA~P es alta tanto los sitios de alta como de baja afinidad se encuentran ocupados por lo que estos genes no se expresarán. Al disminuir el nivel de la forma activa de BvgA los sitios de baja afinidad son liberados y el gen de fase intermedia es expresado. Finalmente, una vez que la cantidad de BvgA~P haya descendido notablemente los sitios de alta afinidad serán liberados y el gen deja de ser expresado (99,100).

La información disponible acerca de los mecanismos de regulación de la transcripción de los genes clase 4 que corresponde a proteínas propias de la fase avirulenta (genes *vrg*) es aún escasa. Sólo en el caso de *B. pertussis* se ha descrito que el mecanismo de inactivación de estos genes es de manera indirecta a través de la participación de una proteína reguladora denominada BvgR (284). El gen que codifica para este regulador (gen *bvgR*) se encuentra río abajo del locus *bvgAS* (284). Este gen ha sido descrito recientemente en *B. pertussis* y su producto de transcripción BvgR contiene motivos de reconocimiento de secuencias consenso presentes en los promotores de los genes *vrg* (31). A su vez este gen es regulado negativamente por BvgA (282). Es decir que su regulación es diferente a la observada en los genes *vag* (283). Mientras que para los genes *vag*, la unión de BvgA~P ocurre de manera secuencial desde un punto apartado del sitio de unión de la ARN polimerasa hacia dicho sitio, en el caso del gen *bvgR* la unión ocurre primero cerca de este sitio y luego en los más alejados. Para visualizar más sencillamente como trabajaría toda esta maquinaria en las figuras I.5 y V.1 se muestra un esquema indicando las relaciones entre el locus *bvgAS*, el gen *bvgR* y los genes *vag* y *vrg*. La reciente publicación del genoma completo de *B. bronchiseptica* ha permitido determinar la presencia de este gen en esta especie. Sin embargo, no han sido publicados aún resultados acerca de la posible función de este gen represor en la patogénesis de *B. bronchiseptica*.

Las características presentes en los promotores regulados por Bvg sugieren que el sistema BvgAS es capaz de controlar en forma diferencial su expresión, cambiando la concentración intracelular de BvgA~P. La cinética de activación de los genes de BvgAS ha sido estudiada en varios trabajos (218,377). En los mismos se han realizado ensayos *in vitro* en los cuales se determinaron los niveles de expresión de los genes activados por este sistema en *B. pertussis*, mediante detección de ARNm e inmunodetecciones en cultivos que pasaron de condiciones avirulentas a condiciones virulentas. En la fase avirulenta existe un nivel basal de BvgA muy bajo, que aumenta gradualmente luego de activarse el sistema BvgAS. Mientras que los transcriptos correspondientes a BvgAS, FHA, fimbrias y BvgR son detectados inmediatamente y el

correspondiente a PRN en una hora (218) los que codifican para PT y AC - Hly lo hacen en 2 a 4 horas. Los niveles de BvgA deben aumentar unas 50 veces respecto del basal para lograr detectar estos últimos transcriptos. Si bien en estos ensayos no se ha diferenciado si BvgA estaba o no fosforilada, es esperable que la mayoría de las moléculas lo estuvieran, ya que la respuesta de BvgS a las condiciones de virulencia es probablemente muy rápida. Estos trabajos indican, por lo tanto, que BvgAS modifica la expresión de los factores que regula mediante cambios en la concentración intracelular de BvgA~P. En condiciones de semimodulación (Bvg<sup>i</sup>), los niveles de BvgA~P se encuentran en una concentración intermedia entre el máximo alcanzado bajo condiciones de virulencia y el mínimo de condiciones de avirulencia. En estas condiciones BvgA~P sería capaz de activar a los genes tempranos (*fhaB* y *fim*) y al gen *bipA* y de reprimir a los genes *vrg*, dando lugar a la denominada fase intermedia. Al llevar a los cultivos a condiciones de fase virulenta, los genes tardíos (*cya* y *ptx*) son activados, mientras que el gen *bipA* es reprimido, debido a la unión de BvgA~P a sitios represores de baja afinidad.

En la actualidad sólo se conocen algunas señales que actúan *in vitro* a través de BvgAS pero aún no se podido determinar si este sistema funciona *in vivo* y menos aún cuáles serían las señales que estarían siendo sensadas. Experimentos empleando mutantes que expresan constitutivamente las proteínas del sistema BvgAS o por el contrario que sean defectivos en la expresión del mismo muestran que la fase virulenta (Bvg<sup>+</sup>) es necesaria y suficiente para que se desarrolle la infección (83) mientras que la fase Bvg<sup>-</sup> o avirulenta sería incapaz de iniciar la infección (83,133,266). En el caso de *B. bronchiseptica* la fase avirulenta parece ser la más apta para el desarrollo de la bacteria en condiciones limitantes de cultivo. Estos datos sugieren que la función de BvgAS es sensar si la bacteria se encuentra dentro o fuera del tracto respiratorio del mamífero y así actuar en consecuencia. Dado que *B. bronchiseptica* y no *B. pertussis* ha sido encontrada fuera del hospedador se ha sugerido que la fase Bvg<sup>-</sup> en *B. pertussis* es un remanente evolutivo sin una función actual (82). Sin embargo, el hecho que no ocurra la evolución hacia una expresión constitutiva a través de una simple sustitución de una base en BvgS como es el cambio de Histidina por Arginina en la posición 570 hace pensar que este sistema de dos componentes tenga una función *in vivo* (289).

La fase intermedia en *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* parecen ser similares y estarían involucradas en la transmisión en forma de aerosol de las bacterias entre los hospedadores (415). Scarlato y colaboradores (1993) han sugerido que cuando *Bordetella* se encuentra con un nuevo hospedador, las adhesinas deben ser expresadas en primer lugar para mediar la adhesión a los tejidos epiteliales, mientras que las toxinas no son expresadas hasta unas horas después (376). Durante estas primeras horas la bacteria puede avanzar hacia un fenotipo Bvg<sup>+</sup> completo o volver al fenotipo Bvg<sup>-</sup> si es eliminado nuevamente al ambiente. El cambio de promotores entre los factores de virulencia de manera de alterar la cinética de expresión de

adhesinas y toxinas impiden la correcta infección de *B. bronchiseptica* en el modelo murino (218).

El sistema BvgAS no es el único sistema de dos componentes descrito para *Bordetella*. La descripción del sistema Ris en *B. bronchiseptica* ha ampliado el conocimiento acerca de los mecanismos de regulación de los factores de virulencia de este género. Al igual que BvgAS, el sistema Ris (del inglés *regulator of intracellular response*) está compuesto por un regulador (RisA) y un sensor (RisB) (199). Ambos genes del locus se encuentran separados entre sí por una única base en *B. bronchiseptica* y en *B. pertussis*. El sistema se encuentra involucrado esencialmente en la resistencia al estrés oxidativo y regular la expresión de una fosfatasa ácida. Esta proteína es la única que se conoce es regulada por Ris. La expresión de esta enzima es inducida durante la vida intracelular probablemente para poder resistir la acción oxidativa del contenido lisosomal (199,472). La relevancia de este sistema en el proceso global de infección queda aún por ser determinado de manera definitiva.

La comprensión de los mecanismos que gobiernan la expresión de los diferentes factores de virulencia ha avanzado en mayor grado al conocimiento obtenido sobre cuando y por qué esta regulación ocurre. La hipótesis más aceptada considera a la fase avirulenta de *Bordetella* como la adecuada para la supervivencia fuera del hospedador. La ausencia de un nicho fuera de éste para *B. pertussis* entre otras observaciones indican que el modelo propuesto presenta aristas no del todo resueltas. La comprensión de la función del sistema BvgAS durante una infección *in vivo* permitirá sin duda avanzar en este aspecto, permitiendo finalmente comprender el ciclo infeccioso de las bacterias del género.

### **Variación de la expresión de diferentes factores bacterianos *in vivo***

Un aspecto importante de destacar es que algunas especies del género *Bordetella* como *B. bronchiseptica* pueden persistir en el hospedador por largos períodos de tiempo, contribuyendo a la existencia de portadores asintomáticos y a estadios crónicos de la infección. En pacientes en los cuales se ha podido determinar el fenómeno de persistencia se ha observado que las bacterias que se aislaron en los estadios tempranos de la enfermedad expresaban las adhesinas y toxinas necesarias para iniciar la infección, pero no así las bacterias que se aislaron luego de cierto tiempo que los síntomas de la enfermedad han desaparecido (160). Asimismo, se han observado variaciones en la estructura del lipopolisacárido (LPS) (159), uno de los principales componentes de la superficie bacteriana. Estas modificaciones presentes durante un proceso crónico de infección podrían obedecer a un proceso adaptativo en respuesta a la defensa montada por el hospedador ante la presencia del patógeno.

En *Bordetella* spp es bien conocida la variación *in vitro* de los factores de virulencia de acuerdo con las condiciones del entorno. Como hemos descrito más arriba a través del funcionamiento del sistema de dos componentes BvgAS ciertas señales externas como la baja temperatura, la presencia de iones sulfato o de ácido nicotínico inhiben la expresión de las adhesinas y toxinas y a la vez activan la síntesis de otras

moléculas (variante avirulenta) (21,22,77,84,431,432). La ausencia de dichos agentes activa la síntesis de los factores de virulencia (variante virulenta). Si bien la identidad de los moduladores de la expresión *in vivo* aún se desconoce, se cree que la regulación ejercida por el locus *bvg* tendría un rol importante en el curso de la infección, en particular en la persistencia de la bacteria en el hospedador. Así, la fase avirulenta de *B. bronchiseptica* ha sido descripta como la más apta para persistir dentro de células eucarióticas en ensayos *in vitro* (25). Por otra parte, en infecciones respiratorias de cobayos se detectaron anticuerpos contra el factor de avirulencia flagelina (7). Sin embargo, el rol que cumplen los factores de avirulencia y la fase avirulenta en el ciclo infeccioso de *Bordetella* no ha sido completamente determinado.

### **Objetivos de este trabajo de Tesis**

Este trabajo de Tesis está orientado hacia la profundización del conocimiento sobre la etapa de persistencia tanto *in vitro* como *in vivo* de *Bordetella bronchiseptica* y de los factores en ella involucrados. Esta etapa si bien es la menos estudiada reviste especial interés desde el punto de vista epidemiológico por estar asociada con la diseminación bacteriana en la población. Este aspecto de transmisión de enfermedades se ha hecho crítico en países como Argentina, en donde las condiciones socio-culturales y sanitarias se han empobrecido vertiginosamente en los últimos años. En la actualidad, la población es más susceptible a contraer infecciones causadas por microorganismos que, por ejemplo, eran considerados primariamente patógenos de animales. De hecho, en un relevamiento realizado por nuestro grupo durante los últimos años se ha podido detectar la presencia de *B. bronchiseptica* en pacientes pediátricos (123).

Los estudios moleculares sobre la etapa de persistencia o cronicidad de la enfermedad son los que podrán contribuir al desarrollo de estrategias que realmente tiendan a erradicarla en forma definitiva.

Los mecanismos por los cuales las bacterias son capaces de desarrollar procesos crónicos de infección son diversos y no del todo conocidos, sin embargo todos ellos se caracterizan porque la bacteria escapa a la respuesta inmune desarrollada durante la etapa aguda de infección. Esta evasión puede lograrse porque el patógeno: 1- modifica la respuesta inmunológica del hospedador, 2- se oculta en algún nicho dentro del hospedador en el que no está accesible a la respuesta inmune, 3- varía la expresión y/o la estructura de sus antígenos, o 4- una combinación de todas estas posibilidades. De todos ellos, el cambio de los epitopes expuestos a la acción inmune del hospedador que se denomina variación antigénica, parece ser el mecanismo de evasión más ampliamente distribuido entre los patógenos. Esta variación puede ocurrir a través de mutaciones, recombinaciones a nivel génico o a través de sistemas de transducción de señales que median la alternancia entre dos estados fenotípicos diferentes. *B. bronchiseptica* es un ejemplo de patógenos capaces de variar de la expresión de antígenos en respuesta a distintas señales del entorno. Al momento de iniciar este trabajo de Tesis, este fenómeno de variación había sido propuesto como esencial para el desarrollo del ciclo de vida del patógeno. Además, la hipótesis más

aceptada era que la fase fenotípica caracterizada como de avirulencia era la más apta para persistir en condiciones de escasez de nutrientes. Con el fin de analizar estas hipótesis nos propusimos estudiar particularmente la participación de la fase avirulenta y de los factores que se expresan durante la misma, en la supervivencia de *B. bronchiseptica*. Para ello en una primera etapa estudiamos *in vitro* la supervivencia de diferentes cepas de *B. bronchiseptica*. Trabajamos con una cepa con el sistema de regulación de fases intacto, una cepa que se encuentra bloqueada en la fase avirulenta, y por ende no puede pasar a la fase virulenta y un mutante defectivo en la expresión de un único factor de avirulencia. En todos los casos analizamos si las distintas bacterias son capaces de persistir por largos períodos y de ser así en qué fase fenotípica lo hacen.

Luego, en una segunda etapa, abordamos la temática de variación fenotípica y la relevancia de la fase de avirulencia en el marco de la interacción patógeno - hospedador. Empleamos para ello dos estrategias de estudio diferentes. Una de ellas consistió en la construcción de bacterias defectivas en la expresión de un único marcador de avirulencia y la otra en la construcción de una cepa que expresara simultáneamente factores de virulencia y avirulencia. En ambos casos se analizó el comportamiento de estas bacterias en su interacción con el hospedador ya sea a través de ensayos *in vitro* empleando células de línea o *in vivo* empleando el modelo de infección intranasal en ratones.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

#### **1. Análisis de la supervivencia de *B. bronchiseptica* *in vitro*.**

**1.1. Construcción de mutantes de *B. bronchiseptica* defectivos en la expresión del gen *bvgA* (mutante bloqueado en fase avirulenta) y del gen *flaA* que codifica para la flagelina (mutante defectivo en un único factor de avirulencia).**

**1.2. Caracterización fenotípica de los mutantes defectivos**

**1.3. Estudio de la supervivencia de diferentes cepas de *B. bronchiseptica* en medios líquidos sintéticos o en condiciones de escasez de nutrientes.**

#### **2. Análisis del comportamiento de un mutante defectivo en la expresión de un marcador de avirulencia en la interacción patógeno - hospedador.**

**2.1. Adhesión, invasión y supervivencia dentro de las células de mucosa respiratoria.**

**2.2. Empleo del modelo de infección intranasal en ratones.**

**i) Determinación de la dosis letal cincuenta.**

**ii) Colonización en pulmones.**

**iii) Persistencia.**

**2.3. Estudio del rol de la estructura flagelar en *B. bronchiseptica*.**

Análisis de la función secretora del flagelo. Purificación y análisis funcional de proteínas diferenciales observadas en los sobrenadantes de cultivo del mutante mediante geles de poliacrilamida. Identificación de proteínas por huella peptídica (MALDI-TOF).

**3- Construcción de un mutante defectivo en la expresión de una proteína regulatoria de la expresión de los factores de avirulencia.****3.1. Caracterización fenotípica de mutantes defectivos en la expresión de BvgR.****3.2. Análisis del comportamiento de un mutante defectivo en la expresión de *bvgR* en la interacción patógeno - hospedador.****Significado de esta investigación**

La compleja interacción entre un patógeno y su hospedador constituye la base del desarrollo de una enfermedad infecciosa. A través del conocimiento molecular de esta interacción es posible identificar los factores bacterianos asociados a la virulencia y las estrategias de defensa desencadenadas por el hospedador. Esta información resulta ser esencial para el diseño de nuevas herramientas médicas preventivas más eficaces. Si bien en el caso de *Bordetella* spp se ha avanzado considerablemente en la definición de componentes involucrados en la interacción microorganismo-hospedador, resta aún realizar una exploración más acabada del proceso infeccioso incluyendo las etapas de persistencia y cronicidad. En el presente trabajo se mostrarán los resultados alcanzados sobre el estudio del rol de la variación fenotípica en la patogénesis y la persistencia de la bacteria en el hospedador. Los resultados obtenidos han revelado nueva información sobre el rol de los productos de los genes *vrg* en la interacción patógeno-hospedador que esperamos contribuyan al conocimiento de esta interacción.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **Capítulo II**

## 1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas en este trabajo se describen en la *Tabla II.1*.

*Tabla II.1: Descripción de las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.*

Cepa o aislamiento	Descripción	Referencia
<i>Bordetella</i>		
<i>B. bronchiseptica</i> 9.73 ( <i>Bb9.73</i> )	Cepa obtenida de un conejo. LPS liso. BvgAS <sup>+</sup> . AC-Hly <sup>+</sup> . PRN <sup>+</sup> . FHA <sup>+</sup> . Sm <sup>r</sup>	158
<i>B. bronchiseptica</i> <i>bvgA</i> <sup>-</sup> ( <i>BbBvgA</i> <sup>-</sup> )	Cepa mutante defectiva en la expresión de <i>bvgA</i> obtenida a partir de <i>Bb9.73</i> por mutagénesis insercional sitio específica. LPS liso. No hemolítica. Sm <sup>r</sup> . Km <sup>r</sup>	Esta Tesis
<i>B. bronchiseptica</i> <i>bvgR</i> <sup>-</sup> ( <i>BbBvgR</i> <sup>-</sup> )	Cepa mutante defectiva en la expresión de <i>bvgR</i> obtenida a partir de <i>Bb9.73</i> por mutagénesis insercional sitio específica. LPS liso. Hemolítica. Sm <sup>r</sup> . Km <sup>r</sup>	Esta Tesis
<i>B. bronchiseptica</i> <i>flaA</i> <sup>-</sup> ( <i>Bbfla</i> <sup>-</sup> )	Cepa mutante defectiva en la expresión de <i>flaA</i> obtenida a partir de <i>Bb9.73</i> por mutagénesis insercional sitio específica. LPS liso. Hemolítica. No móvil en condiciones de avirulencia. Sm <sup>r</sup> . Km <sup>r</sup>	Esta Tesis
<i>Escherichia coli</i>		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>RecA</i> , $\Delta$ <i>lacU169</i> , $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15	Bethesda Res. Lab.
<i>E. coli</i> S17-1	RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 integrado en el cromosoma	395
<b>Plásmidos</b>		
pk18mob	Mob Km <sup>r</sup>	379
pHC60	Mob Tc <sup>r</sup> GFP derivado de pSW213	71
pgemT-Easy	Vector multicopia Amp <sup>r</sup>	Promega

**1.1. *Bordetella bronchiseptica*.** las suspensiones bacterianas se conservaron como liofilizados y/o a -20 °C y -80 °C en presencia de glicerol 50% y 25% v/v, respectivamente. Los liofilizados bacterianos se resuspendieron en una solución de casaminoácidos al 1% p/v y se plaquearon en el medio sintético de Stainer-Scholte (SS) (406) sólido suplementado con 15% v/v de sangre desfibrinada de caballo (SSs) o en medio sólido Bordet-Gengou (BG) (45) suplementado con 15% v/v de sangre desfibrinada de caballo o carnero. Las bacterias se cultivaron durante 48 horas y luego se subcultivaron por 24 hrs. en placas SSs o BG a 37° C. La composición de ambos medios se describen a continuación.

### Stainer-Scholte (SS)

Glutamato de sodio monohidrato	0,57 M
L-Prolina	0,02 M
NaCl	0,43 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,036 M
KCl	0,02 M
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	5 mM
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1,4 mM
Tris - HCl	0,12 M
Agar-agar (en SSs)	1,5 % p/v
pH 7.2	

### Bordet- Gengou (BG)

Papas peladas	125 g/l
Glicerina	1% v/v
NaCl	66 g/l
Peptona	44 g/l
Agar - agar	24 g/l
Sangre de carnero	15% v/v

**Complemento 20 ml 10X**

L-Cisteína	800 mg
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	200 mg
Ac ascórbico	400 mg
Ac. Nicotínico	80 mg
HCl <sub>(C)</sub>	2 ml

Cultivo de microorganismos en medio líquido en presencia de agentes moduladores de fase. Para el cultivo de la fase virulenta se utilizó el medio de cultivo de Stainer Scholte cuya composición se describió anteriormente, sin suplementar con sangre de caballo y sin el agregado de agar. Las bacterias fueron cultivadas en frascos erlenmeyers con una relación entre el volumen de medio y volumen de frasco de 1:4 a 160 rpm y 37°C.

En las ocasiones en que fue necesario realizar cultivos en condiciones de avirulencia las bacterias cultivadas en medio sólido SSs durante 48 horas a 37°C se repicaron en medio líquido SS con MgSO<sub>4</sub> en una concentración final de 40 mM, a 37°C. En todos los casos se verificó la presencia de bacterias en fase avirulenta mediante el análisis de la morfología de las colonias en medio sólido, la desaparición del halo de hemólisis y presencia de movilidad. Para ello se plaquearon diluciones adecuadas de una suspensión bacteriana en placas conteniendo SSs y transcurridas 16 horas se observó si las colonias presentaban halo de hemólisis. Aquellas colonias sin actividad hemolítica fueron seleccionadas a fin de evaluar si presentaban movilidad en el medio SS suplementado con agar 0,35% p/v. Transcurridas 18 horas se observó la movilidad como una opalescencia leve alrededor del punto de siembra.

**1.2. *Escherichia coli*.** Para el cultivo de este microorganismo se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (373) suplementado con antibióticos en los casos en que fue necesario.

**Luria-Bertani (LB).**

Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Glucosa	1 g/l
NaCl	0,085 M

**1.3. Antibióticos.** Cuando fueron requeridos, se adicionaron a los medios de cultivo soluciones concentradas de los mismos. Las concentraciones finales en los medios de cultivo fueron ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ):

para *E. coli*: Kanamicina (Km) 25; Gentamicina (Gm) 10 y Ampicilina (Amp) 200.

para *B. bronchiseptica*: Estreptomycin (Sm) 200, Gentamicina (Gm) 50, y Kanamicina (Km) 80.

## 2. Plásmidos y ADN genómico

**2.1. Purificación de plásmidos.** Los plásmidos utilizados y sus características más relevantes se describen en la Tabla II.1 Para la purificación de plásmidos se utilizó la técnica de lisis alcalina descrita por Sambrook y col. (1989) (373). Las composiciones de las soluciones empleadas se indican a continuación.

### Soluciones para lisis alcalina para la obtención de plásmidos

Solución I		Solución II		Solución III	
Glucosa	50 mM	SDS	1% p/v	AcK 5 M	60 ml
Tris-HCl	25 mM	NaOH	0,2 M	AcH glacial	11,5 ml
EDTA	10 mM			Agua destilada	28,5 ml
pH 8					

Para la precipitación de los plásmidos se empleó isopropanol en una relación de volúmenes 1:1. Luego de centrifugar, el sedimento obtenido se lavó con etanol 70% v/v. Para la resuspensión de los plásmidos se empleó 20  $\mu$ l de agua libre de ADNasa conteniendo ARNasa (1 mg ml<sup>-1</sup>).

**2.2. Extracción de ADN genómico.** Para la obtención de ADN genómico, las células provenientes de un cultivo sólido o líquido se resuspendieron en N-lauril sarcosina 0,1% p/v en Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM pH 8 (TE) y se lavaron con NaCl 1 M. Luego de una centrifugación a 8.000 X g durante 5 minutos, el sedimento celular obtenido se resuspendió en 500  $\mu$ l sacarosa 10% p/v en TE conteniendo lisozima 1 mg ml<sup>-1</sup>. Luego de 1 hora de incubación a 37° C, se agregaron 100  $\mu$ l de pronasa (2,5 mg ml<sup>-1</sup> de TE). La suspensión fue mezclada por inversión y se incubó a 37° C durante 1-2 horas. Transcurrido este tiempo se le agregó 70  $\mu$ l de NaAc 3 M, 100  $\mu$ l de cloroformo y 200  $\mu$ l de solución de Fenol-Tris-HCl pH 8,00. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 22.000 X g y la fase superior acuosa obtenida se transfirió a un nuevo tubo y se repitió la extracción fenólica. Recogida la fase acuosa se procedió a la precipitación del ADN mediante la adición de 3 volúmenes de etanol 96% v/v frío (-20°C). El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70% v/v, luego de evaporar todo el alcohol, el ADN se resuspendió en 25-50  $\mu$ l de agua al que se añadió 1  $\mu$ l de una solución de ARNasa 1mg ml<sup>-1</sup>.

**2.3. Determinación de la concentración de ADN plasmídico o genómico.** Para la cuantificación de ADN se empleó el método espectrofotométrico (373). La absorbancia de las preparaciones de ADN fueron medidas a 260 y 280 nm. Las concentraciones fueron estimadas considerando que una DO<sub>260nm</sub>=1 corresponde a las siguientes concentraciones: 50 $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de ADN de cadena doble, 40  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de ADN de cadena sencilla o ARN, y 20  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de oligonucleótidos. La relación DO<sub>260nm</sub> / DO<sub>280nm</sub> se utilizó como medida estimativa de la pureza de la preparación, considerándose valores por debajo de 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Para muestras de ADN de baja pureza o baja concentración se empleó preferencialmente el método de comparación de fluorescencias en gel de agarosa bajo

luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida, también descrito por Sambrook y col. (1989) (373).

**2.4. Electroforesis de ADN.** El análisis cualitativo de las muestras de ADN y la separación de fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (0,8-2% p/v) empleando Tris-HCl 89 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 2,5 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 89 mM, pH 8,2 (TBE) como buffer de corrida. El voltaje de trabajo varió entre 5 y 12 volts/cm. Como solución de siembra se utilizó sacarosa 40% p/v y azul de bromofenol 0,25% p/v en una relación 5 µl solución de ADN en agua por cada 1 µl solución de carga.

**2.5. Revelado de los geles.** Para la visualización del ADN sobre los geles de agarosa se adicionó a los mismos 0,5 µg ml<sup>-1</sup> de bromuro de etidio. Este compuesto permite la visualización del ADN por transiluminación con luz ultravioleta. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara Polaroid o con una cámara digital Kodak modelo DC 290 (software-EDAS-Kodak) bajo iluminación ultravioleta.

**2.6. Tratamientos enzimáticos sobre las preparaciones de ADN.** Las digestiones de las distintas preparaciones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para la enzima, siguiendo las indicaciones propuestas por las casas comerciales (Boehringer o Promega) y las recomendaciones descritas en Sambrook y col. (1989) (373). Las reacciones se llevaron a cabo habitualmente con 0,5-5 µg de ADN, y 5-10 unidades de la enzima a utilizar en un volumen final de 10-25 µl. Las mezclas de reacción fueron incubadas a la temperatura óptima durante un período de tiempo no menor a 1 hora.

**2.7. Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa.** Para la determinación de los tamaños de los fragmentos de ADN obtenidos luego del tratamiento con enzimas restricción, se realizó una electroforesis de los mismos en geles de agarosa junto a un marcador de peso molecular. Luego de la electroforesis se representó una curva con el logaritmo del peso molecular de fragmentos de ADN de tamaño conocido del marcador molecular frente a la movilidad de cada uno de esos fragmentos. A partir de la misma y por interpolación se determinó el tamaño de los fragmentos analizados. Como patrones de peso molecular fueron utilizados ADN del fago lambda digerido con la endonucleasa de restricción *Hind*III o con las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RI.

**2.8. Electrotransformación de *E. coli*. Preparación de células electrocompetentes.** La transferencia de ADN hacia el interior de *E. coli* se realizó por electroporación usando un equipo Gene Pulser (Bio-Rad) y en cubetas de 0,2 ml bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (25 µF, 200Ω, 2,5 kV). Luego de la electrotransformación se adicionó inmediatamente a la suspensión bacteriana 1 ml de medio SOC o LB, y la mezcla se incubó 1 hora a 37°C para permitir la replicación del plásmido. Luego de la incubación las bacterias fueron plaqueadas en medio LB sólido selectivo e incubadas durante una noche a 37° C. Cuando fue necesario se

agregó previamente a las placas 50  $\mu\text{l}$  de solución de X-Gal 20 mg  $\text{ml}^{-1}$  en dimetilformamida.

Para la preparación de bacterias electrocompetentes se utilizó la técnica de Tung y Chow (1995) (428). Las bacterias se cultivaron en el medio LB a 37° C con agitación de 180 rpm hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0,8 unidades. Las células así obtenidas fueron centrifugadas a 2000 X g por 15 min. a 4°C y lavadas 2 veces con glicerol 10% v/v a 4°C. Finalmente, las células se resuspendieron suavemente en 0,5 ml de glicerol 10% v/v, 0,125% p/v extracto de levadura, 0,25% p/v triptona (GYT) a 0°C. La suspensión bacteriana así obtenida se fraccionó en alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  y se conservó a -80° C hasta el momento de ser utilizadas.

SOC		Glicerol Levadura Triptona (GYT)	
Extracto de levadura	5 g/l	Glicerol	10% v/v
Triptona	5 g/l	Extracto de levadura	1,25 g/l
NaCl	10 mM	Triptona	1,25 g/l
MgSO <sub>4</sub>	10 mM		
MgCl <sub>2</sub>	10 mM		

### 3. Aislamiento de diferentes componentes bacterianos y obtención de antisueros específicos

**3.1. Aislamiento de estructuras flagelares.** Los filamentos flagelares fueron purificados a partir de cultivos de *B. bronchiseptica* en condiciones de avirulencia (37°C MgSO<sub>4</sub> 40mM). Los cultivos líquidos en estas condiciones se centrifugaron a 5.000 X g 30 min. a 4°C. El pellet se resuspendió en PBS pH 7,2 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,0 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,0 mM, NaCl 0,123 M, pH 7,4) y se agitó con un vortex durante 2 minutos para remover las estructuras flagelares. Se centrifugó a 12.000 X g durante 15 min. a 4°C dos veces para remover las células bacterianas. Finalmente, el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 100.000 X g 2 horas a 4°C. El sedimento fue resuspendido y conservado a -80°C hasta el momento de su utilización.

**3.2. Obtención de AC-Hly de *B. bronchiseptica* mediante cromatografía de afinidad en sistema batch.** Para la obtención de AC-Hly se partió de un cultivo de *B. bronchiseptica* en fase logarítmica (aprox. 12 horas de incubación). El medio de cultivo empleado fue el medio sintético de Stainer Scholte. Se midió la D.O.<sub>650nm</sub> y se calculó el peso en gramos de bacterias presentes en el cultivo mediante la siguiente fórmula:

$$C(\text{g l}^{-1}) = 0,197 + 0,05814 \cdot \text{D.O.}_{650\text{nm}} + 0,22873 \cdot (\text{D.O.}_{650\text{nm}})^2$$

Se centrifugó la suspensión bacteriana a 16.000 X g durante 20 minutos. Las células se resuspendieron en una solución de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 conteniendo CaCl<sub>2</sub> 2,2 mM y Urea 5 M de manera de agregar 20 ml de solución cada 4 gramos de bacteria. En presencia de esta solución, las células bacterianas se incubaron durante una hora a

4° C con agitación suave. Luego se centrifugó a 16.000 X g durante 30 minutos a 4° C. Se tomó el sobrenadante y se agregaron cada 20 ml, 60 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,22 mM Tris-HCl pH 8 y 600 µl de calmodulina-agarosa (Sigma™). Se incubó la mezcla durante toda la noche a 4° C con agitación. Se centrifugó la mezcla 5 minutos a 13000 X g y se lavó la resina (calmodulina-agarosa + AC-Hly) 2 veces con CaCl<sub>2</sub> 0,22 mM Tris-HCl pH 8, una vez con 0,5 M NaCl CaCl<sub>2</sub> 0,22 mM Tris-HCl pH 8 y nuevamente dos veces con CaCl<sub>2</sub> 0,22 mM Tris-HCl pH 8. Finalmente se incubó el gel con Urea 8 M + CaCl<sub>2</sub> 2,2 mM Tris-HCl pH 8 una hora a temperatura ambiente, se centrifugó 5 minutos a 13000 X g. El sobrenadante así obtenido conteniendo la toxina se conservó a -20°C hasta el momento del ensayo. El lapso de tiempo entre la obtención de la toxina y la realización del ensayo nunca superó los siete días para evitar problemas por degradación proteica.

**3.3. Aislamiento del lipopolisacárido de *Bordetella* y análisis en geles de SDS-PAGE.** Los lipopolisacáridos de las bacterias crecidas en las diferentes condiciones fueron purificados por la técnica descrita por Valverde y colaboradores (1997) (Nuestro laboratorio:433). Brevemente, aproximadamente 20 mg de bacterias (peso húmedo) provenientes de medio sólido se resuspendieron en 100 µl de solución de EDTA - Trietilamina 100 mM pH 7,0. La suspensión se incubó con agitación suave durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó durante 2 minutos a 10.000 X g y el sobrenadante se transfirió a otro tubo al que se le agregaron 50 µl de una resina con polimixina B suspendida en 1,0 mM EDTA, 0,1 mM HEPES, pH 7,5 y 0,05 % azida de sodio (Affi-Prep Polymyxin®, Bio-Rad). La mezcla se incubó durante 15 minutos con agitación suave y luego se centrifugó durante 2 minutos a 10.000 X g. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 100 µl de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM y NaCl 150 mM pH 7,0, se mezcló y se volvió a centrifugar. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 50 µl de buffer de Laemmli 1X (Dodecil sulfato de sodio (SDS) 2% p/v, Glicerol 1% v/v, EDTA 0,02 M y Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8) y 4 µl de β-mercaptoetanol. Las muestras fueron calentadas en agua hirviendo durante 10 minutos y luego sonicadas durante 15 minutos. Las muestras así obtenidas se sembraron en geles de poliacrilamida 18% p/v con SDS preparados siguiendo la técnica descrita por Laemmli (233).

Las corridas se llevaron a cabo durante 60 a 90 minutos en equipos Miniprotean II (BioRad) a 100-120 volts utilizando buffer de corrida (Glicina 0,37 M, Tris-HCl 0,05 M pH 7,2). Una vez finalizada la corrida, los LPS se visualizaron mediante una tinción de plata según se describe a continuación. Luego de fijar el gel durante al menos 2 horas en solución de ácido acético 5% v/v en etanol 40% v/v, el mismo se incubó en solución de ácido periódico 0,7% p/v durante 10 minutos con el fin de oxidar a los grupos OH<sup>-</sup> adyacentes que se encuentran en los azúcares del LPS presente en el gel. Luego se realizaron 5 lavados con agua desionizada de 5 minutos cada uno para retirar el oxidante excedente. Posteriormente se realizó la coloración con una solución de plata al 10% v/v de Bio-Rad. Transcurridos 10 minutos se lavó seis veces con agua desionizada cinco segundos en cada lavado y se procedió al agregado del

desarrollador también de Bio-Rad (3 g en 200 ml de agua desionizada). El gel se incubó con dicha solución hasta aparición de color en las bandas correspondientes a los LPS presentes. La reacción se detiene con ácido acético 5% v/v. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara digital Kodak modelo DC 290 (software-EDAS-Kodak) bajo iluminación blanca.

**3.4. Obtención de suero específicos contra antígenos bacterianos.** A partir de las preparaciones de las proteínas purificadas (AC-Hly o flagelina) obtenidas previamente, se realizaron inoculaciones en ratones BALB/c (tres) por vía intraperitoneal. La cantidad de proteína empleada fue de 0,1 µg. Las mismas antes de ser inoculadas fueron homogenizadas con adyuvante de Freund completo. A los 15 y 21 días posteriores a la primera inoculación se realizaron nuevas inmunizaciones por la misma vía con la mezcla de cada proteína y adyuvante de Freund incompleto. Luego de 7 días de la última inmunización se extrajo a blanco la sangre de los ratones y se obtuvo el suero. Éste último fue dividido en alícuotas y conservado hasta el momento de ser utilizado a -20°C.

#### **4. Construcción de mutantes de *B. bronchiseptica* defectivos en la expresión de un único factor bacteriano**

Para la obtención de los diferentes mutantes de *B. bronchiseptica* defectivos en la expresión de un único factor se realizó una mutagénesis insercional sitio específica. Esta metodología consiste en clonar una secuencia de ADN interna a la región codificante del gen a interrumpir en vectores movilizables y suicidas en *Bordetella*. Estos plásmidos son transferidos por conjugación a cepas de *Bordetella* y luego los transconjugantes que hayan integrado al plásmido recombinante mediante un simple evento de recombinación homóloga se seleccionan por resistencia a antibióticos. A continuación se detalla en forma conjunta la metodología común que se siguió para la construcción de los mutantes de *B. bronchiseptica* defectivos en la expresión de BvgA (mutante al que denominamos *BbBvgA*<sup>-</sup>), en la expresión de la proteína flagelina (mutante al que denominamos *Bbfla*<sup>-</sup>), o en la expresión de BvgR (mutante al que denominamos *BbBvgR*<sup>-</sup>).

El fragmento interno a la región codificante de cada uno de los genes a interrumpir se obtuvo por PCR empleando secuencias oligonucleotídicas (cebadores o primers) diseñadas por nosotros en base a la secuencia del gen de interés previamente reportada (Tabla II.2). En todos los casos los ensayos de PCR fueron realizados empleando un ciclador térmico capilar Idaho 1605 (Idaho Technology). La composición de las mezclas de reacción utilizadas fue: 50 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 µg ml<sup>-1</sup> albúmina bovina (BSA); 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTPS; 2 U Taq DNA polimerasa (Promega Corp.) y 10 µM de cada uno de los cebadores (*primers*) para PCR específicas. Los cebadores fueron sintetizados por DNAgency (Malvern, PA, USA). La mezcla de reacción fue sometida durante 15 segundos a 94°C, 35 ciclos (15 segundos a 94°C, 10 segundos a 53°C y 15 segundos a 72°C) y por último 30 segundos a 72°C para permitir la finalización de todas las cadenas de ADN amplificadas. Finalizada la

reacción de PCR, 10  $\mu$ l del producto fueron sembrados en un gel de agarosa 1,5% p/v conteniendo 0,5-1,0  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de bromuro de etidio. El perfil de bandas obtenido fue fotografiado como se describió más arriba usando una cámara digital Kodak modelo DC 290 bajo iluminación ultravioleta.

Los ADN moldes para la amplificación por PCR fueron obtenidos mediante lisis de bacterias por calor o por extracción fenólica (ver sección 2.2 de este capítulo, pág. 51). Para realizar la lisis por calor, las células provenientes de cultivos líquidos o sólidos ( $10^8$ - $10^9$  UFC) fueron lavadas con NaCl 1 M y resuspendidas en 100  $\mu$ l agua bidestilada estéril libre de ADNasas. La suspensión así obtenida fue hervida por cinco minutos y centrifugada a 22.000 X g durante 4 minutos. Los sobrenadantes que se obtuvieron fueron usados como ADN molde para la reacción de PCR.

Una vez obtenido el producto de amplificación del tamaño esperado según los primers utilizados, el mismo se clonó en el vector pGemT-Easy (Promega) y se transfirió por electroporación a la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ . Una vez confirmada la presencia de un inserto del tamaño esperado por análisis con enzimas de restricción y por secuenciamiento, el fragmento fue subclonado al plásmido suicida en *Bordetella*, pK18mob. Luego las construcciones fueron transferidas a *E. coli* S17-1 y desde allí por conjugación a cepas de *Bordetella*.

Las conjugaciones fueron realizadas empleando la técnica de Simon y colaboradores (1983) (395) con modificaciones menores según se indica a continuación. En un microtubo de polipropileno se mezclaron iguales volúmenes de un cultivo de la cepa donadora *E. coli* S17-1 ( $DO_{650\text{ nm}} = 0,4-0,5$ ) conteniendo el plásmido pK18mob y de un cultivo de igual densidad óptica de la cepa receptora *Bb9.73*. La mezcla fue centrifugada a 700 x g durante 8 min. y el sedimento resuspendido suavemente en aproximadamente 50  $\mu$ l de medio líquido SS. La suspensión se colocó en una caja de Petri conteniendo el medio SSs sin antibióticos. Luego de una incubación a 37°C durante toda la noche, se resuspendieron la bacterias en medio líquido SS y se plaquearon en medio SSs suplementado con estreptomycinina (200  $\mu$ gml<sup>-1</sup>) y kanamicina sulfato (80  $\mu$ gml<sup>-1</sup>). En forma paralela se realizaron controles en los que sólo se agregó la bacteria donadora o la receptora. Los transconjugantes resistentes a ambos antibióticos ser evaluaron por las características fenotípicas detalladas en la Tabla II.2.

Tabla II.2. Secuencias oligonucleotídicas, vectores y estrategia de selección utilizados en la construcción de mutantes de *B. bronchiseptica*.

Mutante construido.	Primers utilizados para amplificar la región interna del gen codificante a mutar.	Vector suicida.	Selección del mutante.
Mutante defectivo en la expresión de <i>BvgA</i> ( <i>BbBvgA</i> <sup>-</sup> )	<i>bvgA</i> <sub>f</sub> 5' - gacgatcacctgtactgagat - 3'	pK18mob Km <sup>r</sup>	Km <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Ausencia de actividad hemolítica en cultivo virulento.
	<i>bvgA</i> <sub>r</sub> 5' - gaactgaccgtcctacaactg-3'		
Mutante defectivo en la expresión de <i>flaA</i> ( <i>Bbfla</i> <sup>-</sup> )	<i>flaA</i> <sub>f</sub> 5' - aggccatcgccaaccgcttc -3'	pK18mob Km <sup>r</sup>	Km <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Ausencia de movilidad en fase avirulenta.
	<i>flaA</i> <sub>r</sub> 5' - cgtgaccttcgacgcccgc -3'		
Mutante defectivo en la expresión de <i>BvgR</i> ( <i>BbBvgR</i> <sup>-</sup> )	<i>bvgR</i> <sub>f</sub> 5' - tccagattccagcccgt -3'	pK18mob Km <sup>r</sup>	Km <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Movilidad en fase virulenta
	<i>bvgR</i> <sub>r</sub> 5' - acatgagttctggcatcagg -3'		

## 5. Análisis génico de las construcciones realizadas

Para analizar las estructuras génicas obtenidas luego de la mutagénesis se empleó la técnica de Southern blot (373). Para ello se procedió a la obtención de ADN de los transconjugantes y de la cepa parental *Bb9.73*. Cada una de estas preparaciones se trató con la endonucleasa de restricción *EcoRI* en el caso de los mutantes *BbBvgA*<sup>-</sup> y *BbBvgR*<sup>-</sup> o *EcoRV* para *Bbfla*<sup>-</sup>, y luego de la incubación con dicha enzima los productos obtenidos se separaron por electroforesis en gel de agarosa-TBE al 0.8 % p/v a 1-2 volt/cm. Una vez finalizada la corrida se visualizó el ADN por tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz UV y a continuación, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa o nylon (Nylon N -Hybond) mediante el método alcalino descrito por Chomczynski (74). Este método consiste en primer lugar en una incubación del gel de agarosa en una solución de desnaturalización (NaOH 0,4 M y NaCl 3,0 M) durante 1 hora. Luego el gel se lavó durante 15 minutos con la solución de transferencia (8 mM de NaOH y 3,0 M de NaCl , pH 11,4) y se colocó entre papeles absorbentes y sobre la membrana Hybond formando un puente de papel por el que circuló la solución de transferencia por capilaridad durante una hora. Transcurrido ese lapso de tiempo, la membrana se neutralizó con tampón fosfato a pH 6,8 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M) por 10 minutos para provocar la renaturalización del ADN. Se secó la membrana a 80° C y finalmente se fijó el ADN mediante exposición a luz UV de  $\lambda = 260$  nm durante 10 minutos.

La membrana se prehibridó con una solución conteniendo ADN de esperma de salmón (NaCl 0,75 M, Citrato de Sodio 0,075 M, Sarcosyl 0,1% p/v, Sodio dodecil sulfato (SDS) 0,02% p/v y Bloqueante 1% p/v pH 7,0) durante 1 hora a 58°C. Posteriormente se procedió a la hibridación con una sonda marcada con digoxigenina (DIG) a 58°C suspendida en buffer de prehibridación durante toda la noche. Estas sondas fueron preparadas por PCR con digoxigenina-11-dUTP en las concentraciones indicadas en el producto DIG Nucleic Acid Kit de Boehringer Mannheim empleando las mismas condiciones de amplificación que las antes descritas. Luego de la hibridación, la membrana se lavó de la siguiente manera: dos lavados con 2 X SSC-SDS 0.1% p/v

a temperatura ambiente y dos lavados con 0,1 X SSC-SDS 0,1% p/v a 60 °C. Luego se incubó la membrana en una solución bloqueante conteniendo 1% p/v en Tris-HCl 100 mM NaCl 150 mM pH 7,5 durante 1 hora a 30° C. Transcurrido este tiempo se retiró la solución y se agregó el anticuerpo específico para digoxigenina marcado con fosfatasa alcalina (dilución de 1/1000 en la solución anterior). La membrana en estas condiciones se incubó durante al menos 1 hora a 30°C. Se retiró el exceso de anticuerpo mediante dos lavados de 15 minutos cada uno con Tris-HCl 100 mM NaCl 150 mM pH 7,5, para luego equilibrar la membrana durante 3 minutos con Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM pH 9,5. Se agregó los sustratos de fosfatasa alcalina 9 µl NBT, 7µl BCIP (GIBCO BRL) en 2 ml de Tris-HCl 100 mM NaCl 100 mM MgCl<sub>2</sub> 50 mM pH 9,5 de manera de lograr el desarrollo de color. La reacción de coloración fue detenida con agua destilada en el momento adecuado.

## **6. Complementación de los fenotipos alterados en los mutantes defectivos de *B. bronchiseptica* mediante el empleo de una biblioteca genómica construida en vectores movilizables y replicativos en *Bordetella***

Primeramente se procedió a la obtención de ADN de la cepa *Bb9.73* mediante la técnica descrita en la sección 2 de este capítulo. El ADN así obtenido se digirió con las enzimas de restricción *SpeI* y *SacI* de manera de obtener tamaños de ADN de alrededor de 5 Kpb. El plásmido pHC60 movilizable (71) y replicativo en *Bordetella* también se digirió con las mismas enzimas. Una vez digeridos ambos ADN, los mismos se ligaron y el producto de ligación se electroporó en *E. coli* S17-1. Las bacterias transformadas se sembraron en medio LB sólido con kanamicina y tetraciclina. A partir de las colonias Km<sup>r</sup>-TC<sup>r</sup> se aislaron plásmidos los cuales fueron evaluados por digestión con *SpeI* y *SacI* para determinar el tamaño promedio de los insertos presentes. La biblioteca así obtenida se transfirió en masa a cada uno de los mutantes por conjugación biparental. Los transconjugantes fueron evaluados de acuerdo a la resistencia a antibióticos y a su capacidad de expresar un marcador de virulencia para el mutante defectivo en *BvgA* y flagelina para el mutante defectivo en flagelina. Aquellos transconjugantes TC<sup>r</sup> y que restauraron el fenotipo antes alterado fueron seleccionados. A partir de los mismos se extrajo el plásmido y sobre este verificó la presencia de los genes *bvgA* y *flaA* mediante ensayos de PCR. Una vez confirmado, el plásmido fue introducido nuevamente en las cepas defectivas para verificar que el inserto era capaz de complementar el fenotipo rugoso profundo.

## **7. Caracterización fenotípica de los mutantes obtenidos**

**7.1. Funcionalidad del sistema *BvgAS*.** Con el fin de determinar si el sistema de dos componentes *BvgAS* se encontraba o no alterado en su sensibilidad a los moduladores conocidos *in vitro*, se procedió a analizar la expresión de algunos factores regulados por este sistema en presencia y ausencia de agentes moduladores. Los diferentes mutantes, junto a la cepa parental, fueron cultivados en presencia de iones sulfato o crecimiento a temperaturas menores de 22° C. Una vez cultivados en

estas condiciones, se analizó su actividad hemolítica (marcador de virulencia) en cajas SSs y si presentaban movilidad (marcador de avirulencia) en agar blando. En ocasiones se determinó a su vez por western blot la presencia o ausencia de alguno de los marcadores de virulencia y avirulencia más conocidos.

## 7.2. Expresión de factores de virulencia.

Análisis de la expresión del marcador de virulencia AC-Hly. La expresión de este marcador se analizó mediante la observación de actividad hemolítica alrededor de las colonias cultivadas a 37° C durante 48 hs en medios sólidos conteniendo sangre (SSs o BG indistintamente),

Análisis de la expresión de marcadores de virulencia mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y ensayos de inmunoblot. Las preparaciones de proteínas totales preparadas a partir de lisis bacterianas ( $DO_{650nm} = 6,0$ ) con buffer de Laemmli (233), se sometieron a corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida, con SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol. Los geles de poliacrilamida se prepararon siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (233). En todos los casos el gel de apilamiento o stacking se preparó en una concentración de 4 % de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1) en buffer Tris-HCl a pH 6,8 y SDS  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ , mientras que el gel de separación se preparó en una concentración de 10 a 12,5 % de poliacrilamida según se indica en las leyendas de las figuras (acrilamida:bisacrilamida 29:1) con Tris-HCl a pH 8,8 y SDS  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ . La composición de las distintas soluciones utilizadas para la preparación de los geles son las mismas que las utilizadas para el LPS.

Las corridas se llevaron a cabo durante 60 a 90 minutos en equipos Miniprotean II (BioRad) a 100-120 volts utilizando buffer de corrida (Glicina 0,37 M, Tris-HCl 0,05 M pH 7,2). Una vez finalizada la corrida, los geles se fijaron en metanol:acético:agua (volúmenes 50:10:40) y se tiñeron con Coomasie Blue y/o con plata.

Inmunoensayos de proteínas (western blot). Los anticuerpos utilizados en estos ensayos se detallan en la Tabla II.3.

Tabla II.3. Sueros policlonales utilizados.

Anticuerpo	Características principales	Referencia
anti-PRN	Policlonal de cobayo específico para pertactina.	Instituto Pasteur. Francia
anti-FHA	Policlonal de ratón específico para hemaglutinina filamentosa	Instituto Pasteur. Francia
anti-AC-Hly	Policlonal de ratón específico para adenilato ciclasa-hemolisina	EstaTesis
anti-flagelina	Policlonal de ratón específico para flagelina	EstaTesis
anti-flagelina	Monoclonal de ratón específico para flagelina	116,117
a-IgG ratón Fosfatasa Alcalina	Policlonal enn cabra específico para IgG de ratón (H+L), conjugado con fosfatas alcalina.	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.

Las muestras de proteínas ya sometidas a SDS-PAGE fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinildieno (PVDF) (Immobilon™, Millipore) mediante

el equipo Mini Trans-Blot transfer Cell (BioRad) según las indicaciones del fabricante. En primer instancia se armó el dispositivo de transferencia con el gel a transferir y la membrana previamente tratada con buffer de transferencia (Glicina 1,0 M, Metanol 20% v/v y Tris - HCl 0,025 M). Una vez armado, se le aplicó sobre el mismo una diferencia de potencial de 100 volts durante 1 hora en baño de agua-hielo. Transcurrido dicho tiempo en el caso de una muestra de proteínas, se verificó la correcta transferencia mediante una tinción con Rojo Ponceau S (0,1 % p/v Rojo Ponceau en ácido acético 1% v/v). Para continuar, se procedió al bloqueo de la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con 5% p/v de leche en polvo descremada (San Regim<sup>®</sup>) en TBS (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M). Posteriormente se reemplazó la solución de bloqueo por una solución al 5% p/v de leche descremada en TBS (TBS - leche) conteniendo el anticuerpo a utilizar. La membrana se incubó con dicha solución durante toda la noche a 4° C y con agitación suave. Se retiró la solución del anticuerpo y se realizaron seis lavados con Tween 80 0,05% v/v en TBS - leche. Se adicionó el segundo anticuerpo policlonal en cabra específico para IgG de ratón (H+L), conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) disuelto en TBS - leche y se incubó con agitación lenta durante 2,5 horas a temperatura ambiente. Se retiró la solución del segundo anticuerpo y se realizaron tres lavados con TBS - leche y un lavado final con buffer para fosfatasa alcalina (PA) (50 mM NaCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl pH 9,5). En el momento del revelado se prepara una solución que contiene el sustrato de la fosfatasa alcalina consistente en 44 µl de NBT y 33 µl de BCIP en 10 ml de PA. Se deja en dicha solución hasta desarrollo de color, momento en que se detiene la reacción con agua destilada.

#### **7.4. Expresión de factores de avirulencia.**

Ensayos de movilidad. La presencia de movilidad fue evaluada sembrando de manera puntual una suspensión de la bacteria en medio SS suplementado con agar 0,35% p/v. Transcurridas 18 horas se observó la movilidad como una opalescencia leve alrededor del punto de siembra. La temperatura de incubación fue de 22° C o 37° C según se indica en cada caso.

Análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) e inmunoensayos de proteínas (*western blot*). Los pasos seguidos con el fin de realizar este análisis fueron los descritos anteriormente para el análisis de la expresión de los factores de virulencia, utilizando suero anti flagelina (Tabla II.3).

Micrografía electrónica del flagelo, un marcador de avirulencia. Las células cultivadas en medio SSs o BG en presencia o ausencia de MgSO<sub>4</sub> 40 mM como modulador de fase se resuspendieron en PBS y se transfirieron a una grilla cubierta con una película colodión a la cual se le había depositado previamente carbón por evaporación al vacío. Luego de 30 segundos el exceso de líquido fue retirado con papel de filtro y la preparación se tiñó durante 20 segundos con solución de ácido fosfotúngstico pH 5,2 (KOH) 2% p/v. El examen microscópico se realizó en un microscopio JEM 1200 EX Jeol en el Servicio Central de Micrografía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

Análisis de la expresión de proteínas de membrana externa. Para la obtención de proteínas de membrana externa se empleó el método descrito por Schnaitman (1971) (388) que se basa en la diferencia de solubilidades en detergente de éstas respecto a las de la membrana citoplasmática. Brevemente, las células provenientes de 10 ml de cultivo se concentraron por centrifugación, se lavaron y resuspendieron en HEPES 10 mM (N-2-hidroximetilpirazina-N-2-ácido etansulfónico) pH 7,4. Después de una sonicación refrigerada de 2 minutos las células enteras se removieron por centrifugación a 3.000 X g 10 minutos a 4° C. La cubierta de las células se sedimentaron a partir del sobrenadante anterior por centrifugación (20.000 X g 60 min. 4° C). El sedimento se resuspendió en HEPES 10 mM conteniendo 2% v/v Tritón X-100 y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El material insoluble se sedimentó por centrifugación (20.000 X g 60 min. 4° C) y se repitió la extracción con Tritón X-100 en HEPES 10 mM. El sedimento final es resuspendido en 40 µl de agua y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford utilizando como patrón seroalbúmina bovina (54). Las proteínas así obtenidas luego se analizaron mediante corridas electroforéticas como se ha descrito en el punto 6.2 de este capítulo.

#### **8. Obtención de las proteínas secretadas en los sobrenadantes de cultivo.**

Se realizaron cultivos de la cepa parental y del mutante *Bbfla*<sup>-</sup> en fase virulenta y en fase avirulenta. Luego de 16 horas de cultivo, se procedió a la obtención de sobrenadante de mediante centrifugación a 10.000 X g durante 20 minutos. El paso de centrifugación se repitió hasta no observar bacterias. El sobrenadante así obtenido fue filtrado con doble filtro de policarbonato con poros de 0,22 µm de diámetro (Nuclepore® Corporation). El filtrado se colocó en bolsas de diálisis (tamaño de corte 12,5 kDa) y se dializó contra agua desionizada a 4° C. El dializado obtenido se concentró por liofilización. Las muestras así obtenidas se resuspendieron en buffer de Laemmli 1X conteniendo 2-mercaptoetanol. Estas muestras fueron sembradas en un SDS-PAGE tal como se describió más arriba.

#### **9. Identificación de proteínas por huella peptídica.**

Para la identificación de proteínas secretadas diferenciales entre la cepa parental y el mutante defectivo se realizaron corridas electroforéticas de las muestras de sobrenadantes anteriormente obtenidas en geles realizados en equipos que permiten una mayor separación entre los polipéptidos debido a su mayor longitud. Para ello se utilizó el equipo Protean II (Bio – Rad) y la técnica de tinción con plata compatible con espectrometría de masas (392). Se seleccionaron algunos polipéptidos diferenciales entre las muestras analizadas y se enviaron al departamento de Microbiología II, Centro de Genómica y Proteómica de la Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España para ser analizados. Allí las muestras fueron digeridas con tripsina y analizadas mediante espectroscopia de masas tipo MALDI-TOF. Los

espectros obtenidos fueron sometidos a análisis bioinformáticos, comparándolos con las secuencias publicadas en Swiss-Pro.

### **10. Curvas de crecimiento en medios líquidos de la cepa parental *Bb 9.73* y los diferentes mutantes defectivos.**

Las curvas de crecimiento se realizaron en el medio líquido de SS a 160 rpm y 37°C. En todos los casos ensayados el inóculo se realizó a partir de un cultivo en medio SSs el cual fue resuspendido para obtener una D.O.<sub>650nm</sub> inicial de 0,2. La cinética de crecimiento se siguió a través de lecturas de absorbancia a 650 nm y unidades formadoras de colonias (UFC). Para la determinación de UFC se sembraron diluciones adecuadas en medio SSs con los antibióticos correspondientes, las cuales se incubaron durante 48 hrs. a 37°C. Transcurrido dicho tiempo se procedió al recuento de colonias.

### **11. Ensayos de supervivencia en medio líquido de la cepa parental *Bb 9.73* y de los mutantes defectivos.**

Estos ensayos se realizaron tanto en medios sintéticos como en condiciones de escasez de nutrientes como se detalla a continuación.

En medios sintéticos. El análisis de la supervivencia en medio líquido fue evaluada en medio SS en frascos erlenmeyers con una relación de volumen de medio : volumen del frasco de 1:4, con agitación a 160 rpm a 37°C. Las bacterias cultivadas previamente en placas de SSs o BG durante 24 hrs. a 37°C fueron resuspendidas en el medio de cultivo de manera de obtener la densidad óptica inicial correspondiente a las UFC/ml que se indica en cada caso.

En condiciones de escasez de nutrientes. El cultivo con limitación de nutrientes fue realizado en frascos erlenmeyers con buffer fosfato (PBS) como único medio de crecimiento en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Para ambos casos a distintos tiempos post inoculación se analizó el número de bacterias viables por mililitro y el estado de virulencia de las bacteria de la siguiente manera:

Recuento de Unidades formadoras de colonias. Al inicio del cultivo y en los tiempos posteriores indicados en las figuras correspondientes se tomaron alícuotas de los cultivos y se sembraron en medio SSs diluciones adecuadas. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 48 horas y las colonias fueron contadas y discriminadas según la fase en que se encontraban en la placa. Para este último análisis se tuvo en cuenta la morfología de las colonias. Estas fueron clasificadas como colonias en fase virulenta cuando las mismas eran pequeñas, de forma circular bien definida y presentaban halo de hemólisis claro a su alrededor indicando la presencia de actividad hemolítica. Las colonias en fase avirulenta por el contrario eran de mayor tamaño y mucosas y además no presentaban halo de hemólisis. Las colonias que se encontraban en fase intermedia presentaban un halo de hemólisis menor que el

observado en las bacterias en fase virulenta, y una morfología de colonias planas y chatas, similares a la morfología de las colonias en fase avirulenta.

Para corroborar que la fase de virulencia observada en placa se correspondía a la presente en el medio líquido se realizaron dos cultivos de *Bb9.73*, uno en fase virulenta y otro en fase avirulenta. Transcurridas 24 horas se tomó de ambos cultivos una muestra para determinar el número de UFC tal como se describió anteriormente. El resto del cultivo fue centrifugado a 10.000 X g durante 10 minutos. Las bacterias fueron resuspendidas en buffer de Laemmli 1X, sometidas a ebullición durante 15 minutos y sonicadas durante otros 15 minutos. Estas muestras fueron sembradas en un SDS-PAGE y luego el gel fue transferido a membranas de PDVF para evaluar la presencia de los diferentes marcadores de virulencia. La técnica empleada fue descrita más arriba.

Análisis del factor inductor de fase presente en el sobrenadante de los cultivos. Se obtuvieron sobrenadantes libres de bacterias provenientes de cultivos en los que el cambio hacia la fase virulenta a partir de un cultivo en fase avirulenta había comenzado a tener lugar. El cultivo de bacterias en medio líquido de *Bb9.73* fue centrifugado a 10.000 X g durante 20 minutos con el fin de obtener el sobrenadante de cultivo libre de células. Esta operación se repitió hasta no observar pellet. El sobrenadante así obtenido fue filtrado en esterilidad con doble filtro de policarbonato con poros de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro (Nuclepore® Corporation). Las muestras fueron divididas en tres alícuotas diferentes. Una de ellas se reservó como control, otra fue sometida a un tratamiento proteolítico (pronasa 5 mg/ml a 37°C durante 30 minutos) y la restante se ultrafiltró con una membrana de corte de 30 kDa (Millipore). En este último caso se utilizó el filtrado. Las alícuotas fueron inoculadas con una suspensión *Bb9.73* en fase avirulenta y se incubaron en condiciones de virulencia (160 rpm, 37°C). En el momento inicial y en tiempos posteriores se tomaron alícuotas de cada frasco en las que se determinó el número de UFC y la fase de las colonias derivadas de ellas, tal como se ha descrito anteriormente (pág. 59).

## **12. Ensayos de adhesión e invasión a células epiteliales de la cepa parental *Bb 9.73* y los mutantes defectivos.**

Para la realización de estos ensayos se utilizaron células derivadas de epitelio pulmonar humano A549 (ATCC CCL185) y las cepas de *B. bronchiseptica* cultivadas previamente en medio líquido.

Las células de línea se cultivaron en el medio Eagle modificado por Dulbecco (Laboratorios Gibco) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% p/v, estreptomycin (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) y ampicilina (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) hasta obtener un 70-80% de confluencia. Se sembraron placas de cultivo Nunclon Delta (Nunc, Roskilde, Denmark) de 24 lugares (well) con aproximadamente  $8 \cdot 10^4$  células por well 18 horas antes de cada ensayo. Para los ensayos de adhesión las células fueron sembradas sobre soportes de vidrio previamente dispuestos en los wells.

Los distintos mutantes ensayados y la cepa parental de *B. bronchiseptica* se cultivaron durante 12 horas a 37° C en frascos erlenmeyers agitados (160 rpm) conteniendo medio SS. Se suspendieron en el medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con SFB 10% p/v sin antibióticos hasta obtener una suspensión equivalente a  $DO_{650nm} = 0,003$ .

Se agregaron a cada well 8.  $10^6$  bacterias (proporción bacteria:células de 100:1) y se centrifugaron a 300 X g durante 5 minutos. Se incubaron 2 horas a 37° C y CO<sub>2</sub> 5% y las monocapas celulares fueron lavadas al menos cinco veces con PBS estéril.

i) Determinación del número de bacterias adheridas. Las células A549 crecidas sobre los vidrios fueron fijadas con metanol. Las mismas se tiñeron con cristal violeta (0,07 % p/v en agua) para ser cuantificadas mediante la observación en microscopio con contraste de fase con aumento 1.000 X. El número de bacterias adheridas por célula se determinó examinando al menos 50 células epiteliales según la técnica descrita por van den Berg y colaboradores (1999) (438).

ii) Determinación de la supervivencia intracelular. Luego de la incubación de 2 horas de duración y de los lavados descritos anteriormente, las células eucariotas distribuidas en monocapa fueron incubadas 3 horas a 37° C, CO<sub>2</sub> 5% para permitir la invasión bacteriana a las células. El medio fue entonces reemplazado por 0,5 ml de medio suplementado con polimixina B 300  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y Gentamicina 300  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y se incubaron durante 1 hora a 37° C, CO<sub>2</sub> 5% con el fin de eliminar las bacterias que no invadieron y se encontraban fuera de las células eucariotas. Luego de la incubación, la solución de antibióticos fue eliminada por lavados repetidos y reemplazada por medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con SFB 10% p/v, estreptomycin (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) y ampicilina (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Las células que presentaban bacterias intracelulares se recuperaron tratando las monocapas con tripsina. El número de bacterias presentes se determinó mediante la siembra en SSs de las diluciones adecuadas. Con el fin de evaluar el número de células eucariotas viables, las mismas se tiñeron con el colorante vital Azul de Tripán. De esta manera se pudo calcular el número de UFC / célula eucariota.

Todos los experimentos que se han detallado fueron realizados al menos tres veces por duplicado. Los promedios y desviaciones estándar fueron calculados a partir de los  $\log_{10}$  UFC. Las diferencias entre los promedios fueron evaluados por un test de Student de dos colas con un grado de significación de  $P < 0,05$ .

### **13. Ensayos de infección de la cepa parental *Bb* 9.73 y los mutantes defectivos empleando el modelo de infección intranasal en ratones**

**13.1. Determinación de la dosis letal cincuenta (DL<sub>50</sub>).** La determinación de este parámetro se realizó inoculando 5 grupos de 8 ratones BALB/c cada uno con cada cepa de *B. bronchiseptica* a ensayar. Cada ratón de cada grupo fue inoculado con una suspensión bacteriana conteniendo aproximadamente  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  y  $10^4$  UFC/50  $\mu\text{l}$ . A los distintos días post - inoculación se determinó el número de decesos en cada grupo y con estos datos se determinó la DL<sub>50</sub>.

**13.2. Cinética de colonización en pulmones murinos** La cinética de colonización de las diferentes cepas de *B. bronchiseptica* fue evaluada empleando el modelo de infección intranasal murino. Para ello se emplearon ratones BALB/c hembras de 3 a 4 semanas de edad libres de patógenos provistos por el bioterio de la Facultad de Veterinaria de la UNLP. Para realizar las inoculaciones, los animales se anestesiaron por inhalación de éter. Como inóculo para cada ratón se empleó 50  $\mu$ l de la suspensión bacteriana a ensayar ( $5 \cdot 10^5$  UFC en PBS estéril, dosis subletal) proveniente de un cultivo líquido en fase logarítmica (Medio SS, 12 horas, 160 rpm, 37°C). El número de UFC a inocular se aproximó a través de medidas de absorbancia a 650 nm (1 unidad de  $Abs_{650nm} = 3 \cdot 10^9$  UFC  $ml^{-1}$ ).

Con el fin de determinar el número de bacterias que colonizaron los pulmones del animal, transcurridas 4 horas desde el momento de la inoculación y en distintos días, se sacrificaron por dislocación tres animales, a los cuales se les extrajo a través de técnicas quirúrgicas ambos pulmones. Éstos se homogenizaron en 1,5 ml de PBS estéril con un homogeneizador con punta redonda de teflon de 0,966 pulgadas de diámetro (Cole Parmer) y a partir del homogenado se realizaron diluciones adecuadas para realizar el recuento de colonias en placas conteniendo SSs con los antibióticos adecuados según la cepa ensayada. Para el recuento de UFC las placas sembradas se incubaron a 37° C durante 48-72 horas.

Los animales utilizados fueron mantenidos en jaulas acondicionadas con viruta de madera esterilizada, la cual fue cambiada periódicamente y fueron alimentados con alimento balanceado esterilizado (Extrudado balanceado de Agrupación Cooperativas Argentinas).

En todos los ensayos realizados los promedios y desviaciones estándar fueron calculados a partir de los  $\log_{10}$  UFC. Las diferencias entre los promedios fueron evaluadas por un test de Student de dos colas con un grado de significación de  $P < 0,05$ .

**13.3. Detección de bacterias en los pulmones murinos mediante PCR.** En los ensayos de cinética de colonización de pulmones murinos, se realizó la detección de bacterias en los mismos a distintos días post – inoculación. A partir del momento en que ya no era posible recuperar bacterias viables de los pulmones de los ratones, el análisis de la presencia de *Bordetella* en el hospedador se realizó mediante ensayos de PCR. Para ello, a los pulmones extraídos de los ratones en días donde no se aislaron colonias se los homogeneizó y se los trató a 65°C durante una hora con una solución de pronasa (0,4 mg/ml en buffer Tris -HCl 12 mM pH: 7,6). Luego de inactivar a la pronasa con calor durante 10 minutos se procedió a realizar sobre esta muestra una PCR, utilizando los primers específicos *flaA<sub>r</sub>* y *flaA<sub>r</sub>*, siguiendo el protocolo más arriba detallado (pág. 55).

#### **14. Análisis estadístico.**

Los resultados de los ensayos fueron analizados evaluando los promedios y las desviaciones estándar mediante tests de Student de dos colas con un grado de significación de  $P < 0,05$ .

**Supervivencia de *Bordetella  
bronchiseptica* fuera del  
hospedador: rol de la fase  
avirulenta y de algunos de  
sus marcadores**

**Capítulo III**

## Introducción

*Bordetella bronchiseptica* es un patógeno muy versátil capaz de vivir en el medio ambiente y de colonizar a una amplia variedad de mamíferos, incluyendo al hombre (147,160,269,461). En dichos hospedadores puede inducir incluso un período de cronicidad enfrentándose nuevamente a un entorno que resulta diferente respecto al del período agudo (160,161,250,254,389,442,461). Para poder sobrevivir en esta amplia variedad de entornos, estas bacterias, al igual que todas las células, deben ser capaces de sensor y responder a diferentes señales que la bacteria encuentra en dichos entornos. De hecho, ya desde 1910 se ha describió que *B. pertussis* es capaz de expresar diferentes componentes dependiendo de las condiciones de cultivo (122,364,366,449). Estos estudios se fueron intensificando con el correr de los años y hoy se han extendido a otras de las especies del género, entre ellas *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*. Así, Lacey en 1960 demostró que estos microorganismos son capaces de alternar entre distintas fases fenotípicas en respuesta a cambios en la temperatura o debido a la presencia en los medios de cultivo de ciertos iones o compuestos (228). Posteriores análisis moleculares permitieron identificar al locus *bvg* como el responsable de controlar, en respuesta a señales del entorno, la expresión de los diferentes componentes bacterianos que caracterizan a cada fase fenotípica (449). Como hemos descrito en la introducción de este trabajo de Tesis (Pág. 37), este locus codifica para las proteínas BvgS y BvgA que constituyen un sistema de transducción de señales de dos componentes. La proteína BvgS es un sensor transmembrana, que en respuesta a señales externas transfiere un grupo fosfato, a través de una cascada de fosforilación, al transductor de señales citoplasmático BvgA. De esta manera la proteína BvgA fosforilada activa o reprime la expresión de diferentes genes, dando lugar a dos fases fenotípicas diferentes, la fase virulenta y la fase avirulenta. La fase virulenta se caracteriza por expresar adhesinas y toxinas (genes *vag*) que le permiten a la bacteria establecer una infección en un hospedador susceptible y por mantener reprimidos a genes que codifican los factores de avirulencia (genes *vrg*). En la fase avirulenta los genes *vag* dejan de expresarse y se expresan los genes *vrg* que codifican para factores de avirulencia tales como la síntesis del flagelo, la enzima ureasa, en algunas cepas los sideróforos alcalígenos y varias enzimas que participan en el metabolismo bacteriano (6,7,17,276,391).

Si bien se conocen algunas señales a las que el sistema BvgAS responde en condiciones de laboratorio, en el ciclo infeccioso de *Bordetella* sólo se ha propuesto un modelo del rol de BvgAS con ciertas evidencias que lo apoyan. Este modelo propone a la fase virulenta como necesaria y suficiente para lograr la colonización de la bacteria en el hospedador y a la fase avirulenta como la más adecuada para persistir en el hospedador o en condiciones de escasez de nutrientes (83,160). En concordancia con este modelo se ha reportado recientemente que en infecciones crónicas de *B. bronchiseptica* los aislamientos obtenidos al inicio de la infección producen las toxinas (129,170) y adhesinas (59,195) mientras que los aislamientos obtenidos en las fases

tardías dejan de expresar dichos factores (160). Por lo tanto, ha sido sugerido que la fase avirulenta podría participar en las etapas crónicas de la infección. Además en ensayos de invasión y persistencia *in vitro* en células fagocíticas se pudo observar que la fase avirulenta presenta una aumentada supervivencia intracelular, nicho propuesto para la persistencia del patógeno en el hospedador (25,381).

Por otra parte, *B. bronchiseptica* ha sido aislada de ambientes naturales de bajo contenido en nutrientes, como son los lagos (334) y suelos (295), lo que sugiere que el medio ambiente podría ser una fuente de transmisión de este patógeno. En estos ambientes naturales caracterizados por la escasez de nutrientes la fase avirulenta parece ser la variante más adaptada según lo reportado por Cotter y Miller (83) quienes observaron que la fase virulenta no sobrevive en condiciones de escasez como el cultivo en buffer fosfato (PBS), donde sí es posible recuperar bacterias viables en fase avirulenta. Cuando al medio de cultivo se lo suplementa con un agente modulador del sistema BvgAS como el sulfato de magnesio, se produce el cambio de fase virulenta hacia avirulenta en la cual el microorganismo sobrevive al menos 8 días (83). Cuando las concentraciones de los agentes moduladores son más bajas que las necesarias para el pasaje hacia la fase avirulenta, es posible observar un perfil antigénico diferente al de fase virulenta y avirulenta, con algunas características compartidas con ambas fases. A este fenotipo se lo ha denominado fase intermedia (99,101,326,415) Las bacterias en fase intermedia también sobreviven en condiciones de escasez de nutrientes.

Si bien en otro trabajo se reporta que *B. bronchiseptica* puede sobrevivir incluso hasta 6 meses en buffer fosfato (PBS), la hipótesis sobre la mayor adaptabilidad a dichas condiciones de la fase avirulenta cuenta con el apoyo de los resultados informados Cotter y Miller en 1994 (83). Dado que estas formas de supervivencia constituyen un importante reservorio para la distribución del patógeno, surge la necesidad de aclarar más acabadamente cómo es la sobrevivencia de *B. bronchiseptica*, cuál es el tamaño de la población que sobrevive y precisar en qué estado de virulencia sobreviven las bacterias.

Con el objetivo de analizar estos aspectos, decidimos realizar a escala de laboratorio cultivos en medios líquidos de *B. bronchiseptica* por largos períodos de tiempo, evaluando en forma simultánea a cada tiempo de cultivo el recuento de bacterias y la fase fenotípica de los microorganismos. Para estos ensayos utilizamos una cepa de referencia *B. bronchiseptica* CIP 9.73 (Colección del Instituto Pasteur) capaz de experimentar en forma reversible el cambio de fase y los siguientes mutantes defectivos obtenidos a partir de dicha cepa:

- 1- un mutante defectivo en su capacidad de cambiar de fase. Dado que la fase avirulenta era la propuesta como la más apta en la supervivencia decidimos construir un mutante defectivo en la expresión del gen *bvgA* de forma de obtener una bacteria que siempre se encontrara en fase avirulenta

- 2- defectivos en la expresión de un gen que sólo se transcribe en una única fase. En particular elegimos al gen que codifica para la flagelina que se expresa sólo en condiciones de avirulencia.

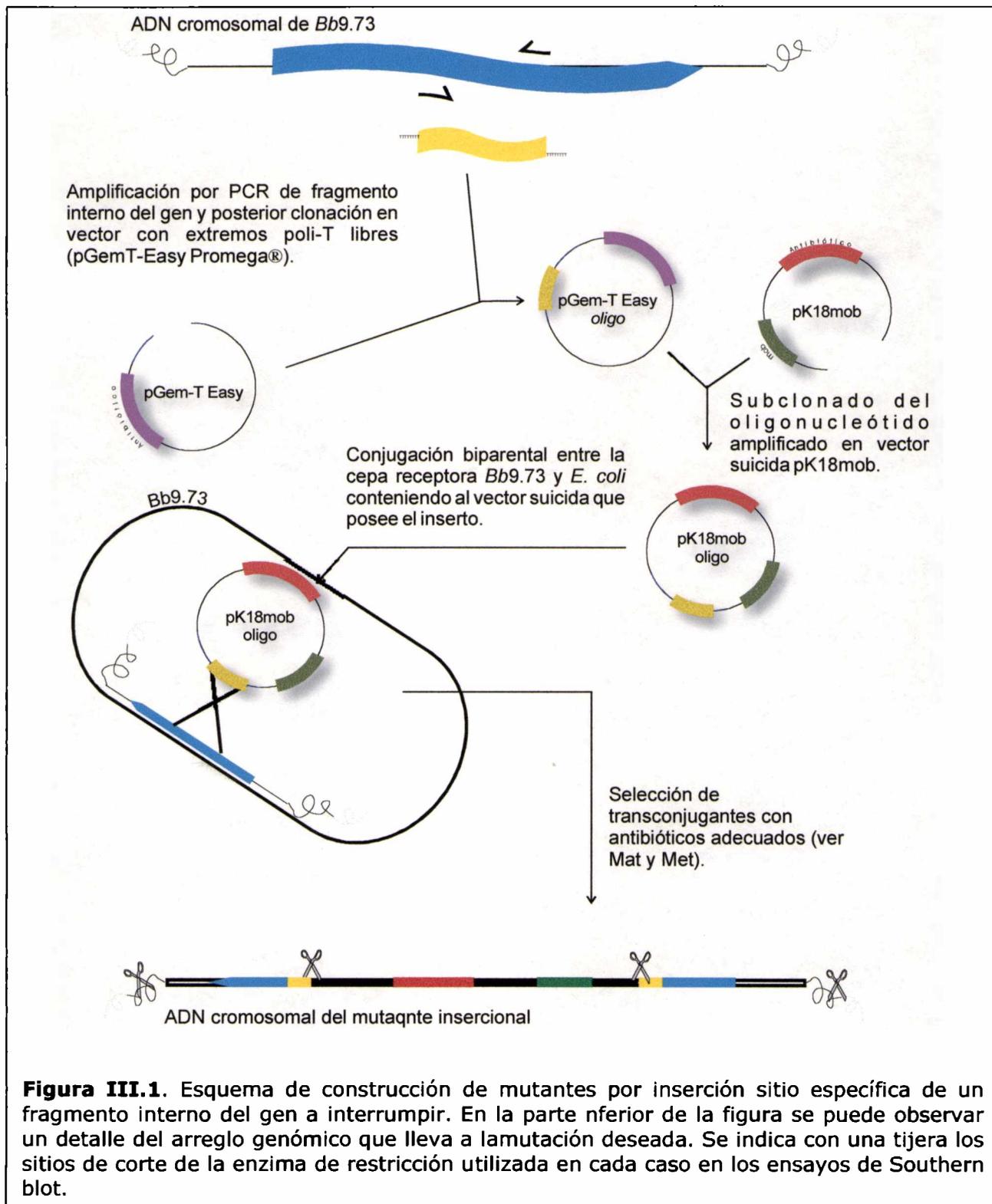
A continuación describiré primeramente la construcción de estos mutantes obtenidos por nosotros y luego los resultados obtenidos en los ensayos en medio líquido.

## Resultados

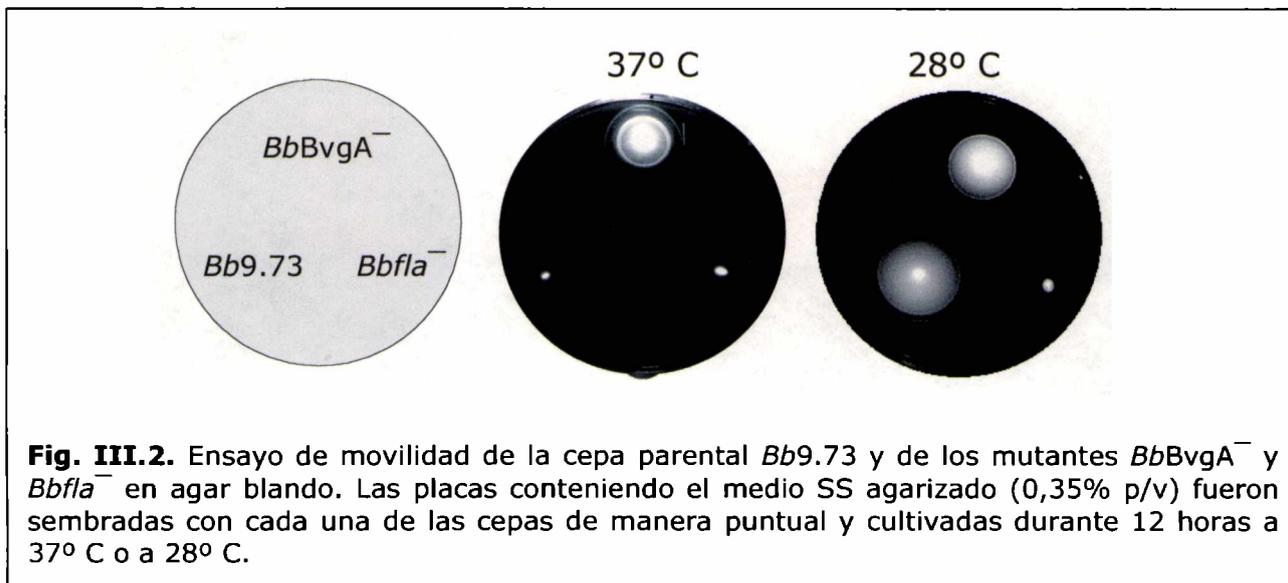
### Construcción de mutantes de *B. bronchiseptica* defectivos en la expresión del transductor de señales *bvgA* y del factor de avirulencia flagelina

**1- mutante defectivo en la expresión de *bvgA*.** Para obtener un mutante defectivo en la expresión de la proteína BvgA del sistema de dos componentes realizamos una mutagénesis insercional sitio específica por integración de un plásmido recombinante construido por nosotros (pk18mob:: *bvgA*, Km<sup>r</sup>). Para ello en base a la secuencia previamente reportada para el gen *bvgA* (21) (número de acceso al GenBank X58355), diseñamos oligonucleótidos que nos permitieran amplificar una región interna de la secuencia codificante del mismo gen en *B. bronchiseptica* CIP 9.73 (*Bb9.73*, Sm<sup>r</sup>). Mediante un ensayo de amplificación en cadena (PCR) se obtuvo un fragmento de ADN interno a la secuencia codificante del gen *bvgA* de *B. bronchiseptica* de 453 pares de bases (pb). Este fragmento fue clonado en un vector movilizable y no replicativo en *Bordetella* (pK18mob:: *bvgA* interno) el cual fue introducido desde la cepa donadora *E. coli* S17-1 a la receptora *Bb9.73* por conjugación. Los transconjugantes de *Bordetella* que habían integrado el plásmido por recombinación homóloga fueron seleccionados de acuerdo a su resistencia a antibióticos (Sm de la cepa receptora y Km codificado en el plásmido recombinante) (Fig. III.1).

Los transconjugantes Sm<sup>r</sup>Km<sup>r</sup> fueron analizados en la expresión de marcadores de virulencia en condiciones de cultivo en donde los mismos se deberían expresar. Se analizó en particular la presencia del marcador de virulencia adenilato ciclasa - hemolisina (AC-Hly) mediante la observación de halo de hemólisis en medio suplementado con sangre. Se seleccionaron así mutantes que en condiciones de expresión de la fase virulenta no presentaban halo de hemólisis. Además estos mutantes fueron evaluados por su capacidad de expresar el factor de avirulencia flagelina al cultivarlo en condiciones de virulencia mediante ensayos de movilidad en agar semisólido (Fig. III.2). Se seleccionó entonces un mutante Sm<sup>r</sup>Km<sup>r</sup> que se encontraba bloqueado en la fase avirulenta del microorganismo, presentándose como no hemolítico y móvil en condiciones de cultivo de fase virulenta al que se denominó *BbBvgA*<sup>-</sup>.

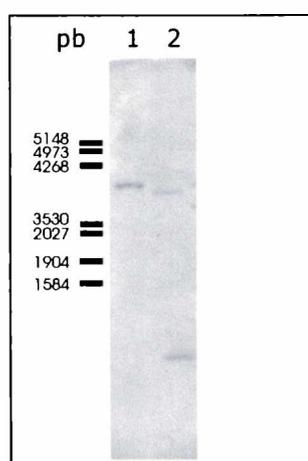


A fin de determinar si el evento de recombinación homóloga se produjo en un solo sitio del cromosoma de *B. bronchiseptica* y sobre el lugar pretendido, se realizó un Southern blot utilizando la técnica descrita por Chomczynski (1992) (74). Para ello el ADN de las cepas mutantes y de la parental fueron digeridos con *EcoRI*, enzima que fue utilizada para clonar el fragmento interno del gen *bvgA* en el plásmido pK18mob.



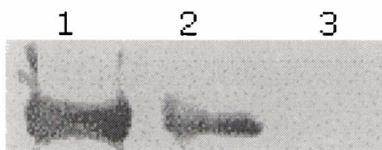
**Fig. III.2.** Ensayo de movilidad de la cepa parental *Bb9.73* y de los mutantes *BbBvgA<sup>-</sup>* y *Bbfla<sup>-</sup>* en agar blando. Las placas conteniendo el medio SS agarizado (0,35% p/v) fueron sembradas con cada una de las cepas de manera puntual y cultivadas durante 12 horas a 37° C o a 28° C.

Luego, las muestras digeridas fueron sometidas a una corrida electroforética y a una transferencia hacia una membrana de nitrocelulosa para ser revelada con una sonda marcada con digoxigenina (*bvgADIG*). Esta sonda que hibrida con la secuencia del gen *bvgA* fue preparada por PCR empleando nucleótidos marcados con digoxigenina. En la figura III.3 se muestran los resultados obtenidos, donde se puede observar que para uno de los clones analizados la sonda *bvgADIG* hibrida con dos fragmentos de ADN (2.8 Kpb y 0.5 Kpb). La suma de los tamaños de estos fragmentos es igual al tamaño correspondiente a la única banda observada en cepa parental (3.3 kb). Este resultado confirma que estamos frente a un única inserción de nuestro vector en el genoma y que el mismo se encuentra en el gen *bvgA*, tal como se deseaba. Este mutante al que denominamos *BbBvgA<sup>-</sup>*, fue repicado y conservado a -80° C tal como se describe en la sección materiales y métodos para ser utilizado en los diferentes ensayos que se detallan a lo largo de esta Tesis.



**Figura III.3.** Southern blot de los ADN digeridos con *EcoRI* correspondientes a la cepa parental *Bb9.73* (Línea 1) y del mutante *BbBvgA<sup>-</sup>* (Línea 2). Para el revelado se empleó una sonda marcada con digoxigenina y obtenida por PCR. La misma corresponde a una región interna del gen *bvgA*.

**2-mutante defectivo en la expresión de flagelina.** Para la obtención de un mutante de *B. bronchiseptica* defectivo en la expresión del factor de avirulencia flagelina utilizamos un procedimiento análogo al descrito en la sección anterior, pero utilizando oligonucleótidos diseñados específicamente para amplificar un fragmento de la región interna del gen *flaA*, en base a secuencias ya publicadas (6) (número de acceso al Genbank L13034). Se amplificó por PCR una porción interna de 502 pares de bases (pb) de la secuencia codificante del gen *flaA* de *B. bronchiseptica*. Este fragmento fue clonado en un vector movilizable y no replicativo en *Bordetella* (pK18mob::*flaA* interno). Este plásmido recombinante fue introducido desde la cepa donadora *E. coli* S17-1 a la receptora *Bb9.73* por conjugación. Los transconjugantes de *Bordetella* que habían integrado el plásmido por recombinación homóloga fueron seleccionados de acuerdo a su resistencia a antibióticos (Sm de la cepa receptora y Km codificado en el plásmido recombinante). Los transconjugantes Sm<sup>r</sup>Km<sup>r</sup> fueron luego analizados en la expresión de la flagelina mediante ensayos de movilidad en agar semisólido. Además realizamos corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida y ensayos de inmunoblot a partir de proteínas totales y de un suero anti-flagelina monoespecífico preparado por nosotros. Las proteínas totales fueron preparadas de suspensiones bacterianas de la cepa parental y del mutante defectivo cultivadas ambas en condiciones de fase avirulenta (cultivos a 22 °C) para permitir que la flagelina se exprese. Como se muestra en la figura III.4, el suero anti-flagelina permitió detectar la presencia de flagelina sólo en la cepa parental *Bb9.73* pero no el mutante *Bbfla*<sup>-</sup> cultivadas en condiciones de avirulencia. Los mutantes no móviles fueron seleccionados y denominados *Bbfla*<sup>-</sup> (Fig III.2).



**Figura III.4.** Inmunoblot de preparados de proteínas totales obtenidos a partir de la lisis celular de *Bb9.73* en fase avirulenta (Línea 1), *BbBvgA*<sup>-</sup> cultivada en condiciones de virulencia (Línea 2) y *Bbfla*<sup>-</sup> en fase avirulenta (Línea 3). Las muestras proteicas transferidas fueron expuestas a un suero policlonal anti flagelina.

A fin de confirmar que la construcción génica obtenida era la deseada, se realizó, al igual que para *BbBvgA*<sup>-</sup>, un blotting de las muestras de ADN de las cepas mutantes y de la parental digeridas con *EcoRV*, enzima que no reconoce ningún sitio en la secuencia del gen *flaA* ni en la secuencia del vector pK18mob. Las muestras separadas por electroforesis y transferidas a una membrana de nitrocelulosa fueron reveladas con una sonda marcada con digoxigenina (*flaADIG*) que hibrida con la secuencia del gen *flaA*. Mediante este ensayo pudimos observar que para uno de los clones analizados la sonda *flaADIG* hibrida con un único fragmento cuyo tamaño es mayor que el correspondiente a la banda observada en la cepa parental (resultado no presentado). El tamaño de la banda del mutante *Bbfla*<sup>-</sup> se corresponde al de la banda

de la cepa parental más el del plásmido pk18mob (3.7 Kpb) que ha sido integrado en el genoma de *Bbfla*<sup>-</sup>. Este resultado confirma que estamos frente a un única inserción del vector pK18mob:: *flaA* interno y que el mismo se encuentra en el gen *flaA*, tal como se deseaba. Este mutante al que denominamos *Bbfla*<sup>-</sup>, fue repicado y conservado a -80°C, de igual forma que el mutante *BbBvgA*<sup>-</sup>.

### **Complementación de los mutantes *BbBvgA* y *Bbfla*<sup>-</sup>**

Con el fin de corroborar que las diferencias observadas eran debidas a las mutaciones buscadas en cada uno de los genes (gen *bvgA* para *BbBvgA* y gen *flaA* para *Bbfla*<sup>-</sup>) se realizaron ensayos de complementación mediante el empleo de una biblioteca genómica de *B. bronchiseptica*. Para ello, como primer paso construimos una biblioteca genómica a partir del DNA de *Bb 9.73* digerido parcialmente con las enzimas de restricción *Sac I* y *Spe I*. Los fragmentos de ADN así obtenidos fueron clonados en el plásmido pHC60 replicativo en *Bordetella*. Los distintos plásmidos conteniendo los diferentes fragmentos de ADN fueron introducidos en la cepa *E. coli* S17-1. Esta cepa fue empleada luego como donadora en un evento de conjugación sobre cada uno de los mutantes. Los transconjugantes fueron seleccionados por resistencia a antibióticos (Km de la cepa receptora y Tc codificado en el plásmido replicativo). A partir de las colonias Km<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup> se analizaron presencia de halo de hemólisis para la reversión del fenotipo BvgA<sup>-</sup> y ensayos de movilidad en busca del fenotipo flagelina complementado. De esta forma se obtuvo una cepa *BbBvgA* hemolítica y una *Bbfla*<sup>-</sup> móvil. En cada caso se aislaron los plásmidos a partir de los cuales se pudo determinar que el primero contenía un fragmento de aprox 1900 pb y el aislado de *Bbfla*<sup>-</sup> un fragmento de aprox. 1500 pb. Mediante las reacciones de PCR antes descripttas pudimos determinar que cada plásmido aislado contiene a cada uno de los genes que se quería interrumpir. Asimismo, los plásmidos purificados e introducidos por conjugación en el mutante *BbBvgA* y *Bbfla*<sup>-</sup> respectivamente fueron capaces de restaurar la producción de hemólisis y de flagelina.

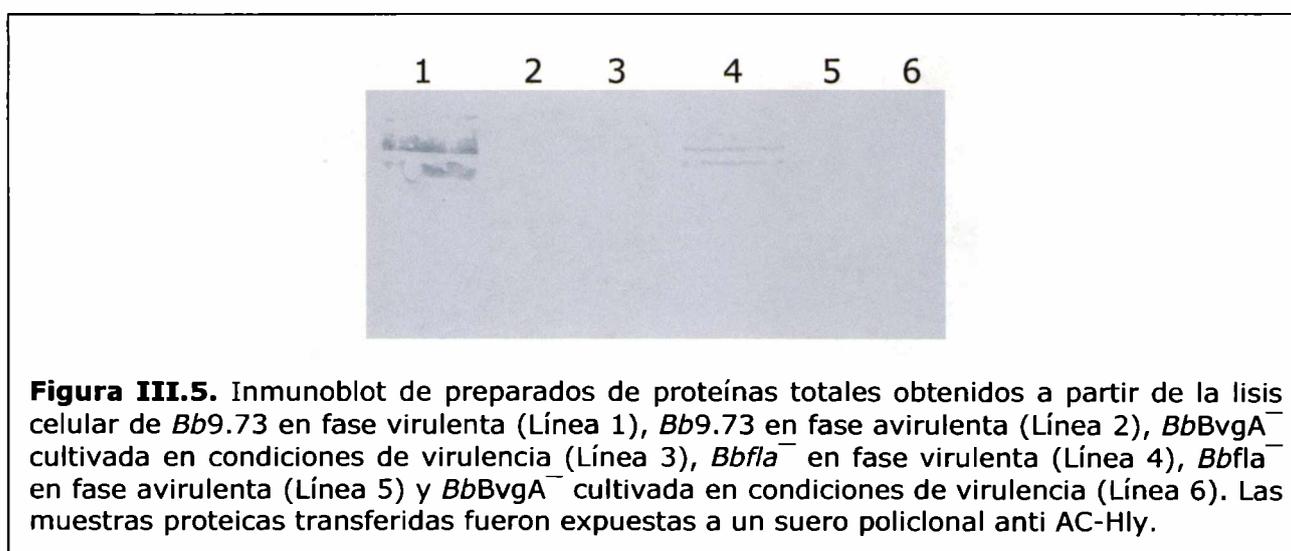
### **Análisis de la modulación de fase en cada uno de los mutantes defectivos obtenidos**

Con el fin de avanzar en la caracterización los mutantes defectivos obtenidos, se estudió en cada uno de ellos la funcionalidad del sistema BvgAS. Este análisis nos pareció necesario sobre todo para el mutante *Bbfla*<sup>-</sup> ya que en este mutante se podría ver afectada la transducción de señales de este sistema ya que el flagelo está contenido en la superficie de la bacteria al igual que la proteína BvgS de este sistema (68,217,222,450). De todas formas analizamos la funcionalidad del sistema BvgAS para los dos mutantes defectivos a través de la evaluación de la respuesta de los mismos frente a la presencia de moduladores conocidos. Se sometieron así a las cepas *Bb9.73* y *Bbfla*<sup>-</sup> a distintas condiciones moduladoras: a) crecimiento a 22° C y b) en presencia de sulfato de magnesio 40 mM. Como control del ensayo se empleó a la cepa parental *Bb9.73*. Pasado un período de incubación de 24 hs. se procedió a

analizar la expresión de la actividad hemolítica debida a AC-Hly como marcador de virulencia a través de la observación del halo de hemólisis en placas conteniendo el medio SS suplementado con sangre. A través de estos ensayos se pudo establecer que tanto la cepa parental como el mutante defectivo en flagelina responden normalmente a la presencia de los moduladores no expresando actividad hemolítica en condiciones de cultivo avirulento. También se pudo observar que en condiciones de cultivo virulento, es decir en ausencia de los moduladores, ambas cepas presentaban un halo de hemólisis de similar diámetro.

La expresión en estas cepas de AC - Hly fue confirmada mediante Western blot realizado a partir de proteínas obtenidas de lisados bacterianos corridas en geles de poliácridamida, utilizando suero policlonal de ratón contra AC-Hly (Fig. III.5). Los resultados obtenidos mediante esta técnica se correlacionan perfectamente con la observación de los halos de hemólisis.

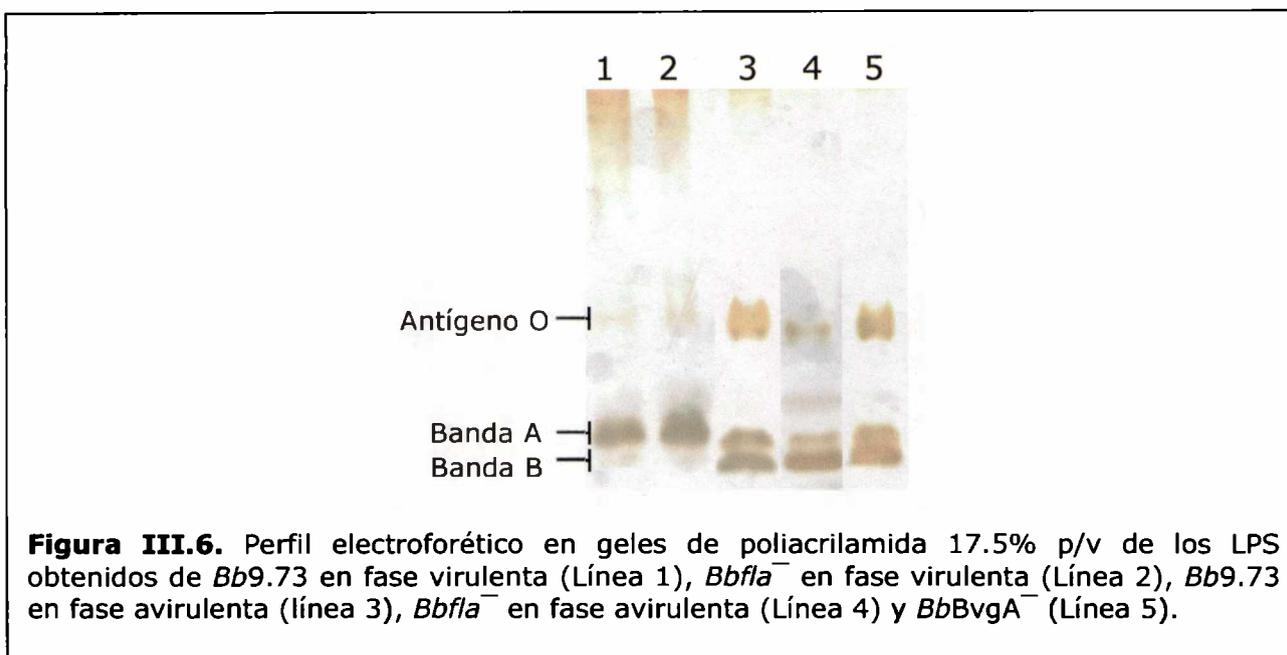
En el caso del mutante defectivo en BvgA en todas las condiciones ensayadas se mostro como no hemolítico.



**Figura III.5.** Inmunoblot de preparados de proteínas totales obtenidos a partir de la lisis celular de *Bb9.73* en fase virulenta (Línea 1), *Bb9.73* en fase avirulenta (Línea 2), *BbBvgA*<sup>-</sup> cultivada en condiciones de virulencia (Línea 3), *Bbfla*<sup>-</sup> en fase virulenta (Línea 4), *Bbfla*<sup>-</sup> en fase avirulenta (Línea 5) y *BbBvgA*<sup>-</sup> cultivada en condiciones de virulencia (Línea 6). Las muestras proteicas transferidas fueron expuestas a un suero policlonal anti AC-Hly.

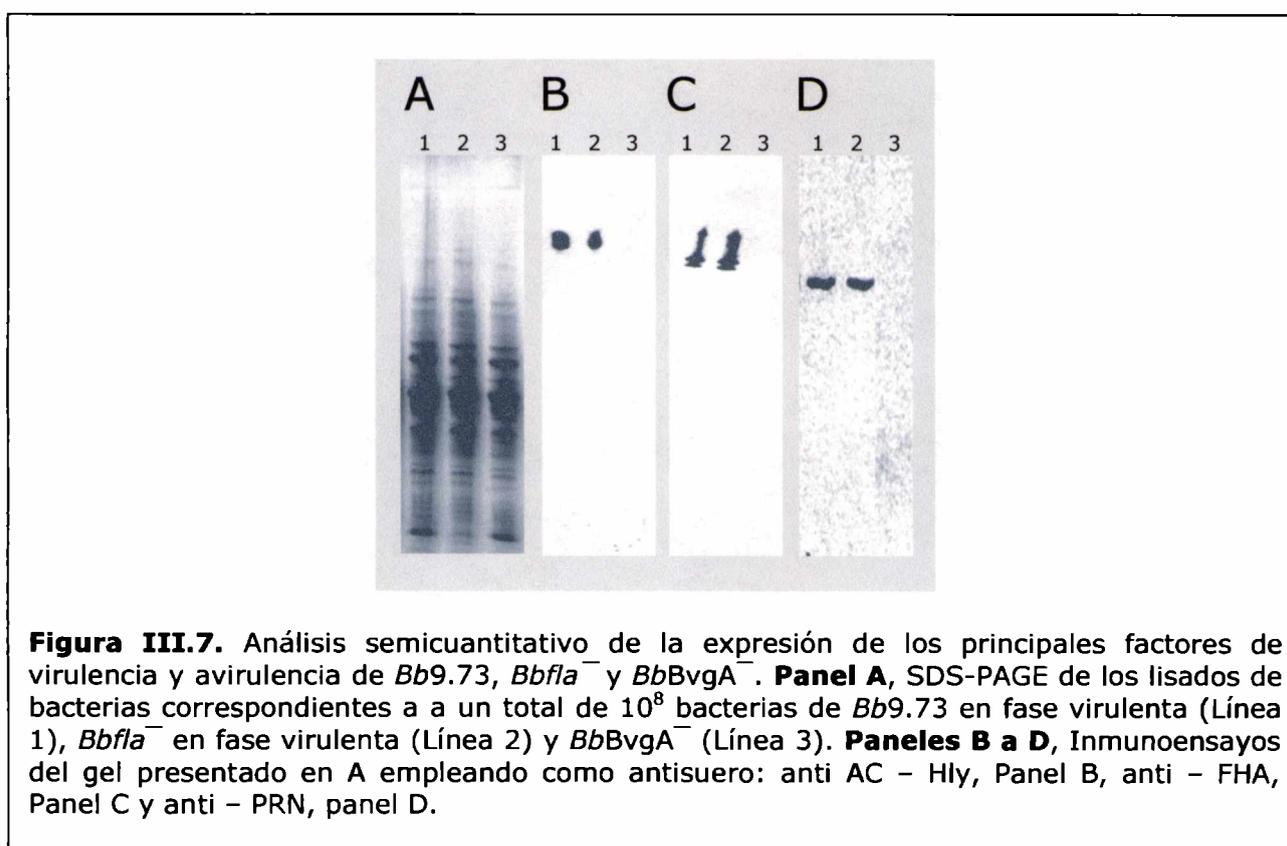
### **Análisis del perfil electroforético del lipopolisacárido en los mutantes defectivos *BbBvgA* y *Bbfla*<sup>-</sup>**

El lipopolisacárido (LPS) es una estructura que se encuentra formando la membrana externa de las bacterias Gram negativas. A fin de evaluar si la ausencia de BvgA o del filamento flagelar habían alterado esta estructura de membrana se analizó el perfil electroforético de los LPS extraídos de *BbBvgA* y *Bbfla*<sup>-</sup> en fase virulenta y en fase avirulenta y se los comparó con los LPS de la cepa parental, también en ambas fases. En la figura III.5 se puede observar que el perfil presentado por el mutante *Bbfla*<sup>-</sup> es similar al de la cepa parental, tanto en fase virulenta como en fase avirulenta, mientras que el mutante *BbBvgA*<sup>-</sup> presenta un perfil similar al de la cepa parental en fase avirulenta.



### Análisis de la expresión de los principales factores de virulencia (AC-Hly, FHA y PRN)

Con el fin de verificar que en condiciones de cultivo virulento el mutante *Bbfla*<sup>-</sup> expresa los factores de virulencia necesarios para iniciar la infección realizamos un análisis semicuantitativo de la expresión de los principales determinantes de virulencia mediante el empleo de la técnica de inmunoblot usando antisueros específicos policlonales anti-ACHly, anti-Prn y anti-FHA. Los inmunoblots se realizaron a partir de



proteínas totales obtenidas de lisados bacterianos de la cepa mutante y de la parental. Como se muestra en la Figura III.7, los diferentes sueros policlonales específicos para los factores de virulencia analizados permitieron detectar la presencia de AC-Hly, PRN y FHA en *Bb*9.73 y *Bb*fla<sup>-</sup> cultivadas en condiciones de virulencia.

Los mismos ensayos se realizaron con el mutante defectivo en BvgA y en todos los casos analizados el mutante no expresó ninguno de los factores (Fig. III.7)

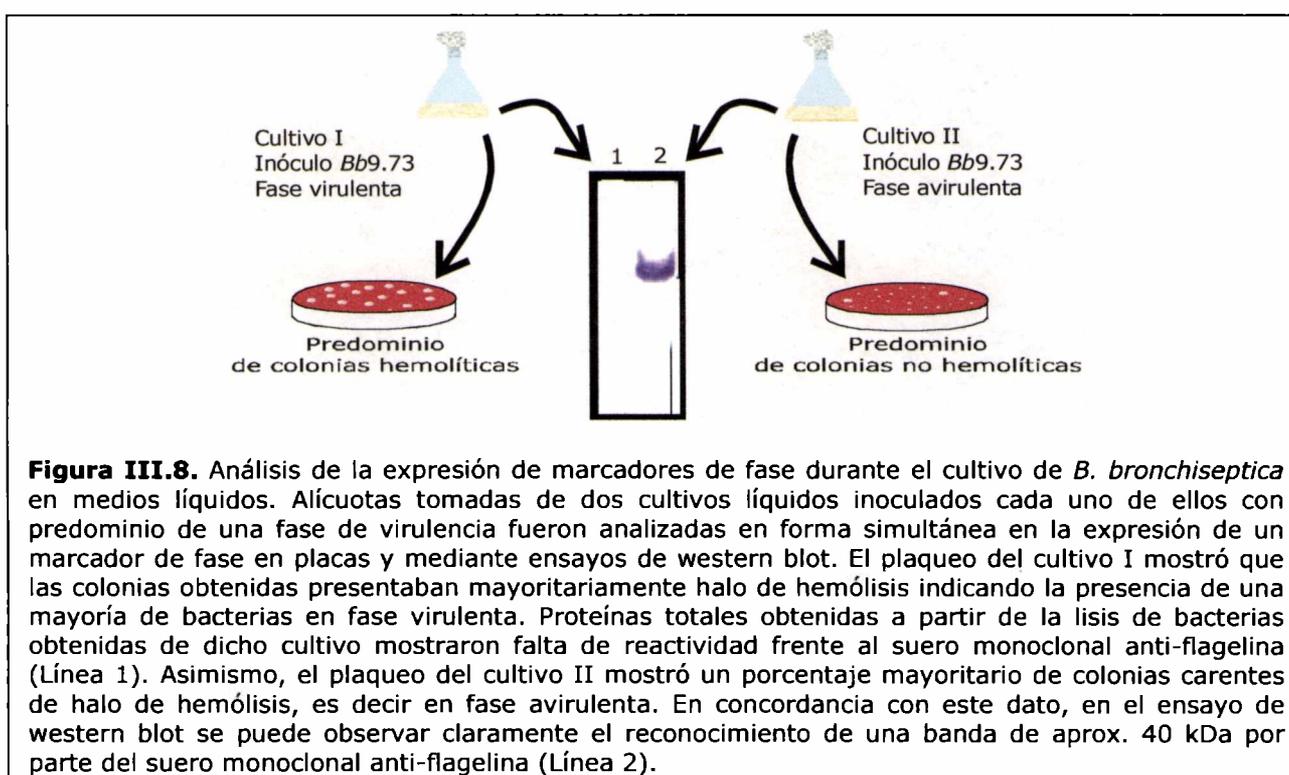
Una vez caracterizados los mutantes a utilizar procedimos a realizar los estudios de persistencia en medio líquido y los resultados obtenidos se presentan a continuación.

### **Análisis de la supervivencia de *B. bronchiseptica* en cultivos líquidos**

**Metodología general utilizada en todos los ensayos de supervivencia.** Una vez obtenidos los distintos mutantes a estudiar, realizamos los ensayos de supervivencia durante largos períodos de tiempo. Empleamos el medio sintético de Stainer – Scholte (406) recomendado para el cultivo de *Bordetella* y un medio de escaso contenido en nutrientes como el buffer fosfato salino (PBS). En todos los casos, a distintos tiempos post - inoculación se analizó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas conteniendo el medio SS suplementado con sangre (SSs) y en forma simultánea se determinó la proporción de bacterias que se encontraban en cada una de las fase de virulencia (fase virulenta, fase avirulenta y fase intermedia). Como marcador de fase virulenta se evaluó la morfología de las colonias y la presencia de halo de hemólisis, producto de la expresión de la toxina adenilato ciclasa-hemolisina (AC-Hly). De esta forma clasificamos a las colonias pequeñas con halo de hemólisis como de fase virulenta y a las colonias más grandes y planas, sin hemólisis como de fase avirulenta. Las colonias que se encontraban en fase intermedia presentaban un halo de hemólisis menor que el observado en las bacterias en fase virulenta, y una morfología de colonias planas y chatas, similares a la morfología de las colonias en fase avirulenta.

Para analizar si la fase observada en los cultivos en placas de SSs se correspondía con la presente en el medio de cultivo líquido, evaluamos mediante ensayos de Western-blot la expresión de marcadores de avirulencia sobre muestras tomadas directamente del medio líquido. Al resultado así obtenido se lo comparó con el referido a la hemólisis en las placas de Petri de las colonias provenientes del mismo cultivo líquido. Este ensayo consistió entonces en tomar dos alícuotas de dos cultivos líquidos en los que se esperaba en una mayoría de colonias en fase virulenta y en otra mayoría de colonias en fase avirulenta. Una alícuota de cada cultivo fue plaqueada en medio sólido suplementado con sangre. Con las otras alícuotas de cada uno de los cultivos se realizó en forma paralela inmunodetecciones empleando como antisuero anticuerpos monoclonales anti-flagelina 15D8 gentilmente cedido por el Dr. Feng (116,117). Efectivamente, al cabo de 48 hs de incubación de las placas a 37°C se observó que una placa contenía mayoritariamente colonias en fase virulenta (más del 90 % de las colonias presentaban halo de hemólisis y la morfología característica

descrita anteriormente) y la otra placa presentaba mayoritariamente colonias en fase avirulenta (más del 90 % de las colonias no presentaban halo de hemólisis, además de la morfología correspondiente). Se observó además que el cultivo en el cual el crecimiento en placa presentaba un porcentaje de colonias avirulentas mayor al 90%, en el inmunoblot presentó una banda correspondiente al marcador de fase avirulenta flagelina. Para el cultivo en el que el recuento en placas de SSs mostraba más del 90% de sus colonias en fase virulenta no fue posible detectar mediante el ensayo de inmunoblotting la presencia de flagelina (Fig. III.8). Estos datos muestran una clara correlación entre el estado de virulencia-avirulencia observado en medio sólido y el correspondiente al medio líquido.

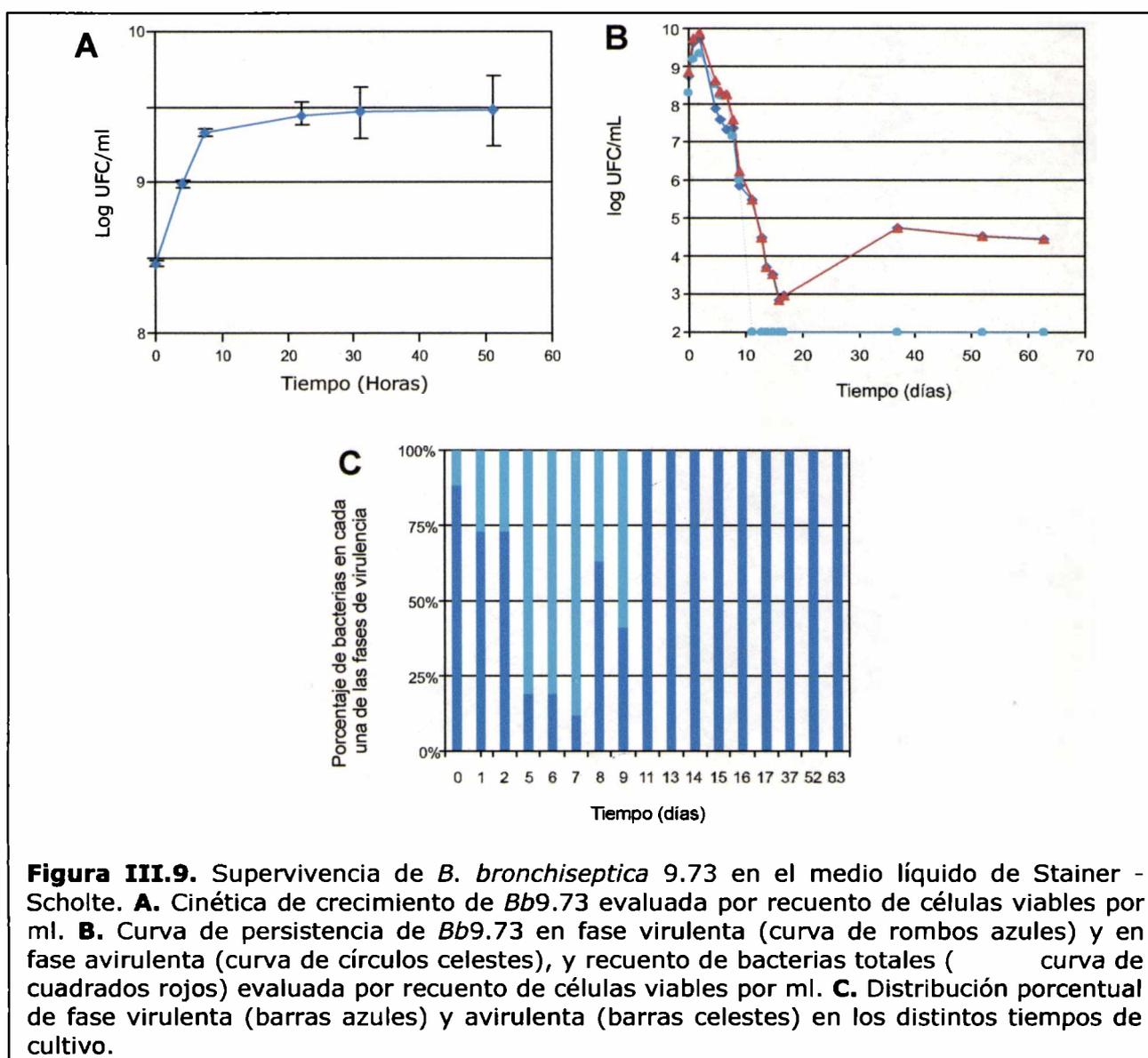


### **Análisis de la supervivencia de la cepa parental *B. bronchiseptica* CIP 9.73 en el medio de cultivo sintético de Stainer – Scholte**

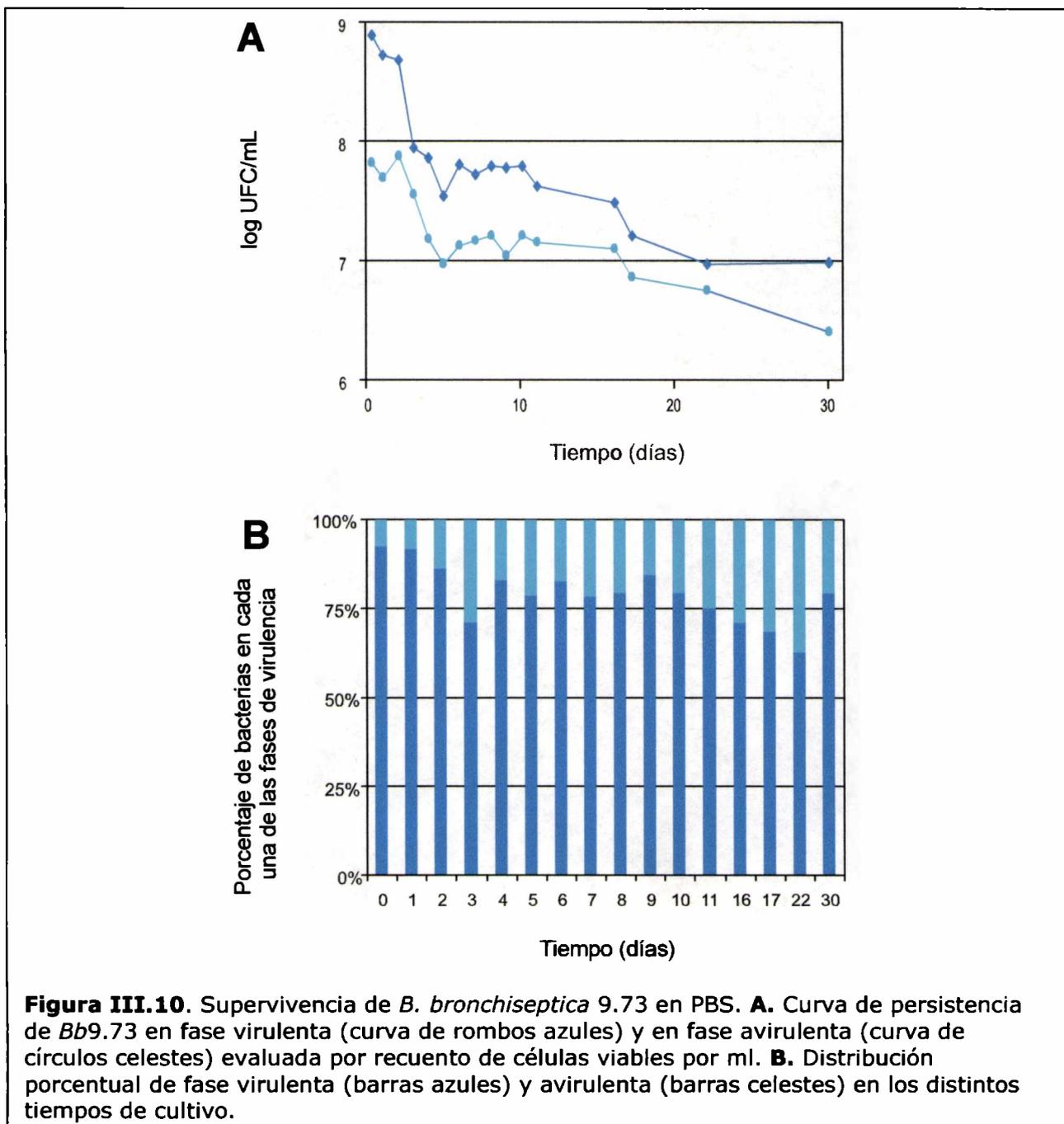
El análisis de la supervivencia de *B. bronchiseptica* CIP 9.73 se comenzó utilizando el medio de cultivo de composición definida de Stainer –Scholte. Los cultivos en este medio fueron iniciados con inóculos de *B. bronchiseptica* CIP 9.73 en fase virulenta de aproximadamente  $5 \cdot 10^8$  UFC/ml. Se tomaron muestras a distintos días post –inoculación para realizar el recuento en placa y los datos obtenidos se muestran en la figura III.9. Los mismos son representativos de ocho ensayos independientes. En la figura III.9.A se observa la cinética de crecimiento de *B. bronchiseptica* CIP 9.73 a partir de la cual pudimos calcular que la velocidad de crecimiento es de  $0,11 \text{ h}^{-1}$ . En la misma figura se puede observar que la duración de la fase log es de aproximadamente 9 horas a partir de la cual comienza la fase estacionaria con una biomasa de  $5 \cdot 10^9$  UFC/ml.

En la figura III.9.B se puede observar claramente que *B. bronchiseptica* presenta una elevada supervivencia, pudiendo recuperarse bacterias viables en valores mayores a  $10^5$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) aún a los 63 días de iniciado el cultivo. Es importante destacar en este punto que no fue adicionado medio de cultivo fresco a lo largo de todo el ensayo. En esta misma figura se observa que el número de bacterias viables iniciales de  $8 \cdot 10^8$  UFC/ml fue aumentando hasta alcanzar un máximo de  $8 \cdot 10^9$  UFC/ml a las 24 hs de cultivo, momento en que el cultivo se encuentra claramente en fase estacionaria. A partir del día 3 de iniciado el cultivo, el número de células decae a  $10^8$  UFC/ml y disminuye el número de bacterias viables hasta el día 16 del ensayo, llegando al valor de  $10^3$  UFC/ml. En el día 36 posterior al inicio del cultivo las bacterias viables comienzan nuevamente a dividirse hasta alcanzar el valor de  $5 \cdot 10^4$  UFC/ml. Este comportamiento es sorprendente en esta situación de agotamiento de nutrientes. Ese número de UFC/ml se mantuvo hasta al menos el día 63 post inoculación.

Al evaluar el estado de virulencia de las bacterias en cada uno de los tiempos



analizados (Figura III.9.C) pudimos observar que si bien el inóculo empleado para iniciar el cultivo contenía aproximadamente un 90% de las bacterias en fase virulenta y un 10% en fase avirulenta, entre el día 5 y 7 del ensayo se pudo observar un significativo aumento de bacterias en fase avirulenta pasando a ser la fase preponderante del cultivo (entre 80 y 90 %). Esta situación se revirtió a partir del día 11 post-inoculación, permaneciendo la fase virulenta como la preponderante (valores cercanos al 100%) hasta el final del ensayo (entre 35 y 65 días, dependiendo del ensayo). Es interesante notar en la figura III.9.B que a partir del día 11 del ensayo las bacterias en fase avirulenta se encontraban en valores no detectables mediante el recuento en placa. En algunos puntos de los ensayos fue posible detectar una pequeña proporción de bacterias en fase intermedia (en todos los casos menor al 1%).



### **Análisis de la supervivencia de *B. bronchiseptica* CIP 9.73 en PBS.**

A fin de evaluar la supervivencia de *B. bronchiseptica* en condiciones de escasez de nutrientes, realizamos nuevamente a escala de erlenmeyer cultivos de *B. bronchiseptica* en buffer fosfato salino (PBS). De la misma forma que en los ensayos realizados con el medio SS, partimos de inóculos de bacterias en fase virulenta con un recuento inicial de  $10^9$  UFC/ml. Evaluamos a distintos días post-inoculación el número de bacterias viables y en la figura III.10 se observan los resultados obtenidos de cuatro ensayos independientes. En esta figura se puede observar que en esta condición de cultivo, a partir del inóculo inicial ( $8 \cdot 10^8$  UFC/ml) se produjo un descenso constante en el número de bacterias viables a lo largo de todos los días ensayados. No obstante, el número de UFC/ml se mantuvo en valores elevados de  $10^7$  UFC/ml aún luego de 30 días de iniciado el cultivo.

En cuanto al estado de virulencia de las bacterias, se pudo observar que si bien en esta condición de cultivo no se detectaron marcados cambios de fase a lo largo de todos los días analizados, sí se observó que la fase virulenta se mantiene mayoritaria a lo largo de todo el cultivo, encontrándose siempre en porcentajes mayores al 60 %.

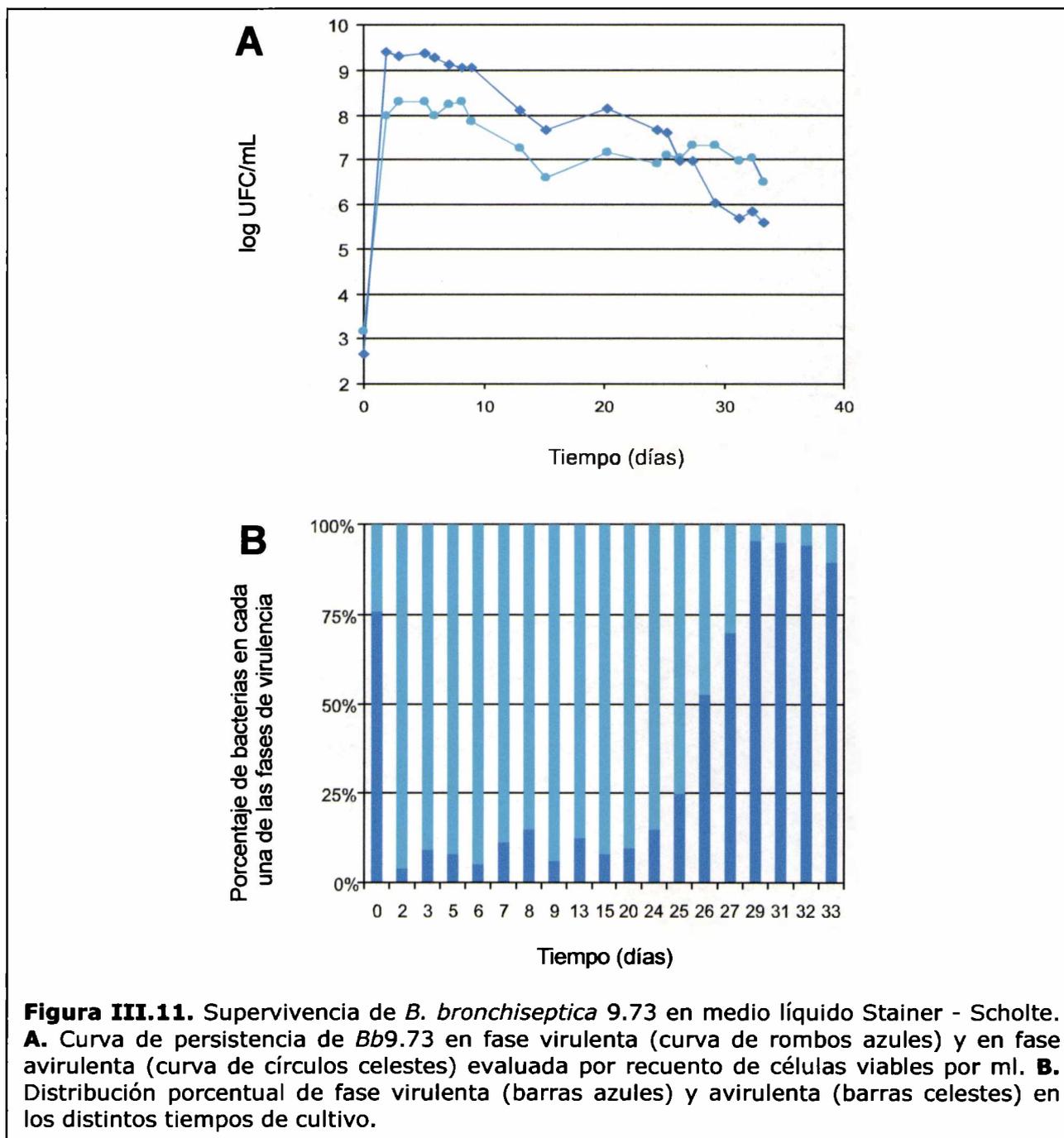
Los resultados hasta aquí obtenidos podrían reflejar el efecto de un tamaño poblacional bacteriano particular que quizás no se presente en cultivos con menor número de bacterias. Por otra parte nuestros resultados estarían en principio en contradicción con los publicados por Cotter y Miller (1994 y 1997) (83,84), que reportaron a la fase avirulenta como la más apta para sobrevivir en condiciones de escasez de nutrientes. Esta discrepancia podría deberse en principio a que las condiciones de cultivo utilizadas no fueron las mismas. El inóculo empleado por dichos autores fue de  $10^3$  UFC/ml, mientras que todos nuestros ensayos se iniciaban con  $10^8$  UFC/ml. Para determinar si la densidad celular inicial condiciona la fase en la cual las bacterias persisten en estos medios líquidos, en la siguiente etapa de nuestro trabajo decidimos evaluar la supervivencia de *B. bronchiseptica* partiendo de inóculos iniciales de  $10^3$  UFC/ml tanto en condiciones no limitantes como limitantes en nutrientes.

### **Análisis de la supervivencia de *B. bronchiseptica* CIP 9.73 en medios líquidos partiendo de inóculos bacterianos bajos**

Cuando inoculamos al medio de Stainer-Scholte con una suspensión bacteriana en fase virulenta con menor número inicial de UFC/ml que el utilizado anteriormente, obtuvimos los resultados que se muestran en la figura III.11. Los mismos son representativos de dos ensayos independientes. Partiendo de recuento inicial de bacterias viables de 1000 UFC/ml observamos que el número de UFC/ml aumenta durante los primeros 4 días, hasta llegar a  $10^9$  UFC/ml (Fig. III.11.A). Este número de bacterias viables se mantiene por casi 8 días, momento en el cual comienza a decrecer lentamente, llegando a valores de  $10^7$  UFC/ml a los 30 días de cultivo.

Respecto del estado de virulencia de las bacterias, puede observarse que inicialmente hay un 75% de bacterias en fase virulenta pero esta proporción se revierte drásticamente y la fase avirulenta pasa a representar el 90% del cultivo,

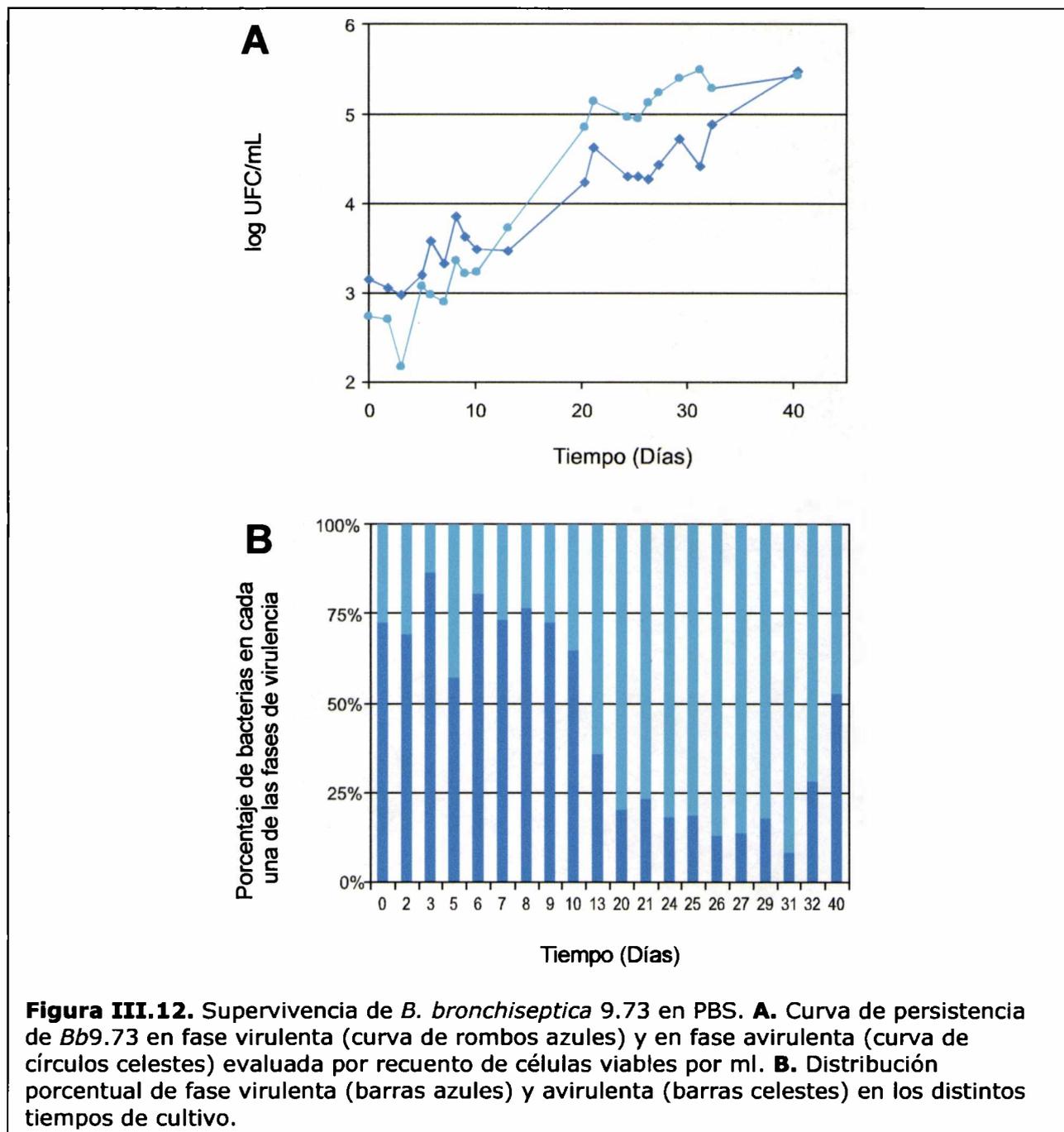
manteniéndose por unos 25 días. Al día 27 nuevamente la fase virulenta comienza a predominar en el cultivo y aumenta gradualmente hasta llegar a más del 90%, manteniéndose hasta el día 33, momento en que finalizamos el ensayo.



Realizamos también los ensayos utilizando el medio limitado en nutrientes (PBS). Los datos se presentan en la figura III.12. Los mismos son representativos de tres ensayos independientes. El análisis de los datos de recuento de bacterias muestra que en estas condiciones de cultivo, el número de UFC/ml aumenta constantemente a lo largo de todo el ensayo, alcanzando luego de 30 días valores entre  $10^5$  y  $10^6$  UFC/ml.

En estas condiciones de cultivo, la fase virulenta se mantiene en altos porcentajes (representando al menos el 60% del cultivo) por unos diez días. A partir del día 13 del ensayo la fase avirulenta pasa a ser la mayoritaria, manteniéndose por unos veinte

días en porcentajes mayores al 80%. Sin embargo, hacia el final del ensayo, observamos que nuevamente aumenta la proporción de la fase virulenta, representando más del 50% del cultivo.



Los resultados obtenidos en los puntos anteriores, que muestran a la fase virulenta de *B. bronchiseptica* como la más apta para sobrevivir, sorprenden desde el punto de vista cinético ya que ha sido reportado que el tiempo de generación de la fase virulenta duplica al de la fase avirulenta (aproximadamente de cuatro horas y dos horas, respectivamente) (156).

Pese a esta diferencia en el tiempo de duplicación, y para descartar la influencia de la preponderancia de alguna fase en los inóculos, a continuación decidimos realizar

ensayos de supervivencia partiendo de diferente relación entre bacterias en fase virulenta y bacterias en fase avirulenta.

En particular analizamos las siguientes condiciones

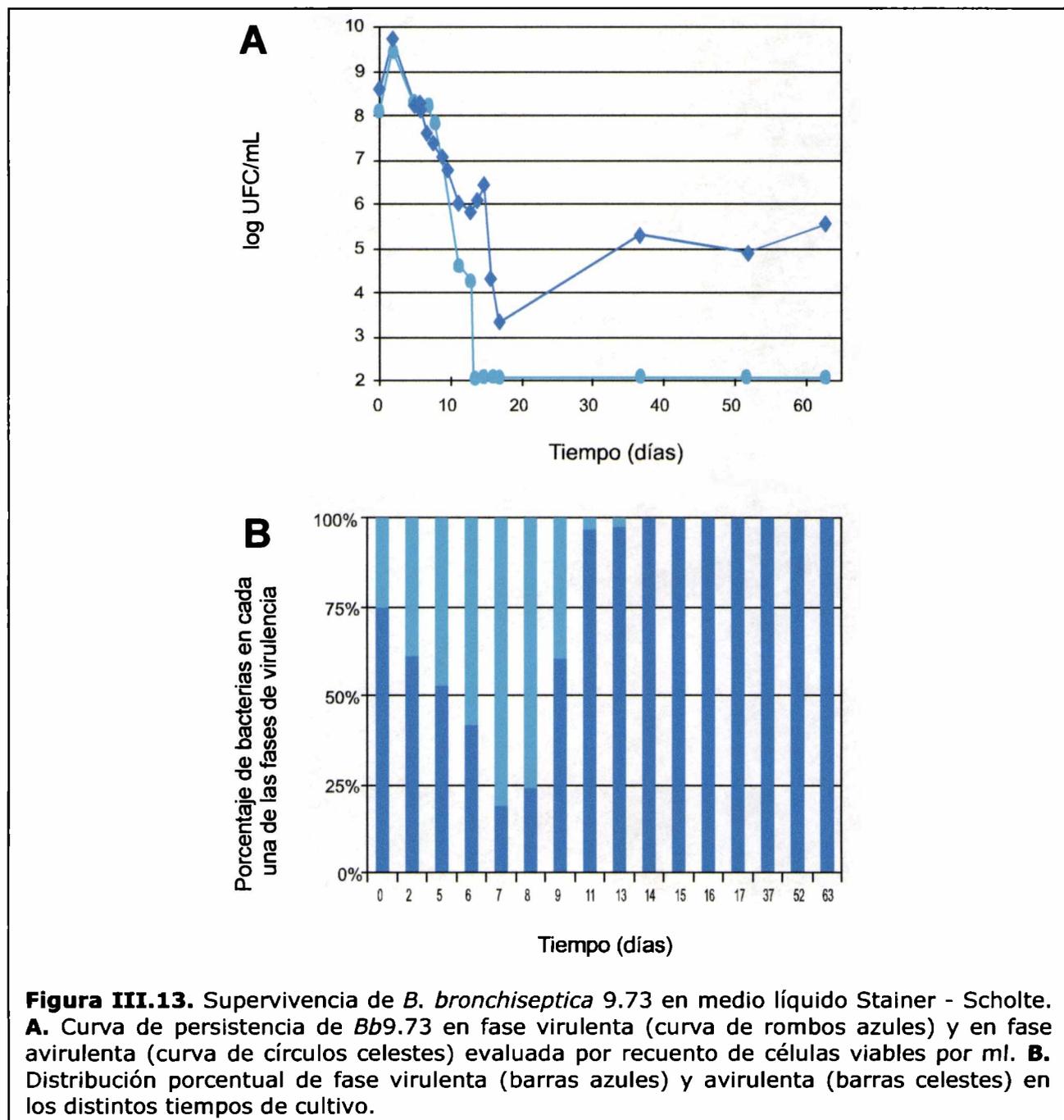
a) mayoría inicial de *B. bronchiseptica* en fase virulenta.

b) mayoría inicial de *B. bronchiseptica* en fase avirulenta.

Tanto a) como b) fueron evaluadas empleando el medio de cultivo SS.

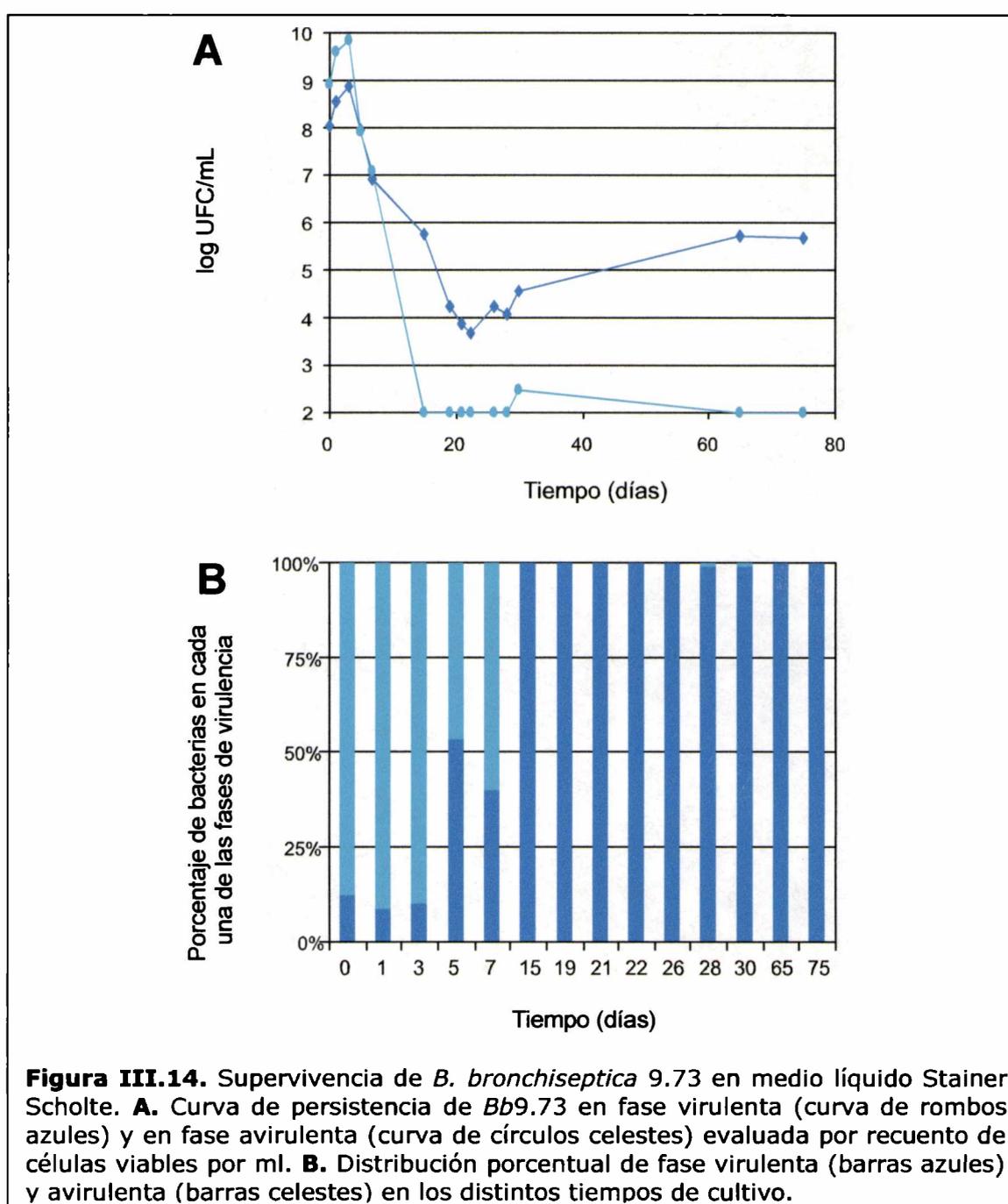
**Análisis de la supervivencia de *B. bronchiseptica* CIP 9.73 medios líquidos partiendo de inóculos bacterianos con predominio de fase virulenta**

Los resultados obtenidos a partir del empleo de los cultivos líquidos realizados con



inóculos de *B. bronchiseptica* con mayoría de bacterias en fase virulenta se muestran en la figura III.13. Los datos son representativos de tres ensayos independientes. En dicha figura se puede observar que el número de bacterias viables aumenta desde  $5.10^8$  UFC/ml hasta llegar a  $10^{10}$  UFC/ml al segundo día post - inoculación. Luego el número de bacterias viables por ml comenzó a descender, para estabilizarse en el valor de  $10^5$  UFC/ml al final del cultivo.

En esta condición en la que los inóculos iniciales se encontraban mayoritariamente en fase virulenta, se observó que esta fase disminuía gradualmente su proporción inicial hasta llegar a valores del 20 % a los siete días de incubación. Sin embargo, la fase virulenta vuelve a ser la mayoritaria entre el noveno y décimo día y es en esta fase que la bacteria persistió por largos períodos (Fig. III.13.B).



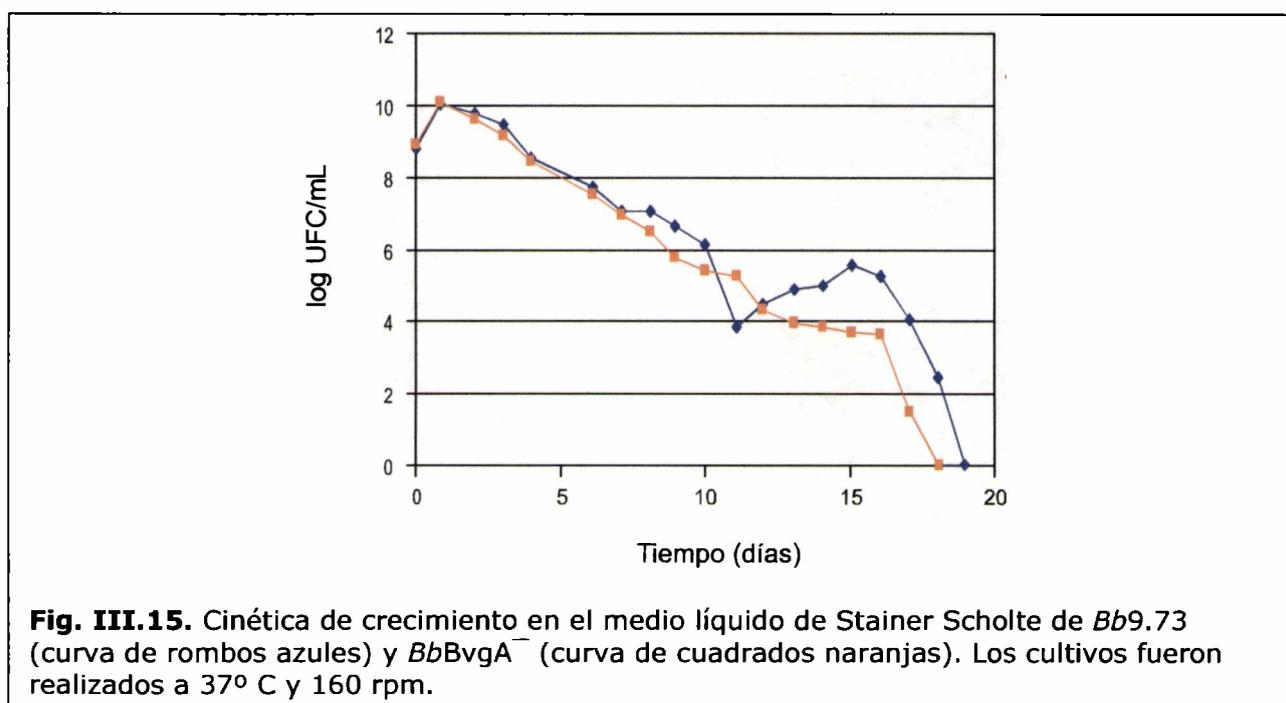
### Análisis de la supervivencia de *B. bronchiseptica* CIP 9.73 a partir de inóculos con predominio de fase avirulenta

Al realizar el cultivo con un inóculo de *B. bronchiseptica* con la fase avirulenta como la mayoritaria, observamos que a partir del inóculo inicial de  $10^9$  UFC/ml el número de bacterias viables aumentó hasta llegar a  $10^{10}$  UFC/ml en el día tres después de la inoculación. A partir de ese momento el número de bacterias viables por ml presentó un descenso, para estabilizarse en  $10^6$  UFC/ml al final del cultivo. Los datos presentados son representativos de dos ensayos independientes (Fig. III.14.A).

Con respecto a la proporción que presentan las distintas fases de virulencia, en este caso se observa que la preponderancia inicial de la fase avirulenta del inóculo se mantuvo sólo por 3 días, ya que a partir del quinto día de incubación la fase virulenta comenzó a aumentar su proporción para mantenerse casi en 100 % durante 75 días post inoculación (Fig. III.14.B).

### Análisis de la supervivencia en medios líquidos de una cepa de *B. bronchiseptica* que se encuentra bloqueada en la fase avirulenta

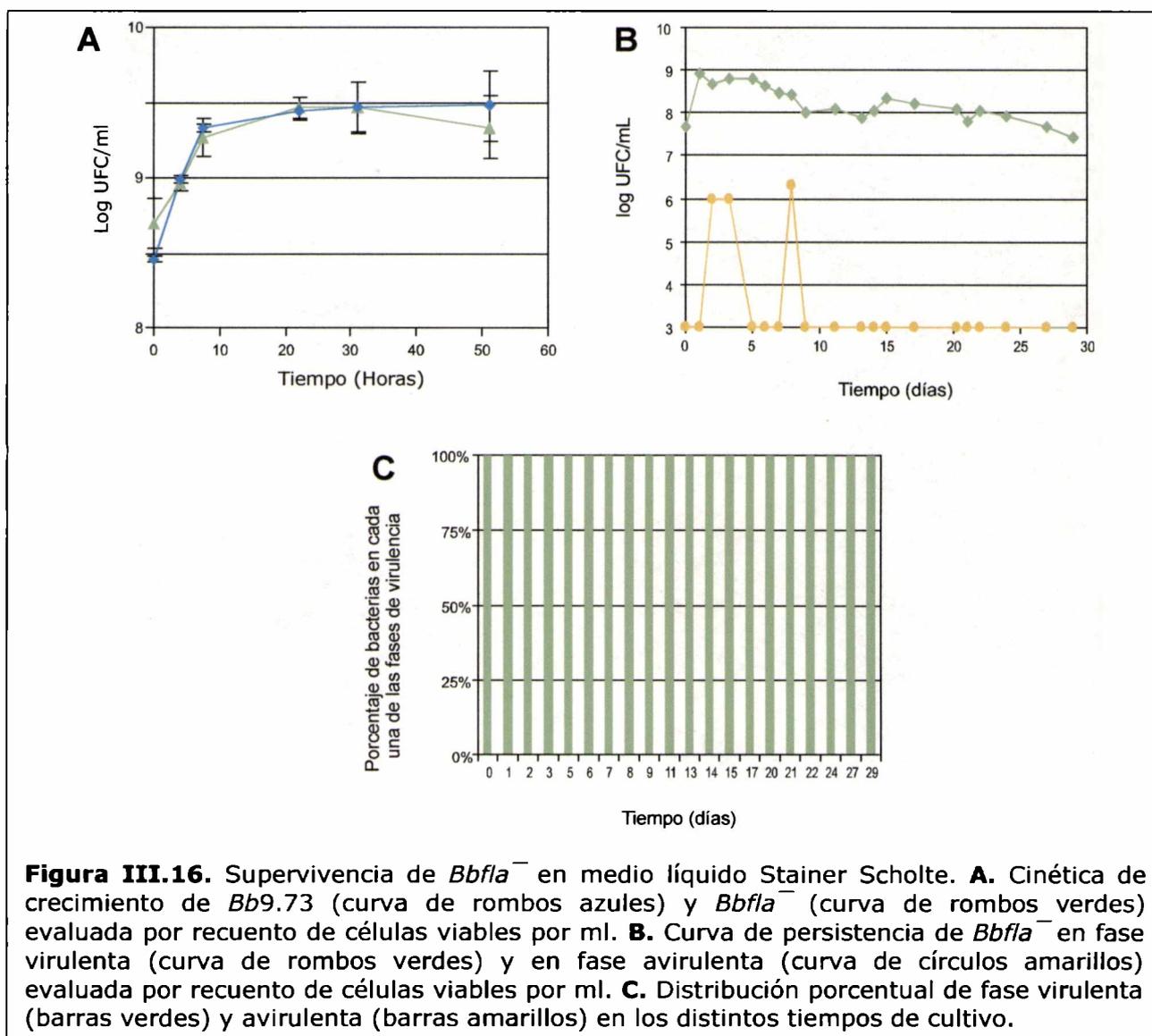
Para avanzar en el estudio del rol de los factores de avirulencia en la persistencia de *B. bronchiseptica*, decidimos evaluar el comportamiento del mutante *BbBvgA*<sup>-</sup> construido por nosotros. Estos ensayos nos permitieron analizar si la expresión de la fase virulenta es necesaria para que *B. bronchiseptica* persista por largos períodos de tiempo en cultivos *in vitro*. Realizamos ensayos de supervivencia de *BbBvgA*<sup>-</sup> utilizando el medio sintético líquido SS. En forma simultánea realizamos ensayos de supervivencia utilizando la cepa parental pero modulada (de aquí en más la denominamos cepa modulada) a la fase avirulenta. Los datos obtenidos representativos de dos ensayos independientes se muestran en la figura III.15. Como



puede observarse, la supervivencia de *BbBvgA*<sup>-</sup> y de la cepa modulada presentó un comportamiento similar. En los primeros dos días del ensayo para ambos tipos de bacterias se produce un aumento de 5 10<sup>8</sup> a 1 10<sup>10</sup> UFC/ml, a partir de allí el número de UFC/ml descendió constantemente durante casi todo el cultivo (18 - 19 días). Es así que a partir de los días 18 y 19 post - inoculación no fue posible recuperar bacterias viables ni de *BbBvgA*<sup>-</sup> ni de la cepa modulada. Es importante destacar que no fue posible detectar en el cultivo de la cepa parental cambios de fase hacia la fase virulenta en ninguno de los días analizados.

**Análisis de la supervivencia en medios líquidos de una cepa de *B. bronchiseptica* defectiva en la expresión de un factor de avirulencia**

Si bien en los estudios anteriores se observó claramente que la fase avirulenta no es la más apta para sobrevivir, quedaba por aclarar si algún factor de avirulencia en particular jugaba un rol en la persistencia. Por ello decidimos evaluar el comportamiento de un mutante defectivo en la expresión de un único factor de avirulencia. Realizamos entonces los ensayos con el mutante *Bbfla*<sup>-</sup>. Estos ensayos



**Figura III.16.** Supervivencia de *Bbfla*<sup>-</sup> en medio líquido Stainer Scholte. **A.** Cinética de crecimiento de *Bb9.73* (curva de rombos azules) y *Bbfla*<sup>-</sup> (curva de rombos verdes) evaluada por recuento de células viables por ml. **B.** Curva de persistencia de *Bbfla*<sup>-</sup> en fase virulenta (curva de rombos verdes) y en fase avirulenta (curva de círculos amarillos) evaluada por recuento de células viables por ml. **C.** Distribución porcentual de fase virulenta (barras verdes) y avirulenta (barras amarillos) en los distintos tiempos de cultivo.

nos permitieron analizar si la falta de un factor regulado negativamente por el sistema de dos componentes BvgAS afecta la cinética de crecimiento y los cambios de fase observados en la cepa parental. En la figura III.16.A se observa la curva de crecimiento de *Bbfla*<sup>-</sup> realizada en paralelo a la de la cepa parental. Los frascos se inocularon con una suspensión bacteriana de forma de alcanzar iniciar el cultivo con  $5 \cdot 10^8$  UFC/ml aproximadamente, y a partir de ahí a distintos tiempos fueron tomadas alícuotas a partir de las cuales se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC). Como puede observarse, la cepa mutante *Bbfla*<sup>-</sup> presenta una cinética de crecimiento similar a la de la cepa parental, con una duración de la fase logarítmica de 9 horas y alcanzando un número máximo de aprox.  $5 \cdot 10^9$  UFC/ml para ambas cepas. La velocidad de crecimiento fue de aproximadamente  $0,08 \text{ h}^{-1}$ , para el mutante en flagelina y de  $0,11 \text{ h}^{-1}$  para la cepa parental.

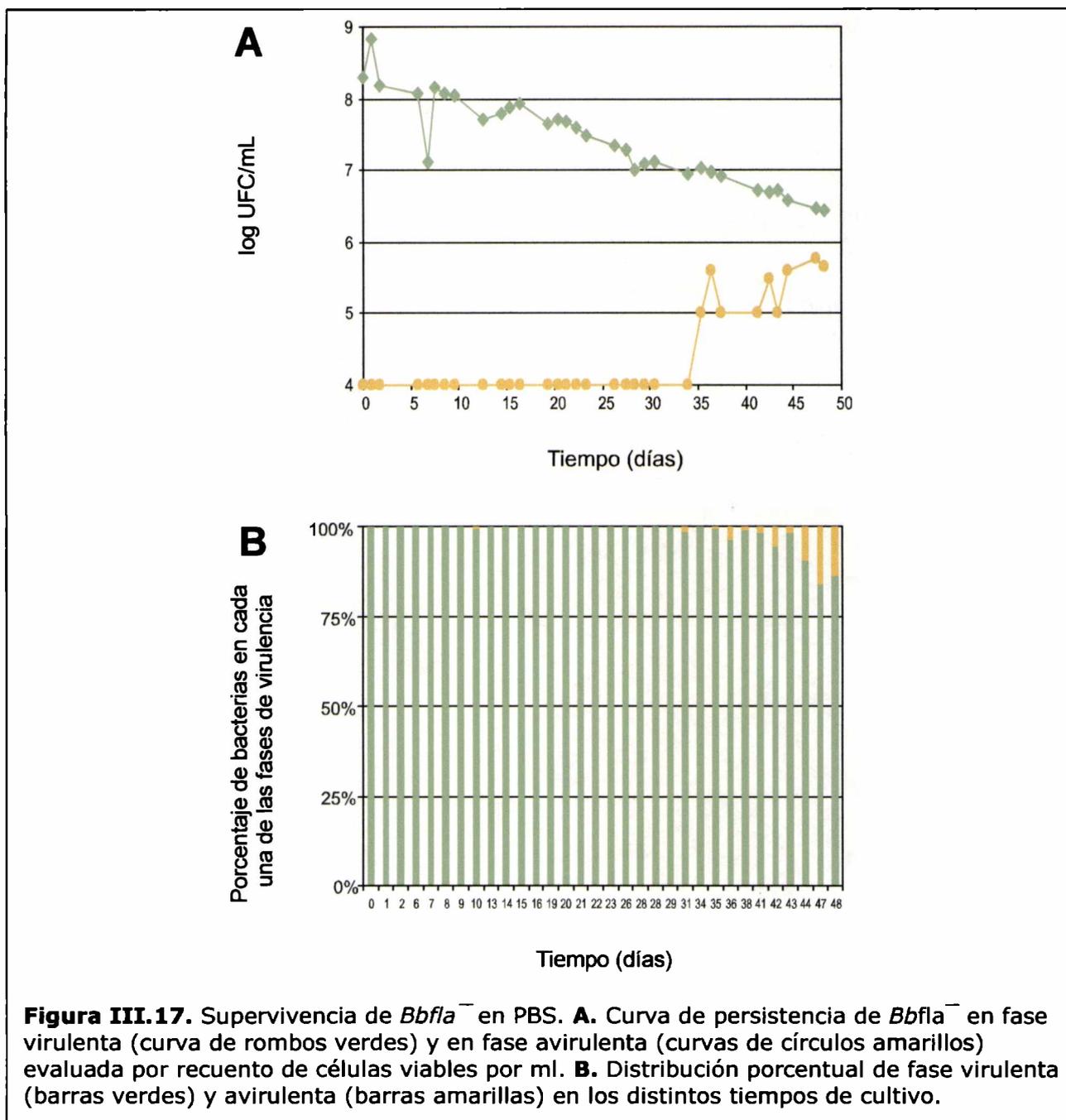
En la figura III.16.B se observa la curva de persistencia de *Bbfla*<sup>-</sup>. En dicho gráfico puede observarse que el número de bacterias viables por ml aumentó desde un valor inicial de  $5 \cdot 10^7$  a  $1 \cdot 10^9$  UFC/ml en los primeros dos días, para luego mantenerse en un valor casi constante de  $1 \cdot 10^8$  UFC/ml durante todos los días del ensayo.

Un aspecto interesante de destacar es que el mutante defectivo *Bbfla*<sup>-</sup> presenta un comportamiento diferente al de la cepa parental respecto al estado de virulencia de las bacterias a lo largo del cultivo. En particular, se pudo observar que en el inicio del cultivo las bacterias se encontraban en un 100 % en fase virulenta, la cual se mantiene en un porcentaje mayor al 99 % durante todo el ensayo, que fue analizado durante 30 días (Figura III.16.C).

Los resultados obtenidos que se muestran en la figura III.16 son representativos de tres ensayos independientes.

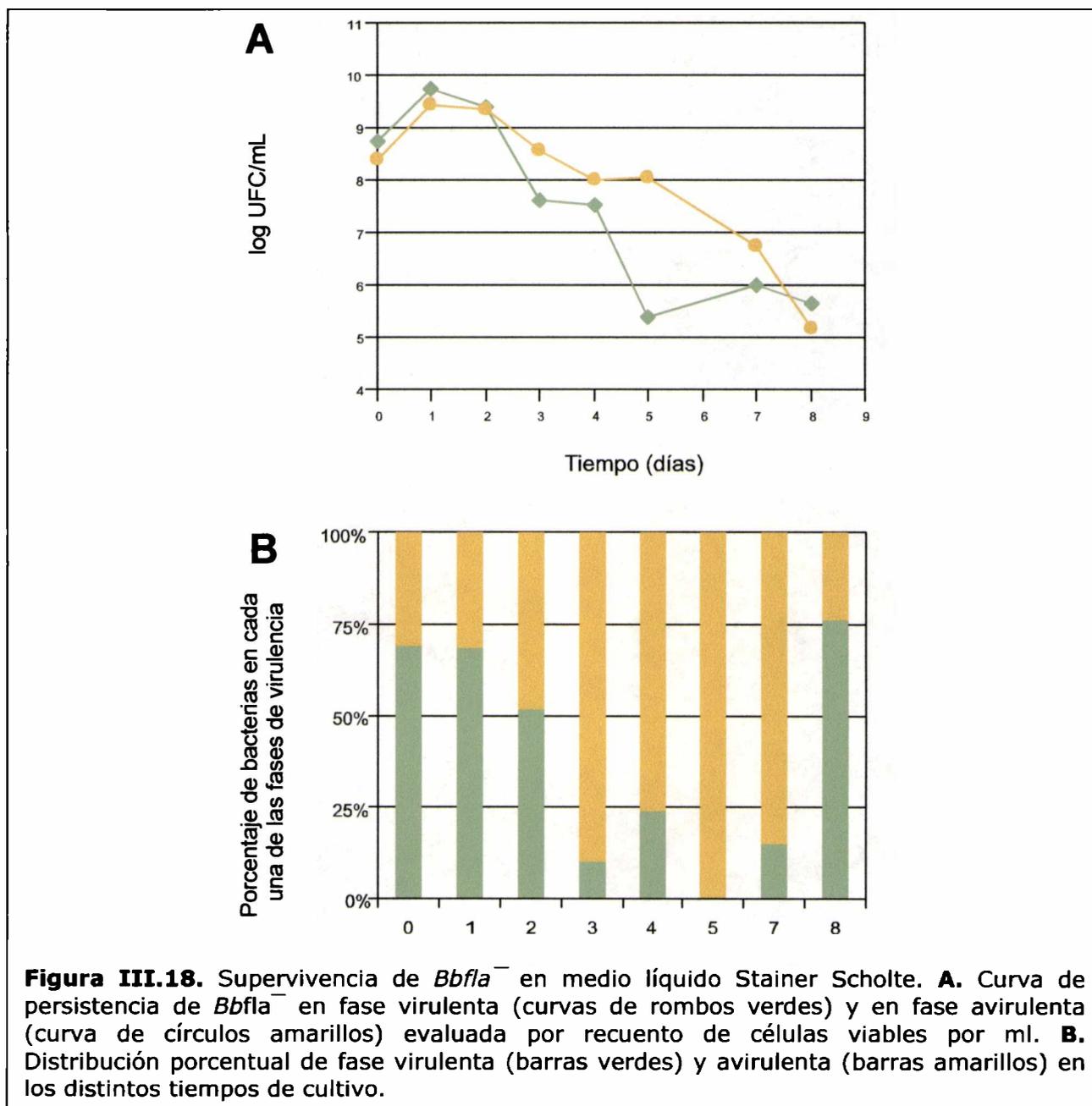
Al realizar los ensayos de persistencia de *Bbfla*<sup>-</sup> en PBS pudimos observar que si bien el número de bacterias viables por mililitro descendieron desde el valor inicial de  $1 \cdot 10^9$  UFC/ml a lo largo de todo el ensayo, al cabo de 48 días aún permanece en valores elevados de  $5 \cdot 10^6$  UFC/ml (Fig. III.17). Los datos son representativos de dos ensayos independientes.

En esta condición de cultivo, la fase virulenta del mutante defectivo *Bbfla*<sup>-</sup> se mantuvo en valores mayores al 80% durante todo el ensayo (48 días).



Los resultados obtenidos con el mutante *Bbfla*<sup>-</sup> indican que en las condiciones estudiadas, el mutante presenta una menor tendencia al cambio hacia la fase avirulenta. A fin de analizar si en alguna condición de cultivo podíamos observar un comportamiento similar al de la cepa parental, se ensayaron distintas proporciones entre bacterias en fase virulenta y avirulenta de *Bbfla*<sup>-</sup> en el inóculo inicial de los ensayos. De esta forma pudimos obtener una curva similar a la presentada por la cepa parental cuando utilizamos un inóculo con un 30% de las bacterias en fase avirulenta. Los datos presentados en la figura III.18 son representativos de dos ensayos independientes. En la curva de persistencia podemos observar que a partir del inóculo inicial de  $5 \times 10^8$  UFC/ml se produjo un aumento en las primeras 24 horas del cultivo hasta llegar al valor de  $5 \times 10^9$  UFC/ml. A partir de ese momento disminuyó el número de bacterias viables hasta llegar a  $5 \times 10^5$  UFC/ml en el día 8 post-inoculación.

Con respecto a la proporción de fases, al inicio del cultivo la fase virulenta representaba el 30% de las bacterias viables, porcentaje que comenzó a descender en los primeros días. En el día 3 del cultivo la fase avirulenta fue la mayoritaria, llegando a representar el 100% del cultivo en el día 5. A partir del día 7 la fase virulenta comenzó a aumentar su proporción nuevamente para ser la mayoritaria en el último día analizado.



**Búsqueda de señales inductoras de predominio de fase avirulenta a fase virulenta en sobrenadantes de cultivo**

Los resultados obtenidos hasta el momento indican, a diferencia de reportes previos, que la fase virulenta es la más apta para persistir por largos períodos de tiempo en las condiciones estudiadas. Más aún, en el transcurso de los cultivos se

observaron cambios en el predominio de las fases de virulencia. Estos cambios podrían deberse a la aparición durante el cultivo de algún componente que actuara como señal del sistema BvgAS provocando un cambio de fase.

Para analizar esta posibilidad obtuvimos sobrenadantes de cultivos en los que se había observado un cambio en el predominio de fase, en particular se eligió aquel que pasó de un predominio de fase avirulenta hacia uno de fase virulenta. Es decir que si existiera alguna señal, ésta induciría el cambio desde una fase avirulenta hacia una virulenta.

Mediante centrifugación y posterior filtrado por membranas de bajo pegado de proteínas obtuvimos un sobrenadante libre de células que fue analizado en su capacidad de inducir un cambio de fase sobre un inóculo fresco de *B. bronchiseptica* que contenía aproximadamente un 50% de las bacterias en cada una de las fases. Esta relación entre fase virulenta y avirulenta se eligió a fin de que en caso de producirse algún cambio en el predominio de las fases éste se pudiera observar aún cuando existiera sólo una subpoblación sensible a la señal. Al encontrarse ambas fases de virulencia igualmente representadas al inicio del ensayo, un cambio en el predominio de cualquiera de ellas contaría con una mayor probabilidad de ser detectado.

Una vez inoculado el sobrenadante con *B. bronchiseptica* en esa distribución de fases de cultivo (**A**), a diferentes horas post inoculación se tomaron alícuotas para realizar el recuento de UFC y para determinar el porcentaje de cada una de las fases de virulencia. Como controles se utilizaron:

**B.** un sobrenadante proveniente de un cultivo de *B. bronchiseptica* que se encontraba mayoritariamente en fase virulenta, antes y después de obtenido el sobrenadante.

**C.** sobrenadante de un cultivo que se encontraba mayoritariamente en fase avirulenta, antes y después de obtenido el sobrenadante.

**D.** medio de cultivo SS fresco.

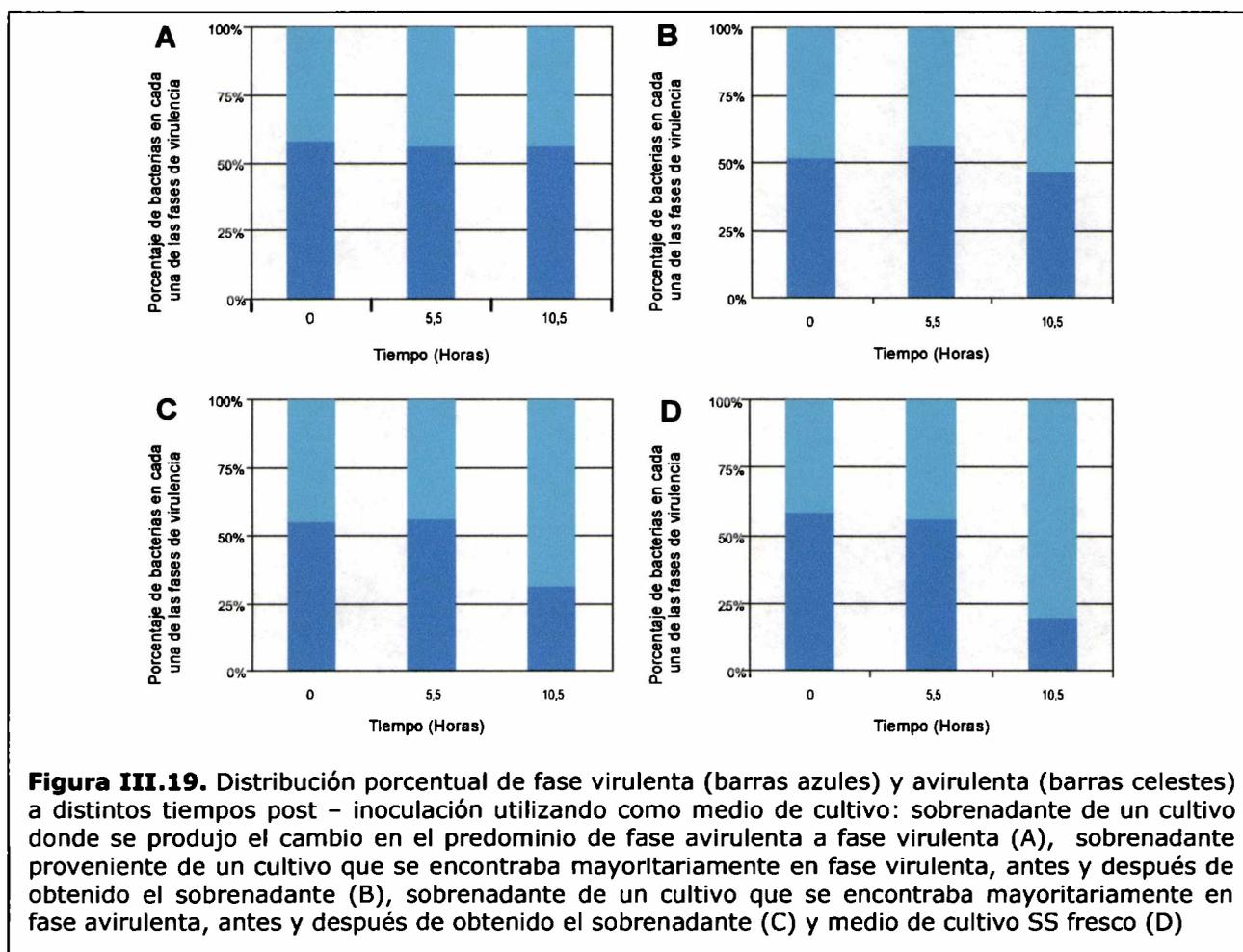
**B**, **C** y **D** se sembraron con el mismo inóculo que el sobrenadante de interés, es decir con un inóculo con una distribución de fase 50% de fase virulenta y 50% de fase avirulenta. A partir de estos cultivos se tomaron muestras en forma simultánea. Los datos obtenidos de estos ensayos se muestran en las figuras III.19 y III.29. Pudimos observar que el sobrenadante que presumiblemente contiene una señal, si bien no indujo un cambio de fase en el inóculo fresco, logró mantener la proporción inicial de fases virulenta y avirulenta durante las aproximadamente 10 horas analizadas. Llamativamente, el sobrenadante **B** presentó un comportamiento similar, manteniendo la proporción entre las fases. Por el contrario, tanto el sobrenadante **C** como el medio SS fresco (**D**) no lograron mantener la proporción inicial entre las fases, y la fase avirulenta pasó a ser la mayoritaria luego de 10 horas de contacto.

Aunque las curvas de crecimiento de estos ensayos presentaron diferencias entre sí, la distribución de fases no resultó modificada por dicha discrepancia (Fig. III.20).

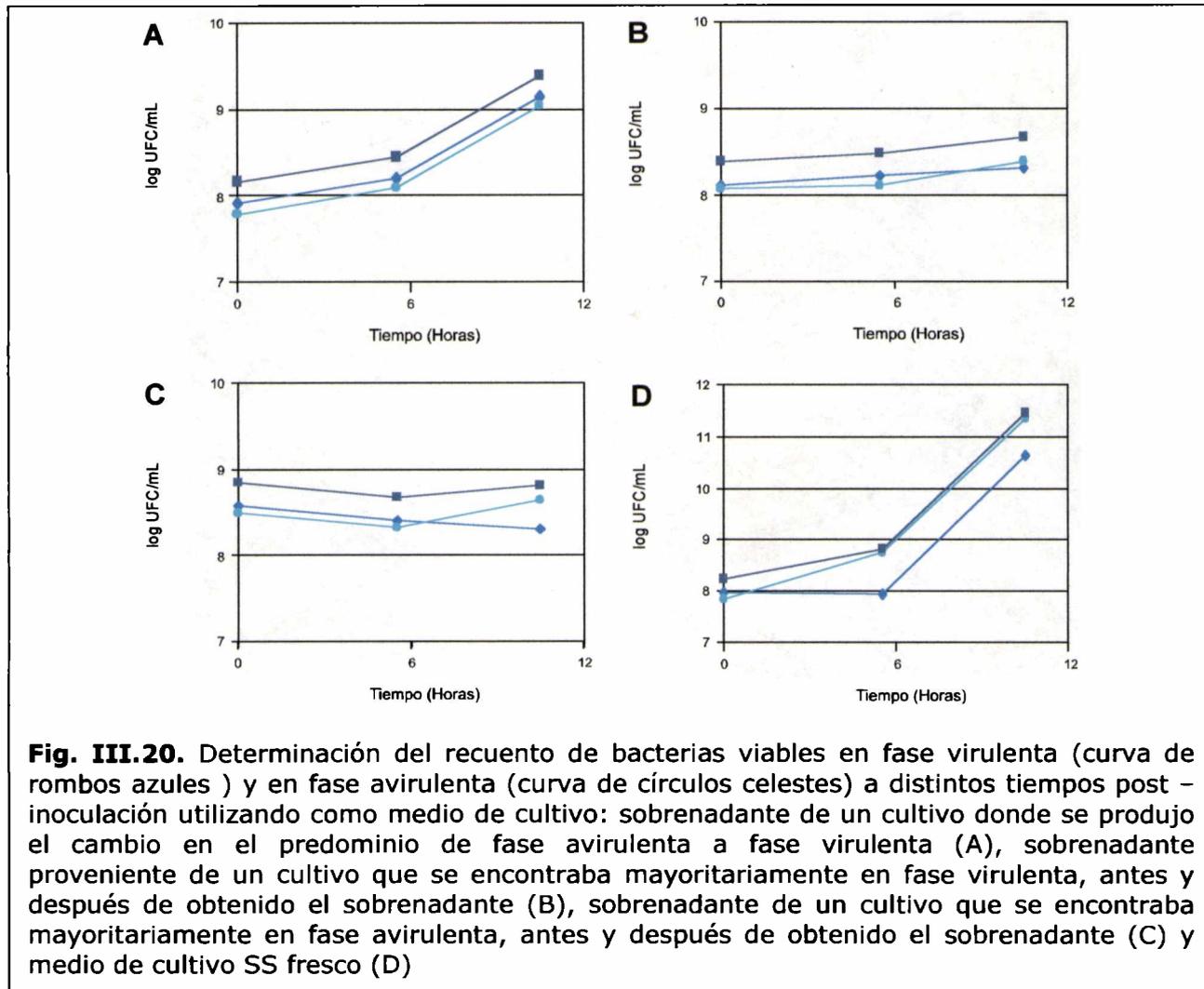
Estos datos sugieren que existe alguna señal que permite al menos el mantenimiento de la fase virulenta. Para tratar de determinar si la señal presente en los sobrenadantes de cultivo es de naturaleza proteica y de un tamaño particular, realizamos un ensayo preliminar con los siguientes tratamientos sobrenadante **A** utilizado en el ensayo anterior:

- tratamiento con proteinasa durante 30 minutos a 37° C
- filtrado por membrana de corte 30 kDa y ensayo sobre la solución filtrada

Luego de realizar estos tratamientos, los sobrenadantes fueron evaluados nuevamente en su capacidad para inducir un cambio de fase en un inóculo fresco de *B. bronchiseptica*. El inóculo utilizado contenía sólo un 10 % de las bacterias viables en fase avirulenta, en lugar del 50% esperado por nosotros. Sin embargo, fue posible observar diferencias en el comportamiento de los distintos cultivos. Como controles se utilizó el sobrenadante sin tratamiento y medio de cultivo SS fresco. En los mismos pudimos observar que la fase virulenta lograba mantener su proporción solamente en el sobrenadante sin tratamiento. Es decir, tanto el tratamiento con proteinasa como el filtrado con la membrana de corte de 30 kDa parecen haber eliminado a la señal inductora. Estos resultados, si bien son preliminares, indicarían la presencia de una



señal de naturaleza proteica de un tamaño mayor a 30 kDa que se produce durante el cultivo.



## Discusión

Como hemos descrito en la introducción de este Capítulo, *Bordetella bronchiseptica*, a diferencia del resto de las especies del género causantes de patologías en humanos, es capaz de sobrevivir en ambientes naturales en condiciones de escasez de nutrientes (334) y suelo (295). Esta característica resulta de interés desde el punto de vista epidemiológico, ya que en esas condiciones el patógeno podría diseminarse ampliamente entre la población susceptible, ya sea animales domesticados o de granja e incluso el hombre. Si bien en varios trabajos se reporta que *B. bronchiseptica* puede sobrevivir incluso hasta 6 meses en buffer fosfato (PBS), la hipótesis sobre la mayor adaptabilidad de la fase avirulenta a dichas condiciones cuenta con pocos resultados que la apoyen (334). Sólo Cotter y Miller en 1994 observaron que en PBS la fase avirulenta era la única capaz de sobrevivir hasta el día 8 post inoculación (83). Con el objetivo de analizar la sobrevivencia de *B. bronchiseptica* en distintas fases de virulencia y a tiempos largos de incubación decidimos realizar a escala de laboratorio cultivos en medios líquidos empleando diferentes cepas: una cepa de *B. bronchiseptica* de colección capaz de experimentar en forma reversible el cambio de fase (*Bb9.73*), un mutante defectivo en su capacidad de cambiar de fase, de forma que se encuentra siempre en fase avirulenta (*BbBvgA<sup>-</sup>*), y un mutante defectivo en la expresión de un único factor de avirulencia, la falgelina (*Bbfla<sup>-</sup>*). Con estas cepas realizamos primeramente una serie de ensayos que nos permitieron confirmar que los resultados obtenidos no se debieron a un efecto colateral de la mutación sino a la mutación misma.

Para cada una de las cepas analizamos sobrevivencia en diferentes condiciones nutricionales. Así, para la cepa parental *B. bronchiseptica* CIP 9.73 que contiene el sistema BvgAS de transducción de señales intacto, observamos que tanto en el medio de cultivo sintético de Stainer-Scholte (SS) como en condiciones de escasez de nutrientes utilizando el buffer fosfato salino (PBS) como medio de cultivo, *B. bronchiseptica* persiste durante largos períodos de tiempo (hasta 75 días). Este resultado, que fue independiente del número de bacterias presentes al inicio del cultivo, es llamativo por no haberse agregado en ningún caso nuevos nutrientes. No sólo no se agregaron nuevos nutrientes sino que además ambas condiciones de cultivo carecen de fuente de carbono y de energía: para el cultivo en PBS, la carencia es desde el inicio del cultivo y para el medio SS la fuente de carbono y energía que es el glutamato, se agota a las 40 horas de cultivo (359). Varias hipótesis podrían explicar este comportamiento, entre ellas que la bacteria sintetice en condiciones de desbalance de fuentes de C, N y energía compuestos de reserva que luego sean utilizados en condiciones de escasez, que los componentes liberados de la lisis celular puedan ser utilizados como nutrientes por las bacterias que permanecen viables, o que como en otras bacterias, se dispare la denominada respuesta estricta (*stringent response*). Hasta el presente no se cuenta con datos que avalen una u otra posibilidad. En *Escherichia coli* y otras bacterias Gram negativas la respuesta

determinado el fenómeno de respuesta estricta mediado por el aumento intracelular de dos guaninas polifosfato, guanosina 3'-difosfato, 5'-trifosfato (pppGpp) y guanosina 3',5'-bispirofosfato (ppGpp) (69). Estos nucleótidos son sintetizados por la fosforilación de GDP y GTP por una enzima constituyente del ribosoma denominada Rel A. Cuando existen niveles aceptables de aminoácidos, el ppGpp por medio de una 3' fosforilasa denominada Spo T se convierte en el intermediario normal GDP. El ppGpp tendría un rol regulatorio global actuando a nivel transcripcional, mediante una interacción directa con la ARN polimerasa presumiblemente induciéndole un cambio conformacional de forma de modificar la selectividad de la enzima por los promotores. Así las bacterias frente a la escasez de nutrientes adoptan un estado fisiológico caracterizado por la disminución en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas y el aumento simultáneo de la degradación de proteínas y la síntesis de aminoácidos. En varias bacterias Gram negativas, como *E. coli*, *Salmonella* spp y *Shigella* ppGpp y pppGpp estimula la acumulación de polifosfato inorgánico (Poli P) (226). Este polifosfato inorgánico también participaría en la supervivencia de estas bacterias por largos períodos de tiempo (215,346). A través de ambos compuestos la bacteria se adapta a la situación de estrés y se protege de un crecimiento deficiente.

Estos mecanismos de adaptación a la escasez de nutrientes no han sido hasta el momento explorados en el género *Bordetella*. Sin embargo, en la secuencia completa del genoma de *B. bronchiseptica* recientemente publicado, se encuentran los genes que codifican para las enzimas que participan tanto de la respuesta estricta (RelA y SpoT) como de la síntesis de polifosfato (enzima ppk) (187), por lo tanto es esperable que estos mecanismos y otros aún no descritos jueguen un rol fundamental en la alta supervivencia reportada en *B. bronchiseptica*.

Otro aspecto a destacar es que en todas las condiciones de cultivo ensayadas para la cepa parental, la fase virulenta fue la predominante a tiempos largos de cultivo. Este resultado se obtuvo de manera independiente de la proporción de fases de virulencia presente en el inóculo inicial. Como caso extremo en la proporción de las diferentes fases analizamos cultivos iniciados con el 100% de las bacterias moduladas en fase avirulenta. Incluimos en esta etapa el análisis del comportamiento de un mutante bloqueado en fase avirulenta construido por nosotros y que denominamos *BbBvgA<sup>-</sup>*. Si bien en ambos casos los cultivos se iniciaban con bacterias en fase avirulenta sólo en la primera situación las bacterias conservaban su capacidad de cambiar de fase. Al analizar el número de bacterias viables por mililitro a lo largo de diferentes tiempos, observamos que tanto para la cepa modulable como para la bloqueada, el número de UFC/ml desciende a lo largo del ensayo hasta llegar a no detectarse bacterias viables después de los 20 días post - inoculación. Estos resultados muestran que las bacterias en fase avirulenta no son capaces de sobrevivir en las condiciones de cultivo ensayadas. Además, el hecho de que la cepa modulable no pase a la fase virulenta, que es la más adaptada para sobrevivir, sugiere que para que ello ocurra es necesaria la presencia de esta fase, al menos en una pequeña proporción.

Avanzamos además en el análisis de la influencia de un factor de avirulencia sobre el comportamiento de supervivencia observado en los cultivos. Para ello evaluamos la supervivencia *in vitro* de un mutante defectivo en la expresión de factor de avirulencia flagelina, *Bbfla*<sup>-</sup>. Los resultados obtenidos muestran que al igual que la cepa parental, el mutante defectivo *Bbfla*<sup>-</sup> sobrevive por largos períodos. En relación a la variación de la proporción de fases a lo largo del cultivo, *Bbfla*<sup>-</sup> presenta una menor tendencia a cambiar el predominio de fases que la cepa parental ya que la fase virulenta fue la preponderante en todos los tiempos analizados, durante 30 días de cultivo. Así, para lograr detectar el cambio entre las proporciones de fases en cultivos líquidos de *Bbfla*<sup>-</sup> fue necesario utilizar un inóculo con mayor proporción de bacterias en fase avirulenta (30%) que el utilizado en la cepa parental (10%). Esta diferencia de comportamiento podría deberse por un lado, a que la ausencia del filamento en el aparato flagelar de *Bbfla*<sup>-</sup> podría inducir un cambio a nivel de la membrana bacteriana. Esta alteración a nivel de membrana podría dificultar que el microorganismo sense alguna señal que induzca el cambio de fase. O bien, es posible suponer que el cambio hacia la fase avirulenta se induzca a fin de que el flagelo se exprese. En el caso de *Bbfla*<sup>-</sup> dicho cambio no ocurriría ya que no es capaz de expresar el flagelo.

El comportamiento observado en nuestros ensayos resulta sorprendente ya que la fase avirulenta era considerada la más apta para persistir en condiciones de escasez de nutrientes. Cotter y Miller (1994) obtuvieron dicho resultado en cultivos en PBS de *Bordetella bronchiseptica* en los cuales la cepa parental era incapaz de persistir más de 2 o 3 días post-inoculación y un mutante bloqueado en la fase avirulenta de la bacteria lograba sobrevivir los ocho días del ensayo (83,84). Sin embargo, estos autores no analizaron la persistencia más allá del octavo día post - inoculación. Ha sido reportado que *B. bronchiseptica* es capaz de persistir en PBS y en agua proveniente de lagos naturales al menos durante seis meses, con valores elevados de bacterias viables ( $10^6$  UFC/ml) (334). Sin embargo, en el citado trabajo no se hace referencia a cuál es la fase de virulencia que recuperaron luego del prolongado cultivo. Nuestros ensayos han permitido avanzar en el conocimiento de este aspecto pues analizamos el estado de virulencia de las bacterias en períodos largos de sobrevivencia en condiciones de escasez de nutrientes.

Con el objetivo de comenzar a indagar en los posibles mecanismos involucrados en la persistencia de *B. bronchiseptica*, decidimos focalizar nuestros estudios en los cambios en el predominio de las fases virulenta y avirulenta observados en el transcurso de los cultivos antes descritos. Nuestro interés se centró particularmente en estudiar el cambio desde la fase avirulenta hacia la fase virulenta, dado que es la fase que persiste por largos períodos de tiempo. El fenómeno reversible de cambio de fase experimentado por *Bordetella* es inducido por señales externas sensadas por el sistema de dos componentes BvgAS. Por lo tanto planteamos la posibilidad de que también existiera alguna señal en el medio extracelular que participe en el cambio entre la proporción de fases observado a lo largo de los cultivos. Así, obtuvimos sobrenadantes de cultivos que a las 24 horas cambiaban de un predominio de fase

avirulenta a uno de fase virulenta. Es decir, de existir alguna señal ésta induciría el cambio de predominio de la fase avirulenta hacia la fase virulenta. Para analizar este aspecto, el sobrenadante así obtenido libre de células fue inoculado con una suspensión bacteriana que contenía 50% de las bacterias en cada una de las fases de virulencia. Como se observa en la figura III.18 al cabo de 10 horas el cultivo mantiene la proporción de fases inoculadas. El mismo resultado se obtuvo al utilizar el sobrenadante de un cultivo que presentaba la mayoría de sus bacterias en fase virulenta, antes y después de obtenido el sobrenadante. Al utilizar este mismo inóculo para iniciar un cultivo en medio SS fresco o al sobrenadante de un cultivo que se encontraba mayoritariamente en fase avirulenta, la proporción inicial de fases no se mantuvo y, por el contrario, la fase avirulenta pasó a ser la mayoritaria. Estos resultados indicarían que efectivamente existe una señal en el sobrenadante de los cultivos que induce la presencia de la fase virulenta en el cultivo. Esta señal podría estar mediada por un fenómeno de *quorum sensing*, de forma que un determinado número de bacterias induzca una mayor persistencia de la fase virulenta, o un cambio desde fase avirulenta a virulenta. Este comportamiento derivaría en que la población bacteriana se encuentre mayoritariamente en fase virulenta, y de esta forma logre persistir por largos períodos de tiempo.

Todos los resultados hasta aquí obtenidos muestran claramente a la fase virulenta como la más adecuada para sobrevivir por largos períodos en condiciones de estrés nutricional. En concordancia con este dato, los ensayos realizados partiendo de bacterias en fase avirulenta mostraron que las bacterias en dicha fase mueren luego de los 20 días de la inoculación. Más aún, la falta de un único factor de avirulencia no afecta la sobrevivencia de la cepa parental. En relación a los cambios de predominio de fases a lo largo de cultivo, el mismo parece responder a la presencia de señales de naturaleza proteica sintetizadas cuando se alcanza cierto nivel poblacional de bacterias en una fase particular.

**Un factor denominado de  
avirulencia en la interacción  
*Bordetella bronchiseptica* –  
hospedador**

**Capítulo IV**

## INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior, con la realización de los estudios *in vitro*, hemos podido determinar que *B. bronchiseptica* es capaz de sobrevivir en condiciones de escasez de nutrientes por largos períodos en fase virulenta. Este resultado, sorprendente por alejarse de la hipótesis más aceptada sobre mostrar a la fase avirulenta como la más capacitada para sobrevivir, se vio apoyado por los resultados obtenidos en los ensayos empleando a mutantes bloqueados en fase avirulenta, que mostraron justamente lo contrario a dicha hipótesis. Más aún, pudimos observar que la falta de un factor de avirulencia no modifica en ningún aspecto la capacidad de persistir de *B. bronchiseptica*. Sin embargo como hemos descrito, todos estos datos corresponden a ensayos *in vitro* que no pueden generalizarse a lo que ocurre *in vivo*. Es por ello que en esta etapa de nuestro trabajo abordamos este aspecto focalizándonos fundamentalmente en el estudio del rol que juegan los **factores de avirulencia** en el ciclo de *B. bronchiseptica* y en particular en la persistencia de este patógeno en el hospedador. En particular analizamos el comportamiento de bacterias defectivas en la expresión de un marcador de avirulencia específico. Elegimos para estos estudios a la flagelina por ser parte un componente bacteriano, el flagelo, que en diversos patógenos juega un rol esencial en la interacción de la bacteria con el hospedador (198,207,245,292,384,402,434,448). Además es una proteína fácilmente detectable por técnicas sencillas de laboratorio, bien caracterizada, cuya síntesis y función se conocen muy bien. La construcción de este mutante al que denominamos *Bbfla*<sup>-</sup> fue realizada por nosotros y los pasos seguidos para su obtención se describieron con detalle en el capítulo anterior.

A continuación y para facilitar la comprensión de los resultados que presentaré en este capítulo haré un breve resumen del conocimiento general de los diferentes componentes del flagelo y de su síntesis para luego abordar el estado del conocimiento de este componente en *B. bronchiseptica* en particular.

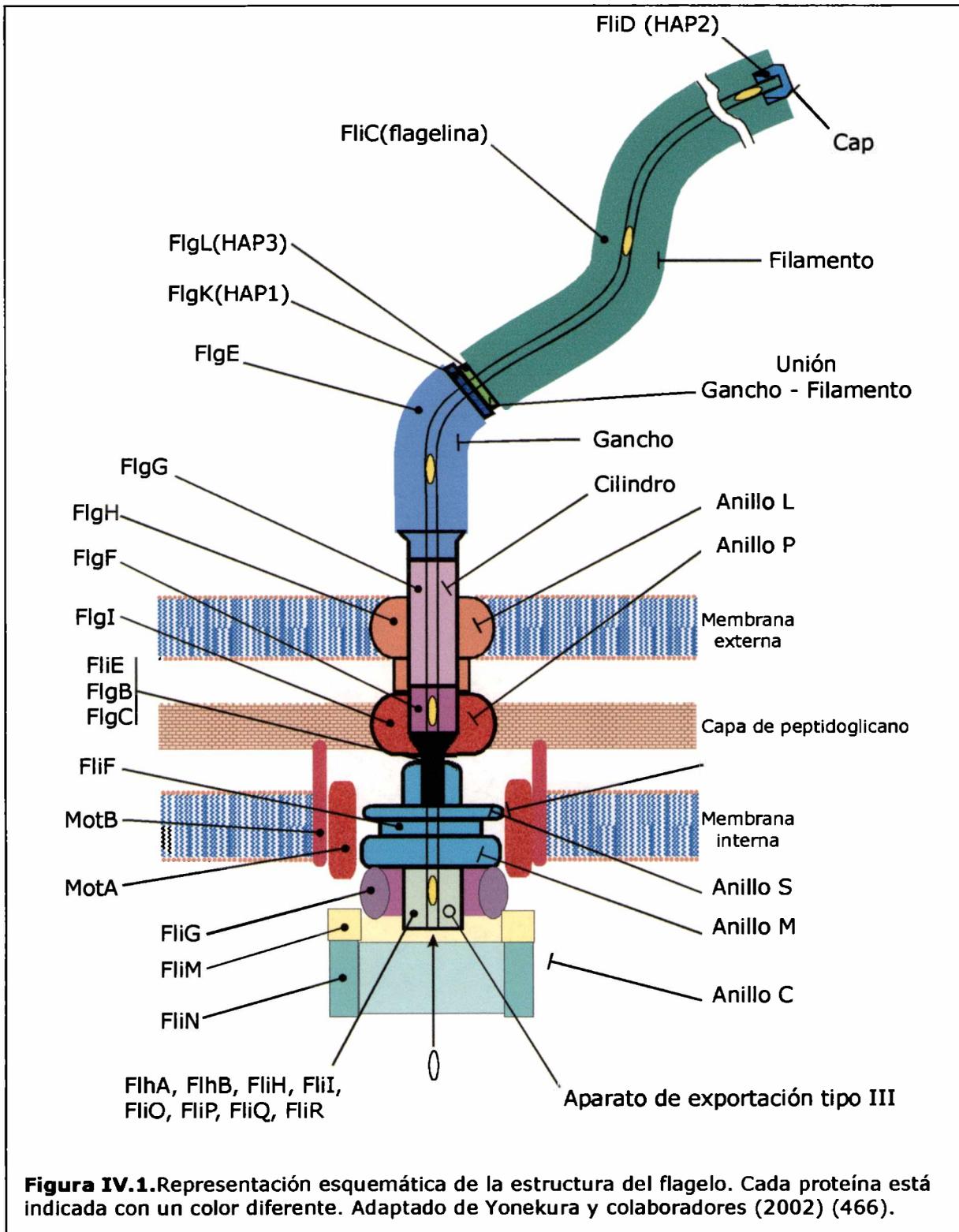
### Flagelo: estructura

El flagelo de las bacterias es una estructura proteica compleja que está ampliamente distribuido entre las distintas especies de bacterias (más del 80% de las especies bacterianas conocidas presentan esta organela, incluyendo varias *Archea* flageladas). Estas estructuras, cuyo número varía típicamente entre 5 a 10 por célula, pueden disponerse en forma azarosa sobre la superficie de la bacteria y en ese caso se llaman flagelos peritricos o pueden ser polares (simples o múltiples). Algunas especies, como *Vibrio parahaemolyticus* y *Azospirillum brasilense* presentan una flagelación mixta en la misma célula (404).

Entre los sistemas flagelares mejor descritos para las bacterias Gram negativas se encuentran los de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, que a su vez presentan una alta homología entre sí (259). La descripción de la estructura del flagelo que

presento a continuación corresponde al de estas especies, que han sido tomadas como modelos.

El flagelo consiste de tres componentes principales que se han denominado: el cuerpo basal, el codo o gancho y el filamento (Fig. IV.1). El filamento y el codo son



**Figura IV.1.** Representación esquemática de la estructura del flagelo. Cada proteína está indicada con un color diferente. Adaptado de Yonekura y colaboradores (2002) (466).

extracelulares y el cuerpo basal se encuentra inmerso en la membrana celular.

El **cuerpo basal** es una estructura compleja formada por un cilindro y dos pares de anillos: uno exterior y otro interior (Fig. IV.1). Los dos anillos exteriores se denominan L y P. El anillo L debe su nombre a que se encuentra en la membrana externa, compuesta principalmente por lipopolisacárido, y está constituido por la proteína FlgH. El anillo P se halla inmerso en la membrana bacteriana formada por peptidoglicano (de allí su designación) y está formado por la proteína FlgI. Los dos anillos interiores se denominan S y M. El anillo S está en el espacio periplásmico, inmediatamente por encima de la membrana plasmática y el M está inmerso en dicha membrana, de hecho ambos anillos son dominios de una misma proteína (FliF) y por ello se lo denomina actualmente anillo MS. El cilindro del cuerpo basal está formado por cinco proteínas (FlgB, FlgC, FlgF, FlgG y FlgJ) y atraviesa el interior de este conjunto de anillos, conectándolos entre sí. La proteína FlgJ ha sido propuesta como "tapa" del cilindro y también posee una actividad muramidasa que disolvería la membrana de peptidoglicano, permitiendo de esta forma el ensamblaje del cilindro y su pasaje hacia el espacio periplásmico. De esta manera el cilindro queda unido por su porción terminal al anillo MS y por su extremo distal con el codo del flagelo.

El cuerpo basal es considerado una estructura pasiva del flagelo que actúa de soporte de las proteínas implicadas en el mecanismo de rotación. El flagelo puede rotar gracias a la presencia de un motor reversible que obtiene su energía a través de fuerza protomotriz. Este motor está formado por las proteínas FliG, FliM y FliN y se encuentra por debajo del anillo MS. Estas proteínas configuran un quinto anillo (anillo C) que se encuentra del lado citoplasmático, conectadas al anillo MS (130). Asimismo existen dos proteínas rodeando al cuerpo basal, a modo de empalizada cilíndrica: MotA y MotB. El extremo C-terminal de MotB se encontraría anclado a la membrana a través de un dominio de unión a peptidoglicano y las cuatro hélices hidrofóbicas de MotA interaccionarían con la región N-terminal de MotB para formar un canal que permite el pasaje de protones a través de la membrana plasmática. De esta manera se forma el complejo de soporte del motor con composición  $MotA_4MotB_2$ , de los cuales hay al menos ocho en cada flagelo (40).

El **codo** es una estructura corta, curvada y hueca que conecta el cuerpo basal con el filamento. Está formado por subunidades de la proteína FlgE, que se disponen en forma de hélice generando un canal interior circunscripto por 11 subunidades. De esta forma existen 11 fibrillas dispuestas en forma casi perpendicular al eje del codo, de manera que se genera macroscópicamente una forma de hélice en toda la estructura. Distintos cambios fisiológicos, como pH o fuerza iónica, permiten que se formen una variedad de hélices diferentes en las que se modifica la distancia entre las distintas subunidades, dando lugar a estructuras polimórficas. La forma curvada característica del codo se debe a que su corta longitud determina que se forme menos de media vuelta de hélice.

En el extremo distal del codo se encuentran las proteínas FlgK y FlgL que regulan la longitud de esta estructura y conectan el codo con el filamento flagelar. Estas

proteínas participarían en la transmisión del torque al filamento durante el movimiento del flagelo (119).

El **filamento** está conectado a la célula a través del codo, y está estructuralmente relacionado con el mismo, pero está formado por subunidades de otra proteína, la flagelina. La secuencia de la flagelina puede dividirse en tres regiones: los dominios N- y C- terminales y la región central. Los dominios N- y C- terminales son los responsables de la interacción entre las distintas subunidades de flagelina y de su polimerización. El dominio central es el más inmunogénico y además en *S. typhimurium* es metilado post-transcripcionalmente por la proteína FliB. Hasta el momento no se conoce la función de esta metilación, ya que los mutantes defectivos en FliB producen flagelos funcionales.

En el extremo distal del filamento se encuentra la proteína FliD, que actúa como "tapa" del mismo (ver más abajo).

El filamento comparte con el codo la capacidad de presentar polimorfismos que le permiten a la bacteria moverse de diversas formas. La explicación de este polimorfismo es similar a la descrita para el codo, las subunidades de flagelina se disponen también en 11 fibrillas generando la forma de hélice en toda la estructura. Dependiendo de la distancia relativa entre las subunidades de flagelina en un mismo filamento se generan las distintas variantes del filamento. Hasta el momento se han descrito 9 variantes del filamento que incluyen 2 formas derechas y diversas formas con giro hacia la derecha y con giro hacia la izquierda a las cuales se las ha clasificado como "normal", "rizado", "enrollado", etc. La forma normal es la más estable en condiciones fisiológicas, tiene giro hacia la izquierda y la variante utilizada para el movimiento de propulsión. La interconversión entre las distintas variantes puede ocurrir como respuesta a distintas señales e incluso mediante fuerzas mecánicas. Este último caso es muy importante en el movimiento caótico del microorganismo ya que le permite reorientarse y cambiar de dirección (259).

### **Biosíntesis de los diferentes componentes del flagelo. Regulación.**

La formación del flagelo en *E. coli* y *S. typhimurium* implica la participación de casi 50 genes, que se encuentran distribuidos en 15 y 17 operones respectivamente (404). La expresión de estos genes está organizada en una cascada regulatoria jerárquica de tres niveles o clases. El operón Clase I u Operón Maestro se encuentra en lo más alto de la jerarquía flagelar y consta de dos genes, *flhC* y *flhD*, ambos necesarios para la expresión de todos los genes del regulón flagelar. Las proteínas FlhC y FlhD son activadores transcripcionales del resto de los operones. Si bien se desconoce el mecanismo molecular que determina la expresión del operón maestro, en *E. coli* es activado por AMP cíclico, a través de la unión de una proteína activada por catabolito (CAP) a una región específica del promotor y una interacción directa del complejo AMPc-CAP con la ARN polimerasa. Los operones Clase II incluyen la mayor parte de los genes de proteínas estructurales del cuerpo basal (las familias de proteínas Fli y Flg, entre otras), y el gen *fliA*, que codifica para un factor sigma alternativo ( $\sigma^{28}$ ).

La expresión de los operones Clase III son regulados positivamente por FliA ( $\sigma^{28}$ ) y en forma negativa por un factor anti- $\sigma^{28}$ , FlgM. Los genes de Clase III incluyen los genes que codifican el mencionado factor anti- $\sigma^{28}$  (FlgM), las proteínas que participan de la quimiotaxis, del motor flagelar, y proteínas estructurales de codo y el flagelo, como las proteínas FliD, FlgK, y la flagelina (FliC).

El operón que codifica para la proteína FliD del filamento está bajo el control de los promotores Clase II y Clase III.

Tabla IV.1: Genes involucrados en la biosíntesis del sistema flagelar de *E. coli* y *S. typhimurium*.

Gen	Función del producto o estructura	Gen	Función del producto o estructura
<i>flgN</i>	Chaperona del sistema de secreción	<i>motA</i>	Rotación del motor
<i>flgM</i>	Anti- factor $\sigma^{28}$	<i>motB</i>	Rotación del motor
<i>flgA</i>	Ensamblaje del anillo P	<i>FlhC</i>	Regulador positivo de la expresión génica
<i>flgB</i>	Cilindro del cuerpo basal	<i>FlhD</i>	Regulador positivo de la expresión génica
<i>flgC</i>	Cilindro del cuerpo basal	<i>fliA</i>	Factor $\sigma^{28}$ para expresión de genes Clase III
<i>flgD</i>	Tapa del codo	<i>fliBs</i>	Metilación de la flagelina
<i>flgE</i>	Codo	<i>fliC</i>	Flagelina
<i>flgF</i>	Cilindro del cuerpo basal	<i>fliD</i>	Tapa del filamento
<i>flgG</i>	Cilindro del cuerpo basal	<i>fliS</i>	Chaperona del sistema de secreción que participa en la elongación del filamento.
<i>flgH</i>	Anillo L del cuerpo basal	<i>fliT</i>	Chaperona del sistema de secreción
<i>flgI</i>	Anillo P del cuerpo basal	<i>fliE</i>	Secreción hasta el espacio periplásmico
<i>flgJ</i>	Supuesta tapa del cilindro del cuerpo basal y muramidasa	<i>fliF</i>	Anillo MS del cuerpo basal
<i>flgK</i>	Adaptador entre el codo y el filamento	<i>fliG</i>	Regulador del motor
<i>flgL</i>	Adaptador entre el codo y el filamento	<i>fliH</i>	Inhibidor de FliI
<i>flhE</i>	desconocido	<i>fliI</i>	ATPasa del sistema de secreción
<i>flhA</i>	Sistema de secreción	<i>fliJ</i>	Sistema de secreción
<i>flhB</i>	Sistema de secreción	<i>fliK</i>	Control del largo del codo
<i>cheZ</i>	Fosfatasa de CheY	<i>fliL</i>	Proteína asociada al cuerpo basal
<i>cheY</i>	Regulador del sentido de giro	<i>fliM</i>	Regulador del motor
<i>cheB</i>	Enzima del quimiorreceptor	<i>fliN</i>	Regulador del motor
<i>cheR</i>	Enzima del quimiorreceptor	<i>FliO</i>	Sistema de secreción
<i>tapE</i>	Quimiorreceptor	<i>FliP</i>	Sistema de secreción
<i>tar</i>	Quimiorreceptor	<i>FliQ</i>	Sistema de secreción
		<i>FliR</i>	Sistema de secreción

Adaptado de Macnab, R. M. 1996. Flagella and motility, p. 123-145. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.



**Ensamblaje del flagelo.**

El ensamblaje del flagelo, a diferencia de otros filamentos bacterianos como las fimbrias, ocurre desde dentro hacia afuera, comenzando por el cuerpo basal, avanzando hacia el codo y finalmente hasta el filamento (119). Esta forma de ensamblaje requiere de un proceso ordenado y secuencial que puede ser explicado en parte teniendo en cuenta el control transcripcional secuencial descrito en la sección anterior.

La estructura que primero se forma es el anillo MS, para ello subunidades de la proteína FliF se autoensamblan. Luego del ensamblaje del anillo MS, se incorporan la proteínas FliG, FliM y FliN, formando el anillo C. La formación del cilindro del cuerpo basal depende del correcto ensamblaje de estos dos anillos (MS y C). Sin embargo, el mecanismo mediante el cual la célula selecciona el número y la ubicación de estos anillos es desconocido. Las proteínas de los anillos externos P y L se sintetizan como precursores provistos de péptidos señal en sus extremos N-terminales, que son escindidos al atravesar la membrana plasmática. De esta manera queda formada una estructura con geometría de hueco central a través del cual son secretados el resto de los componentes del sistema. El cilindro del cuerpo basal, que conecta los anillos MS y C formados en primer lugar, es ensamblado a continuación por mecanismos no del todo comprendidos. El codo y el filamento tienen un crecimiento distal, es decir que las subunidades de las proteínas que los forman pasan por el interior del cilindro, del codo y / o del filamento, dependiendo del grado de avance que tenga la estructura, hasta llegar al extremo en crecimiento. Primero se forma el codo, por polimerización de la proteína FlgE. Durante esta adición se encuentra permanentemente en el extremo del codo la proteína FlgD, que actúa como "tapa" durante el ensamblaje. Sin embargo, FlgD tiene una función temporaria, ya que luego es reemplazada por las proteínas de unión entre el codo y el filamento, FlgK y FlgL (466). A continuación debe ensamblarse el filamento del flagelo. Para ello se posiciona en el extremo la tapa del filamento, FliD, que controla el correcto ensamblaje de las subunidades de flagelina, evitando que escapen al exterior. Las subunidades de flagelina recorren una gran distancia a través del hueco central formado, que tiene aproximadamente 3 nm de espesor y entre 10 y 15  $\mu\text{m}$  de longitud, hasta llegar al extremo en crecimiento, donde son ensambladas formando una hélice simétrica para formar el filamento que le da propulsión a la bacteria.

Cada una de las estructuras tubulares del flagelo (cilindro del cuerpo basal, codo y filamento) tienen una longitud definida, esencial para la funcionalidad de la estructura global. En el caso del codo esto se logra mediante la proteína FliK que controla la longitud de la estructura interaccionando en forma directa o indirecta con una proteína del sistema de secreción flagelar (FlhB) (458). La longitud del filamento flagelar, en cambio, estaría regulada por un mecanismo dependiente de la cantidad de flagelina sintetizada por la bacteria.

### **Funcionalidad del flagelo. Control de la movilidad**

Las bacterias controlan el movimiento de sus flagelos de manera que pueden nadar hacia ambientes que le sean favorables para sobrevivir. En la mayoría de las especies el motor del flagelo puede rotar en sentido de las agujas del reloj o en el sentido inverso, y las células dirigen sus movimientos mediante un interruptor que regula el cambio de dirección. En *E. coli* y *Salmonella* el giro del flagelo en sentido contrario a las agujas del reloj le permite a las bacterias unir todos sus filamentos flagelares en un manojo, permitiendo la propulsión (nados). Cuando el giro del flagelo es en el sentido inverso este manojo se desarma y ocurren movimientos caóticos (264). En un ambiente isotrópico, el motor flagelar cambia de dirección alternadamente y la trayectoria resultante es de movimientos al azar en las tres dimensiones. Esto lo logra mediante nados y cortos períodos de movimientos caóticos. En presencia de un gradiente de un atrayente o repelente químico o físico tales como serina, maltosa, aspartato, ribosa, galactosa, glucosa y dipéptidos, cambios de pH y de temperatura, los nados se hacen más prolongados, en una u otra dirección. La forma de detectar estos cambios ambientales sería a través de receptores transmembrana, que se comunican con el sistema flagelar a través de una serie de fosforilaciones y metilaciones (4). En este mecanismo se encuentran involucradas las proteínas Che del sistema flagelar (ver tabla IV.1), de las cuales la proteína CheY fosforilada interacciona finalmente con FliM, en el interruptor del motor del flagelo y modifica la dirección de rotación (264).

La fuerza impulsora del movimiento del flagelo es la fuerza protomotriz, generada por el pasaje de protones a través de la membrana plasmática. Esta fuerza hace girar a una parte del cuerpo basal por mecanismos aún no determinados. Este giro se comunica probablemente al cilindro central a través de la interacción de FliG con MotA (proteínas que forman el motor), que lo transmite al codo y al filamento, lográndose de esta manera el movimiento global del flagelo y, por lo tanto de la bacteria. La interacción de FliM (que forma parte del interruptor del motor) con FliG sería la forma de transmitir el cambio de dirección a todo el flagelo a través de su interacción con FliF, la proteína que forma el anillo MS (40).

### **Flagelo como sistema de secreción. Similitud del sistema flagelar con el sistema de secreción tipo III**

Como describimos más arriba, el ensamblaje del flagelo ocurre a través de una serie de mecanismos secuenciales que derivan en la formación completa de este apéndice celular. Durante este ensamblaje las proteínas que forman el codo y el filamento son exportadas a través de un canal formado en el interior del cuerpo basal del flagelo. En la secreción de estas proteínas participan dos complejos proteicos, uno se encuentra en la base del flagelo, inmerso en la membrana plasmática, y está formado por seis proteínas (FliO, FliP, FliQ, FliR y los dominios transmembrana de FliA y FliB) y otro complejo formado por al menos tres proteínas (FliH, FliI y FliJ) que se encuentra soluble en el citoplasma. El complejo asociado a la membrana se

encontraría en un poro central del anillo MS, con las proteínas FliP y FliR asociadas al cuerpo basal (294). El complejo soluble interacciona con la proteína a ser secretada y luego con el complejo de membrana; de esta manera la proteína es exportada en un proceso dependiente de ATP mediado por la ATPasa FliI (131).

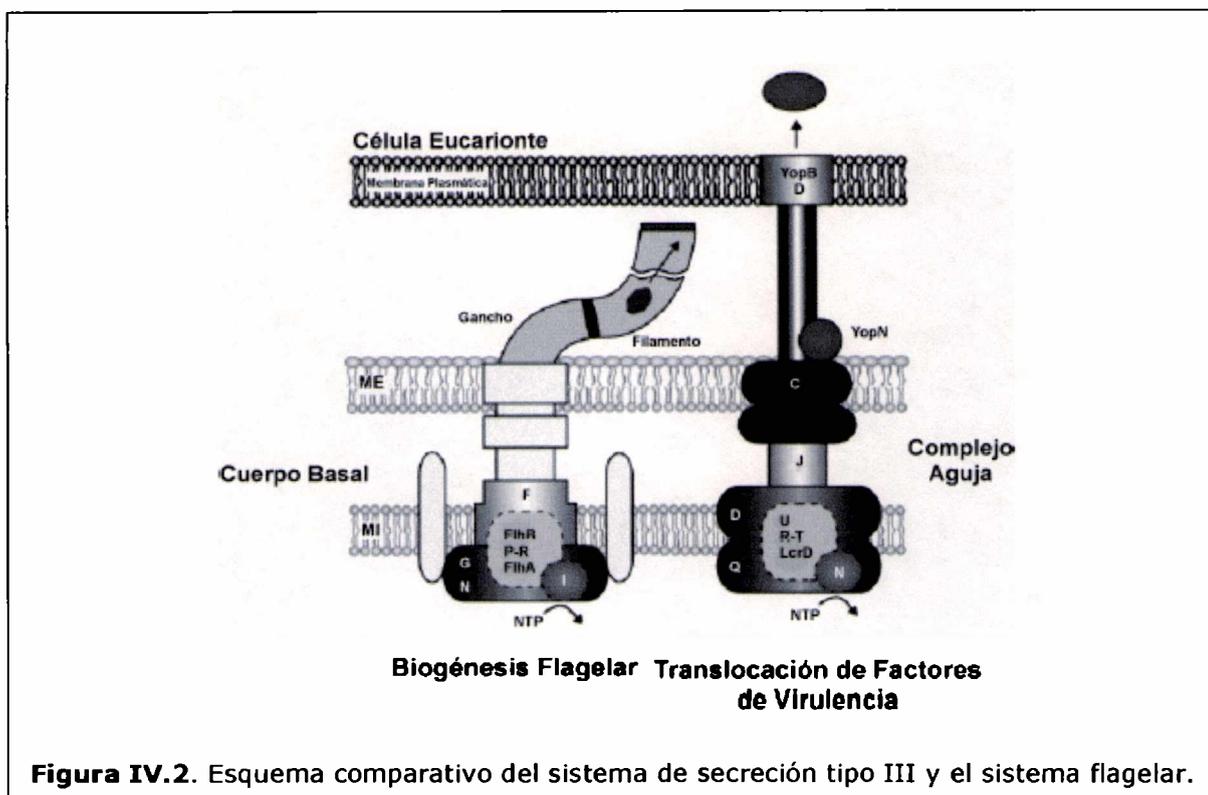
Esta forma de exportación de las proteínas e incluso la estructura en sí misma del aparato flagelar resulta homóloga al sistema de secreción de proteínas de tipo III utilizado por patógenos de plantas y animales para inyectar proteínas dentro de células eucariotas y / o excretarlas al medio exterior (3,188). El sistema de secreción tipo III tiene dos anillos en la membrana celular y otros dos anillos asociados a la membrana externa bacteriana como los anillos MS, P y L del cuerpo basal del flagelo. Un cilindro une estas estructura (como el cilindro del cuerpo basal) y forma la estructura tipo jeringa antes nombrada, similar al filamento flagelar (119). Además las proteínas secretadas por el sistema de secreción tipo III (involucradas en una variedad de funciones tales como citotoxicidad, hemólisis, proteólisis, fosforilación y desfosforilación de proteínas) son transportadas a través de un túnel que se encuentra en la membrana el cual finaliza en una estructura similar a una jeringa (72,136,333) (Fig. IV.2).

La alta similitud entre estos sistemas no sólo se refleja en su homología de secuencia y estructura (3,8,9,36,332,344). De hecho, en los últimos años se ha encontrado también una similitud funcional, ya que ha sido descrita la secreción de factores de virulencia a través del sistema flagelar de secreción tipo III. Así, en el caso de *Yersinia enterocolitica*, agente causal de gastroenteritis en humanos, se ha reportado que un factor de virulencia responsable de la colonización y de inducir una mayor respuesta inflamatoria durante la infección, la fosfolipasa YlpA, es secretada a través del sistema flagelar (383,467). Más aún, estudios posteriores señalan un control cruzado entre ambos sistemas de secreción en esta bacteria (41). En *Bacillus thuringiensis* se ha descrito que la secreción de los factores de virulencia hemolisina BL y fosfolipasa C con afinidad por fosfatidilcolina se ve disminuída en un mutante defectivo en una proteína del sistema de secreción flagelar (FlhA) (142).

Por otro lado, este mecanismo ha sido sugerido en otras especies bacterianas, como *S. typhimurium* (385) y *Burkholderia cepacia* (423).

Todos estos resultados han llevado a proponer que la secreción de factores de virulencia a través del sistema flagelar de secreción tipo III podría ser un mecanismo general de transporte de proteínas que afecten la interacción patógeno – hospedador.

Las similitudes entre estos dos sistemas de secreción ha llevado incluso a plantear la hipótesis de un origen evolutivo común. Así **a la secreción a través del flagelo** se lo denomina sistema de secreción flagelar tipo III (3,258) (Fig. IV.2).



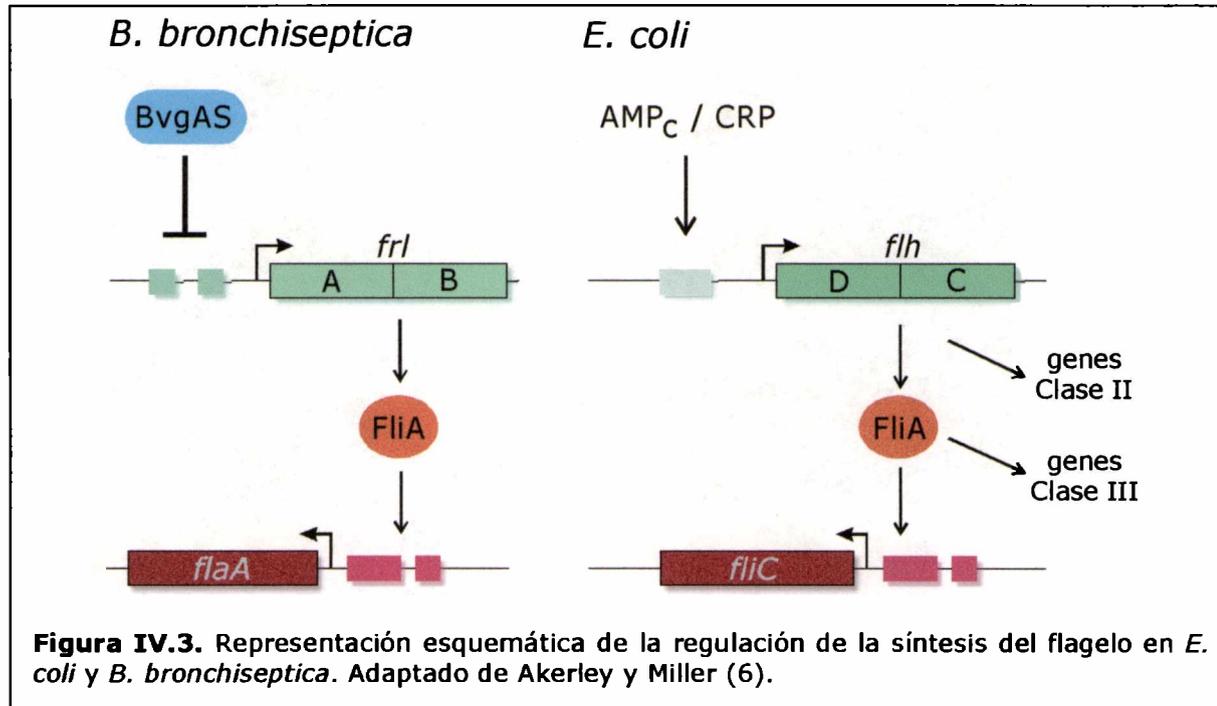
### Flagelo de *B. bronchiseptica*

El flagelo de *B. bronchiseptica* tiene una distribución peritrica alrededor de la superficie bacteriana. Los genes que codifican para los distintos componentes de esta organela presentan una alta homología con los del sistema flagelar identificados para otras bacterias Gram negativas (6). Así es que en la secuencia completa del genoma de *B. bronchiseptica* recientemente terminada hemos podido detectar secuencias homólogas a la de los genes de la clase I, II y III todos involucrados en la biosíntesis del flagelo de otras bacterias Gram negativas (Nuestro laboratorio).

En el caso de la flagelina de *B. bronchiseptica* se ha descrito que los primeros 31 aminoácidos de su secuencia presenta un 80 % de identidad con los correspondientes a *S. typhimurium*, el mismo grado de homología encontrado entre *S. typhimurium* y *E. coli* (7). De hecho, la flagelina de *B. bronchiseptica* es detectada por un anticuerpo monoclonal dirigido contra flagelinas de enterobacterias (7). Más aún, el sitio de iniciación de la transcripción de la flagelina presenta secuencias consenso reconocibles por el factor  $\sigma^{28}$  de *E. coli*.

En cuanto a la síntesis de flagelo en *B. bronchiseptica* la misma ocurriría de manera similar a lo descrito para *E. coli* y *S. typhimurium* pero en este caso además está regulada negativamente por el sistema de dos componentes BvgAS. En la figura IV.3 se describe el modelo de regulación de la síntesis de flagelo en *B. bronchiseptica* haciendo un paralelismo con el de *E. coli*. En este modelo el sistema de transducción de señales BvgAS controlaría negativamente la expresión del operón maestro *frlAB*.

Se ha sugerido que este operón codifica para un activador de los genes flagelares (análogo a *fliA*) ya que es capaz de complementar mutaciones defectivas en el locus *flhDC* de *E. coli* (6).

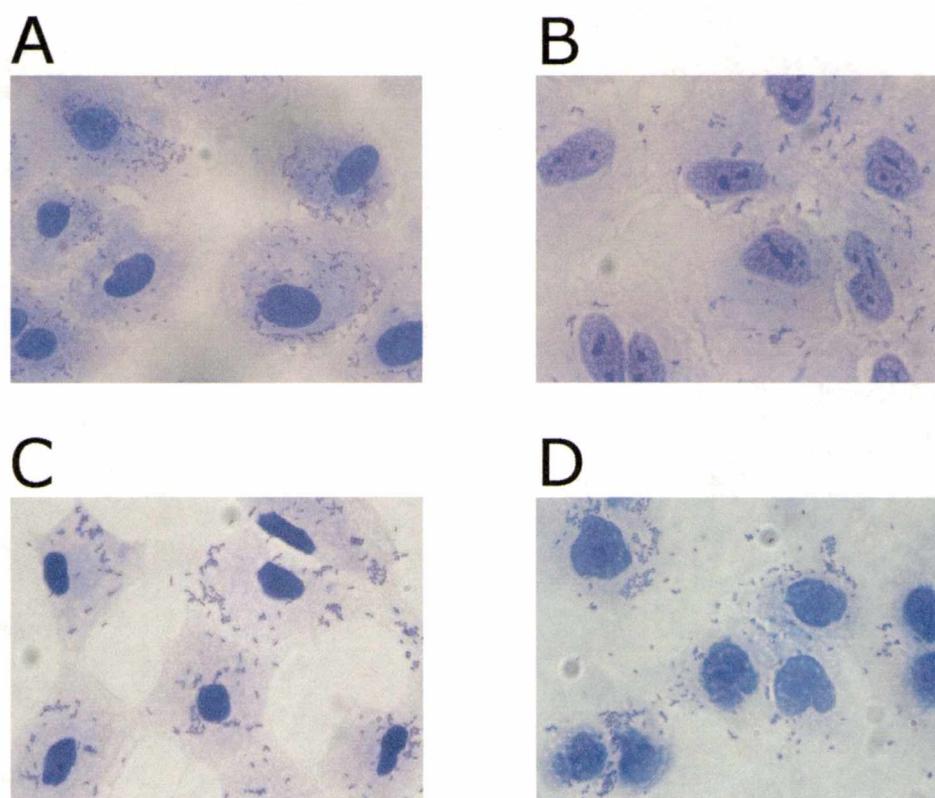


## Resultados

En el capítulo anterior hemos descrito los pasos que hemos seguido en la construcción y caracterización *in vitro* del mutante de *B. bronchiseptica* defectivo en la expresión del factor de avirulencia flagelina (*Bbfla*<sup>-</sup>). En esta sección describiré los ensayos que hemos realizado con el objetivo de analizar el comportamiento de este mutante en la interacción con el hospedador.

### Adhesión de *Bbfla*<sup>-</sup> a células epiteliales en cultivos *in vitro*

Con el fin de evaluar el comportamiento de la cepa *Bbfla*<sup>-</sup> frente a las células con las cuales *B. bronchiseptica* interaccionaría durante un proceso infeccioso, se realizaron ensayos *in vitro* empleando células epiteliales de pulmón humano, A549. Los ensayos se realizaron tanto con bacterias cultivadas en condiciones de virulencia como en condiciones de avirulencia. En todos los casos, se sembraron placas de cultivo



**Figura IV.4.** Adhesión a células epiteliales A549 de la cepa *Bbfla*<sup>-</sup> en fase virulenta (A) o en fase avirulenta (C) y la cepa parental *Bb9.73* en fase virulenta (B) o en fase avirulenta (D) mediante micrografías de contraste de fase con aumento 1000X.

de 24 pocillos con las células epiteliales de pulmón y se permitió el desarrollo de las mismas hasta un 70-80% de confluencia. Sobre ellas se colocaron suspensiones de la cepa parental y del mutante *Bbfla*<sup>-</sup> ya sea en fase virulenta o avirulenta. Para facilitar el contacto entre las células epiteliales y las bacterias la placa multipocillo fue centrifugada. Luego de eliminar las bacterias que no se habían adherido mediante lavados con buffer fosfato, se colorearon los preparados con cristal violeta a fin de observarlos microscópicamente. En la figura IV.4 puede observarse que el número de bacterias adheridas por célula epitelial es similar para ambas cepas cultivadas en condiciones de fase virulenta, siendo de  $42 \pm 8$  bacterias / célula epitelial para *Bbfla*<sup>-</sup> en fase virulenta (A), y de  $39 \pm 10$  bacterias / célula epitelial para la cepa parental en la misma fase (B). Estos ensayos también se realizaron con las cepas moduladas a la fase avirulenta (Fig. IV.4.C y D), y en este caso tampoco se observaron diferencias significativas entre la cepa parental y el mutante defectivo en la expresión de flagelina. El recuento de bacterias adheridas fue de  $70 \pm 16$  bacterias/célula epitelial para *Bbfla*<sup>-</sup> (C) y  $82 \pm 12$  bacterias / célula epitelial para la cepa parental (D). Como puede verse, ambas cepas mostraron un grado más alto de adhesión en fase avirulenta en consonancia con datos previos (59,349).

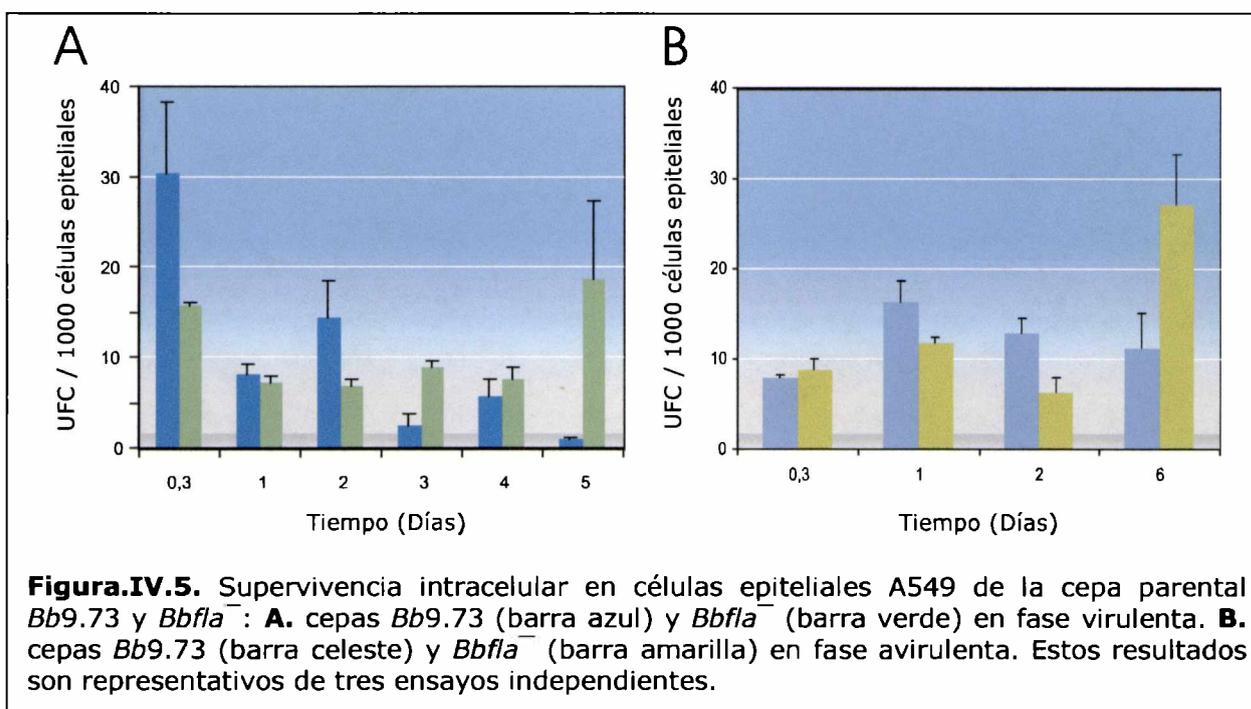
### **Supervivencia de *Bbfla*<sup>-</sup> en células epiteliales en cultivos *in vitro***

Varios autores han reportado la capacidad que presenta *B. bronchiseptica* de persistir intracelularmente (25,163,164,375,381). Para analizar si la falta de la proteína flagelina modifica dicha capacidad evaluamos la sobrevivencia intracelular de *Bbfla*<sup>-</sup> y de la cepa parental en ensayos *in vitro* empleando nuevamente células A549 derivadas del epitelio pulmonar humano.

Luego de permitir el contacto entre ambos tipos de células, se eliminaron las bacterias extracelulares con soluciones de antibióticos. A distintos tiempos se determinó el número de bacterias intracelulares mediante recuento en placas. En la figura IV.5.A se muestran los resultados obtenidos al emplear bacterias cultivadas en condiciones de fase virulenta. En la misma puede apreciarse que ambas cepas son capaces de invadir y sobrevivir dentro las células eucariotas. La cepa parental en fase virulenta lo hace con una tendencia declinante ya que a los 5 días post-invasión se recupera un muy bajo número de bacterias del interior de las células eucariotas. En el caso del mutante defectivo *Bbfla*<sup>-</sup> en fase virulenta sólo se observa una disminución en el número de bacterias recuperadas al primer día post infección, el cual se mantiene por al menos 72 hs para luego incrementarse en forma significativa a los 5 días post infección. Cabe notar que en algunas de las repeticiones de este ensayo el número de bacterias de *Bbfla*<sup>-</sup> que lograron invadir las células eucariotas fue menor

que el de la cepa parental, pero aún en esta condición el número de bacterias *Bbfla*<sup>-</sup> recuperadas del interior de la célula eucariota al día 5 fue significativamente superior al de la cepa parental (18 UFC / 1000 células epiteliales para *Bbfla*<sup>-</sup> y 2 UFC / 1000 células epiteliales para la cepa parental).

Los mismos resultados se obtuvieron en al menos tres ensayos independientes.

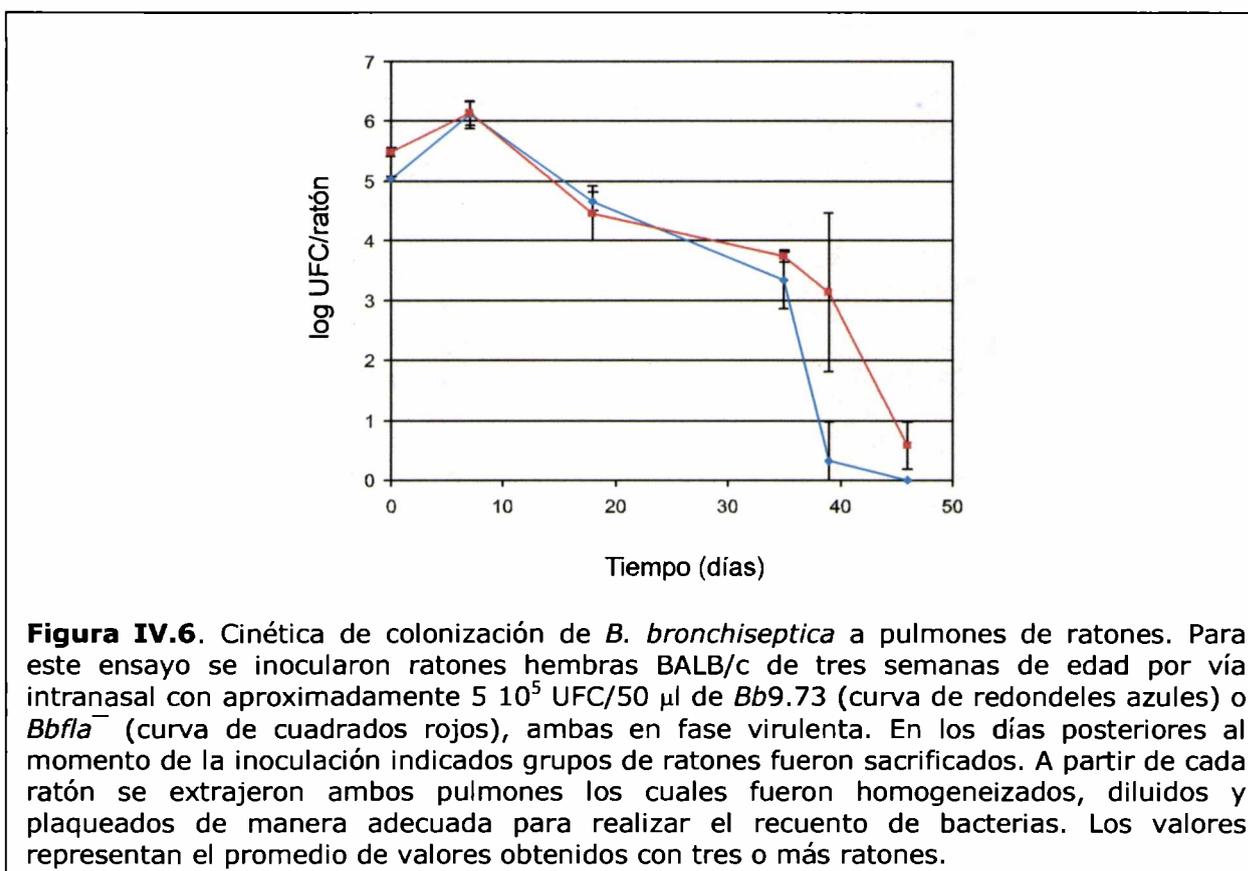


Cuando se realizó el ensayo utilizando las cepas moduladas a fase avirulenta, también se observaron diferencias entre la cepa parental y el mutante defectivo *Bbfla*<sup>-</sup>. Como se observa en la figura IV.5.B, el número de bacterias recuperadas del interior de la célula al día 6 post infección fue mayor para *Bbfla*<sup>-</sup> que para la cepa parental, de manera similar al comportamiento que presenta esta cepa en el ensayo realizado en fase virulenta. Los ensayos de supervivencia no pudieron ser evaluados más allá de los días representados (6 días) debido a que la viabilidad de las células eucariotas decrecía rápidamente una vez transcurrido ese período.

#### **Dosis letal cincuenta y cinética de colonización de *Bbfla*<sup>-</sup> empleando el modelo de infección intranasal de *B. bronchiseptica* en ratones.**

El primer análisis que realizamos en la caracterización *in vivo* del mutante *Bbfla*<sup>-</sup> fue la determinación de la dosis letal cincuenta (DL<sub>50</sub>). Para ello inoculamos a 5 grupos de ocho ratones cada uno, con suspensiones bacterianas de las cepas parental y mutante en concentraciones diferentes. Las concentraciones bacterianas ensayadas

expresadas en UFC/50  $\mu$ l fueron:  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  y  $10^4$ . Los datos obtenidos nos permitieron determinar que la cepa parental y el mutante *Bbfla*<sup>-</sup> presentaron una DL<sub>50</sub> similar con valores de  $1,2 \cdot 10^7$  y  $8 \cdot 10^7$ , respectivamente. Para profundizar el estudio del rol de la flagelina durante el proceso infeccioso, utilizamos el modelo de infección intranasal en ratones. Este modelo de interacción patógeno-hospedador permite evaluar tanto la capacidad de las bacterias de establecer una infección como la de persistir dentro del hospedador. Para estos ensayos se inocularon intranasalmente dos grupos de ratones con dosis sub-letales de suspensiones bacterianas ( $5 \cdot 10^5$  UFC en 50  $\mu$ l de PBS), uno con la cepa parental, utilizada como control positivo de la infección, y un segundo grupo con el mutante *Bbfla*<sup>-</sup>, ambos en fase virulenta. A distintos días post inoculación analizamos el progreso de la infección (Fig. IV.6).

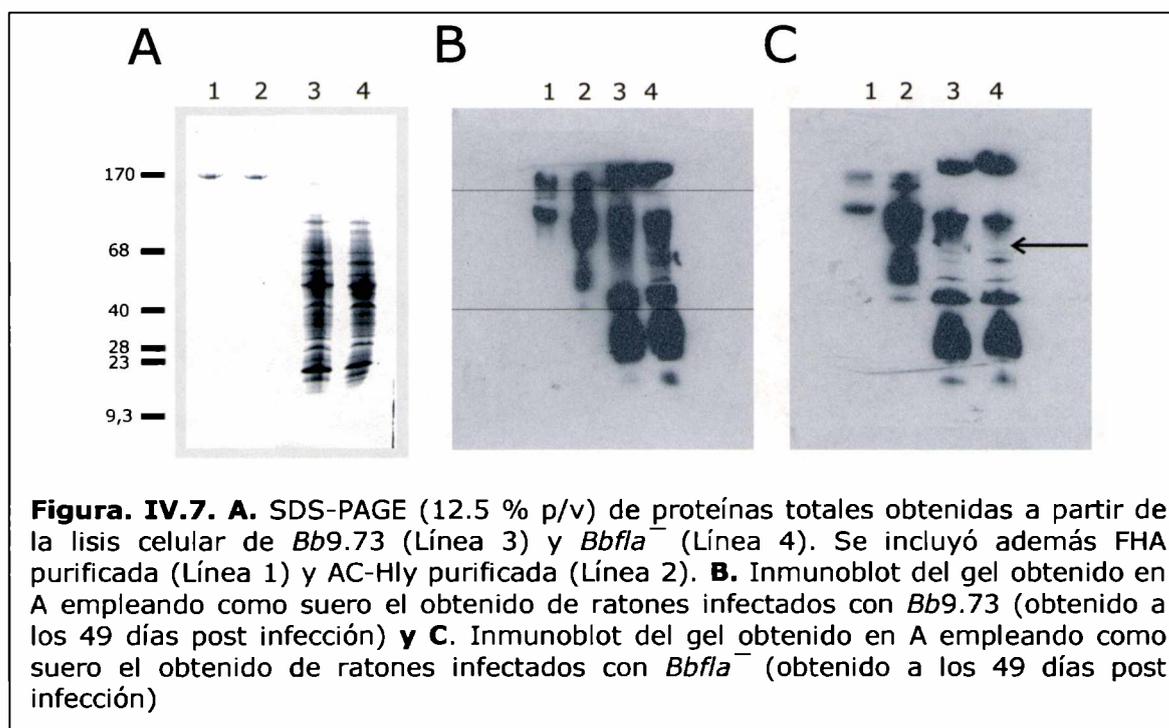


Para ello, a cada tiempo se sacrificaron ratones a los que se les extrajeron ambos pulmones, los cuales fueron homogeneizados y plaqueados en diluciones adecuadas de forma de poder realizar el recuento de colonias. La cepa parental *Bb9.73* presentó el perfil clásico de infección (158) consistente en un aumento en el número de colonias durante los primeros diez días para luego comenzar a descender lentamente, pudiéndose obtener algunas pocas colonias transcurridos 40 días postinfección. En el

caso de la infección con la cepa *Bbfla*<sup>-</sup>, se pudo observar que hasta los 35 días la cinética de colonización es indistinguible respecto a la cepa parental. Sin embargo, a los 39 días se observó una diferencia significativa en el número de bacterias recuperadas de los pulmones: así mientras que para *Bbfla*<sup>-</sup> el número fue mayor a 10<sup>3</sup> UFC, para la cepa parental fue de 10<sup>1</sup> UFC. Más aún, a los 46 días del ensayo fue posible recuperar bacterias viables sólo de los ratones infectados con *Bbfla*<sup>-</sup>. Estos resultados se corroboraron mediante ensayos más sensibles de PCR que permitieron detectar a los 178 días post - infección la presencia de *Bbfla*<sup>-</sup> pero no la de la cepa parental.

#### Análisis de la reactividad de *Bbfla*<sup>-</sup> a sueros obtenidos de animales infectados

Tanto en los ensayos *in vitro* como en los realizados empleando el modelo de infección *in vivo* muestran que el mutante defectivo *Bbfla*<sup>-</sup> persiste por más tiempo en las células del hospedador en comparación a la cepa parental. Con el fin de comenzar a analizar si existe un perfil proteico que permita explicar dicho comportamiento decidimos enfrentar a las proteínas totales de ambos tipos de bacterias a sueros obtenidos de los animales infectados con la cepa parental o con el mutante *Bbfla*<sup>-</sup>. En particular utilizamos sueros obtenidos al día 49 post infección. Como puede observarse en la Figura IV.7 el perfil de las proteínas reconocidas resultó diferente dependiendo de si el suero provenía de ratones infectados con la cepa parental o de ratones infectados con *Bbfla*<sup>-</sup>.



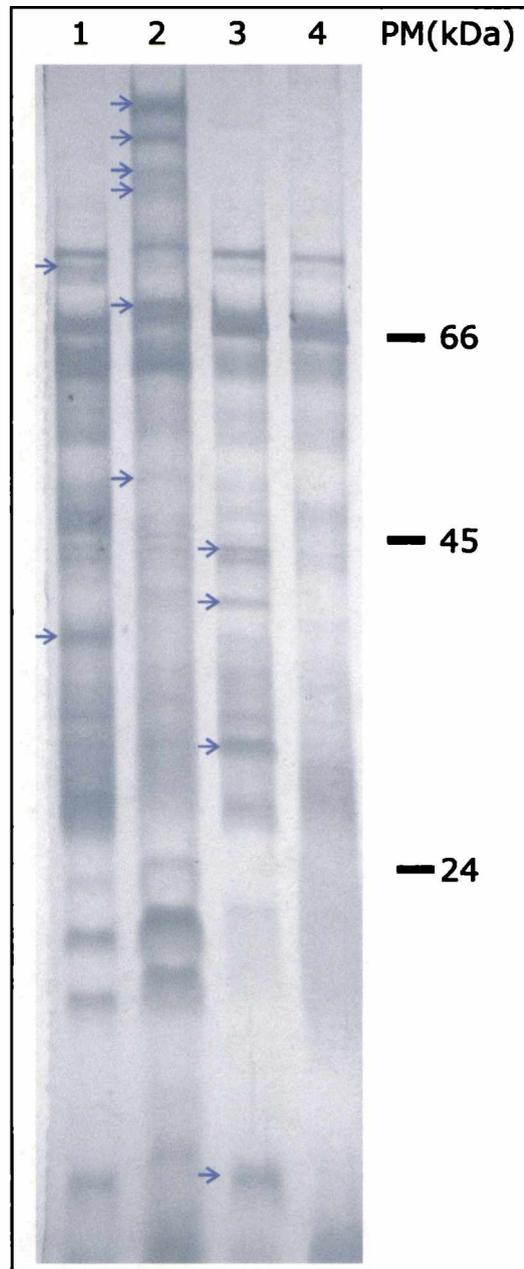
Además, el suero obtenido de ratones infectados con *Bbfla*<sup>-</sup> presentó un perfil de reconocimiento más complejo que el observado cuando se emplea un suero proveniente de animales infectados con la cepa parental. Este suero reconoce en forma diferencial a las proteínas del mutante *Bbfla*<sup>-</sup> respecto a las de la cepa parental, en particular se puede observar al menos una banda de presente sólo en la preparación correspondiente al mutante.

### **Análisis del perfil de secreción de *Bbfla*<sup>-</sup> mediante geles de poliacrilamida**

Considerando trabajos recientes que describen al sistema flagelar como un sistema de secreción tipo III por el cual se secretan diferentes componentes bacterianos (3,142,188,258,417,467), decidimos analizar los sobrenadantes de cultivos de las distintas cepas. Para ello se obtuvieron sobrenadantes de cultivos líquidos en fase logarítmica tardía tanto de la cepa mutante como de la parental mediante centrifugación y posterior filtrado a través de membranas de bajo pegado de proteínas. La ausencia de bacterias en dichos sobrenadantes fue verificada mediante observación al microscopio. Como se puede observar en la figura IV.8 ambas cepas presentaron perfiles proteicos claramente diferentes entre sí, tanto en condiciones de cultivo de fase virulenta como en condiciones de fase avirulenta. En la cepa *Bbfla*<sup>-</sup> en fase virulenta se destacan los polipéptidos de aproximadamente 104, 98, 91, 88, 70, 51, kDa que están ausentes en la cepa parental en la misma fase, y los polipéptidos de aproximadamente 76 y 37 kDa presentes solamente en la cepa parental en fase virulenta. En cambio en fase avirulenta puede observarse la presencia de al menos cuatro polipéptidos en la cepa parental, de 44, 40, 30 y 13 kDa aproximadamente, los cuales están ausentes en el mutante. Mediante la técnica de inmunoblot empleando un suero anti flagelina pudimos corroborar que la banda de 40 kDa, presente únicamente en la cepa parental en fase avirulenta, corresponde a la flagelina (Fig. IV.9).

Por otra parte pudimos observar que el perfil de las proteínas secretadas del mutante *Bbfla*<sup>-</sup> presenta una menor definición en la zona de pesos moleculares entre 30 y 50 kDa. Este comportamiento se observa tanto en fase virulenta como avirulenta, siendo más marcado en la primera.

**Figura IV.8.** SDS-PAGE (12.5% p/v) de las proteínas secretadas en los cultivos de la cepa parental *Bb9.73* en fase virulenta (Línea 1) o en fase avirulenta (Línea 2) y del mutante *Bbfla*<sup>-</sup> en fase virulenta (Línea 3) o avirulenta (Línea 4). Los polipéptidos diferenciales se indican con flechas.



**Figura IV.9.** Inmunoblot de las proteínas secretadas por las cepas *Bb9.73* en fase virulenta (Línea 1) o en fase avirulenta (Línea 2) o por el mutante *Bbfla<sup>-</sup>* en fase virulenta (Línea 3) o en fase avirulenta (Línea 4). Como control se utilizó flagelina purificada (Línea 5). Las proteínas transferidas fueron enfrentadas a un suero policlonal específico contra flagelina.

**Identificación de algunos polipéptidos diferenciales presentes en los perfiles secretorios de *Bbfla*<sup>-</sup> y de la cepa parental.**

Dadas las diferencias observadas en el perfil de secreción de *Bbfla*<sup>-</sup> con respecto a la cepa parental, decidimos identificar algunos de los polipéptidos diferenciales. Se realizaron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida de mayor dimensión (Potean II de BioRad ) con el fin de obtener una mejor resolución. Estos geles fueron teñidos con la técnica de tinción de plata descrita por M. Mann compatible con espectrometría de masas (392). Algunas bandas diferenciales fueron extraídas del gel y enviadas para su identificación por la técnica de Maldi-Tof al Centro de Genómica y Proteómica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, España. De esta forma pudimos determinar que *Bbfla*<sup>-</sup> secreta en fase virulenta a la adhesina pertactina y a la proteína de fase intermedia BipA.

## Discusión

La participación en el proceso infeccioso de *Bordetella* de los factores de virulencia (adhesinas y toxinas), ha sido ampliamente comprobada en numerosos trabajos (60,81,86,129,158,170,271). Sin embargo, el rol *in vivo* de los factores propios de la fase denominada de avirulencia aún no ha sido esclarecido. Con el fin de avanzar en el conocimiento sobre la participación de los factores de avirulencia en el ciclo infeccioso de *B. bronchiseptica* decidimos realizar estudios *in vitro* e *in vivo* empleando un mutante en *B. bronchiseptica* defectivo en la expresión de un factor de avirulencia específico. Para ello hemos, en primer lugar, construido un mutante defectivo en la expresión de un gen *vrg* que codifica para flagelina, proteína constituyente del filamento del flagelo. La elección de este factor Bvg reprimido se basó en que la presencia del mismo es de fácil evaluación y la regulación mediada por el sistema BvgAS se encuentra caracterizada. Además este factor resulta interesante por sí mismo más allá de ser regulable por BvgAS ya que para otras bacterias Gram negativas se ha descrito para el flagelo un rol esencial durante el ciclo infeccioso. Así, mutantes de *Helicobacter pylori* (109) y *Campilobacter jejuni* (445) entre otros, defectivos en la expresión de esta organela se presentan como menos virulentos en infecciones de modelos animales respecto a la cepa parental. Asimismo, se ha podido detectar la presencia de anticuerpos que reconocen específicamente al flagelo en pacientes con infecciones de *H. pylori* (272) y *P. aeruginosa* (15), indicando que el flagelo es expresado por estas bacterias cuando se encuentran dentro del hospedador.

En el capítulo anterior determinamos que el mutante defectivo *Bbfla*<sup>-</sup> no presenta alteraciones importantes que pudieran perjudicar la interacción patógeno - hospedador. En este capítulo analizamos entonces el comportamiento de este mutante en la interacción con el hospedador. En los ensayos de adhesión empleando células epiteliales de pulmón A549 pudimos observar que la ausencia de la flagelina no afecta la capacidad de adherirse a las mismas, ya que no se observan diferencias significativas en el número de bacterias adheridas respecto a la cepa parental (Fig. IV.4). Este comportamiento es independiente de la fase de virulencia en la cual se encuentran las bacterias analizadas. La similitud del comportamiento entre la cepa parental y el mutante *Bbfla*<sup>-</sup> era esperable en el caso de las bacterias en fase virulenta, ya que durante esta fase ambos tipos de bacteria no deberían presentar, en principio, diferencias entre sí. Sin embargo, aquel comportamiento resulta llamativo en el caso de las bacterias en fase avirulenta ya que durante esta fase únicamente la cepa parental expresa el flagelo que es considerado para varias bacterias Gram

negativas como una adhesina (24,149,246,345). Nuestros resultados indican que la presencia del flagelo no sería necesaria para lograr una adhesión normal de *B. bronchiseptica* a las células epiteliales de pulmón utilizadas. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que el flagelo actúe en *B. bronchiseptica* como adhesina ya que podría suceder, como ocurre para otras adhesinas, que su deficiencia no se vea reflejada en una disminución en la adhesión porque otras adhesinas que se expresan en la fase avirulenta suplan la deficiencia (429). Si bien nosotros no hemos explorado esta posibilidad es claro que la deficiencia del flagelo no altera en forma significativa la adhesión.

Si bien no se observaron diferencias en el proceso de adhesión para ambos tipos de bacterias, las cinéticas de sobrevivencia dentro de las células derivadas de epitelio pulmonar humano fueron diferentes. En primer lugar, con respecto al proceso de invasión se observó que la fase virulenta de ambos tipos de bacterias resulta más eficiente que la fase avirulenta. Este aspecto es coincidente con los datos reportados por Brockmeier y Register (2000) que muestran que la invasión inicial de *B. bronchiseptica* a macrófagos porcinos es mayor para la cepa en fase virulenta (59). A tiempos prolongados post - invasión se pudo observar que el número de bacterias capaces de sobrevivir en el interior de las células epiteliales fue significativamente mayor para *Bbfla*<sup>-</sup> que para la cepa parental (Fig. IV.5). Este comportamiento diferencial entre la cepa parental y el mutante *Bbfla*<sup>-</sup> se observó tanto para las bacterias en fase virulenta como en fase avirulenta. Otros autores han reportado que la persistencia intracelular a tiempos largos de *B. bronchiseptica* en células fagocíticas se ve favorecida en aquellas bacterias que tienen bloqueado el sistema BvgAS de forma que siempre se encuentran en fase avirulenta (*bvg*-) (25). Este comportamiento parece repetirse en los ensayos realizados por nosotros con la cepa parental ya que la cepa en fase avirulenta presenta una mayor supervivencia intracelular que en fase virulenta (Fig. IV.5). Sin embargo, al evaluar comparativamente la persistencia intracelular del mutante *Bbfla*<sup>-</sup> en fase virulenta y avirulenta es sorprendente observar la elevada supervivencia que presenta este mutante en ambas fases. Estos datos parecen indicar que la persistencia intracelular de *Bbfla*<sup>-</sup> es independiente de la fase en la que se encuentre el mutante.

Todos estos datos demuestran que el flagelo no sólo no es necesario para la persistencia intracelular de *B. bronchiseptica*, sino que el mutante defectivo en flagelina persiste durante más tiempo que la cepa parental en las células utilizadas.

A fin de analizar si esta diferencia se presentaba también *in vivo*, procedimos a evaluar la cinética de colonización y persistencia del mutante *Bbfla*<sup>-</sup> empleando el modelo de infección en ratones. En estos ensayos pudimos observar que *Bbfla*<sup>-</sup> no

sólo conserva la capacidad de colonizar sino que presenta una cinética de colonización similar a la cepa parental en las primeras etapas de la infección. Sin embargo en las etapas finales, el número de UFC de *Bbfla*<sup>-</sup> en los pulmones murinos es mayor que el de la cepa parental. Así, en el día 46 posterior al inicio del ensayo sólo fue posible recuperar bacterias viables de los ratones inoculados con *Bbfla*<sup>-</sup>.

Las conclusiones que se desprenden de nuestros resultados concuerdan con datos reportados por Arkeley y colaboradores (1995) quienes analizaron el rol del flagelo en la colonización pero con una estrategia diferente a la nuestra (5). Estos autores emplearon en sus estudios un mutante que expresaba ectópicamente esta organela. Este mutante se construyó colocando al gen maestro de la cascada flagelar de *B. bronchiseptica* (*fli*), bajo el promotor de un gen activado por BvgAS (*fha*) de forma que expresara este factor de avirulencia durante la fase virulenta de la bacteria pero no en la fase avirulenta. Los ensayos de colonización del tracto respiratorio de ratas realizados por estos autores muestran que la colonización de la tráquea en el día 15 post - inoculación es significativamente menor para la cepa que expresa ectópicamente al flagelo con respecto a la cepa parental. Además en el día 26 de ensayo sólo fue posible recuperar bacterias viables de la cepa parental del mismo órgano y no de la cepa con expresión ectópica del flagelo. También realizaron ensayos sobre un nuevo mutante, que no sólo expresa ectópicamente el gen maestro de la cascada flagelar, sino que además es defectivo en la expresión de la flagelina, es decir que expresaría todos los componentes flagelares, excepto el filamento, en la fase virulenta de la bacteria. Al utilizar esta cepa observaron que la colonización en todos los órganos estudiados era indistinguible de la cepa parental. En este mismo trabajo se utiliza un mutante delecionado en el gen *fli*. Este mutante no sólo es capaz de colonizar tanto tráquea como pulmones de las ratas, sino que en el día 15 post - inoculación 3 de 5 animales presentan colonización pulmonar, a diferencia de 1 de 5 para el caso de la cepa parental. El día 26 del ensayo este mutante se comporta igual que la cepa parental en cuanto a colonización de los pulmones. Lamentablemente, si bien el ensayo continuó hasta el día 50 post - inoculación, los datos del mutante *fli* no fueron presentados. Todos estos resultados son coincidentes con los obtenidos por nosotros en el sentido que mutantes defectivos en la expresión del flagelo no presentan alteraciones en las primeras etapas de la colonización del modelo animal utilizado.

El comportamiento diferencial entre la cepa parental y *Bbfla*<sup>-</sup> observado tanto *in vitro* como *in vivo* resulta llamativo si tenemos en cuenta que la flagelina se expresa sólo durante la fase avirulenta. Esta situación nos hace pensar que el mutante *Bbfla*<sup>-</sup> sintetiza y / o secreta componentes bacterianos que resultan esenciales para la interacción de *B. bronchiseptica* con el hospedador. Sobre la base de esta hipótesis

decidimos evaluar el patrón de reconocimiento de proteínas totales de las cepas parental y *Bbfla*<sup>-</sup> en fase virulenta por los sueros obtenidos de los ratones inoculados con las mismas cepas. Estos ensayos nos permitieron observar claras diferencias en el perfil de reconocimiento sugiriendo que el mutante *Bbfla*<sup>-</sup> presenta diferentes proteínas que podrían ser las responsables del fenotipo de mayor persistencia.

Además planteamos en base a la similitud entre la estructura del flagelo y el sistema de secreción del tipo III, la posibilidad de que existiera una secreción de proteínas diferencial entre la cepa parental y el mutante *Bbfla*<sup>-</sup> que explicara el comportamiento observado en los ensayos realizados (3,8,9,36). La secreción de factores de virulencia a través del sistema de secreción flagelar ha sido descrita en otros patógenos tales como *Yersinia enterocolitica* (383) y *Bacillus thuringiensis* (142). Para analizar esta posibilidad se evaluaron los perfiles proteicos de secreción de *Bbfla*<sup>-</sup> y de la cepa parental obtenidos de los sobrenadantes de cultivos líquidos. En los mismos se observan varios polipéptidos que son secretados diferencialmente por las cepas. Asimismo se observa que en la región comprendida entre 30 y 60 kDa aproximadamente, *Bbfla*<sup>-</sup> presenta una menor intensidad de bandas que la cepa parental. Este resultado puede relacionarse con los Western blot realizados sobre lisados bacterianos de las cepas en ambas fases contra sueros de ratones infectados con *Bbfla*<sup>-</sup> o con la cepa parental (Fig. IV.7). Estas inmunodetecciones muestran que las proteínas de los lisados bacterianos de ambas cepas en fase virulenta presentes en la zona de 30-60 kDa, no son reconocidas por el suero obtenido de ratones infectados con el mutante pero sí lo son por el suero de los ratones infectados con la cepa parental. Estos datos permiten suponer que la respuesta inmune desarrollada por el hospedador tiene una correlación con las proteínas secretadas a través del sistema flagelar.

La identificación de algunos de los polipéptidos diferenciales mediante la técnica de Maldi-Tof y comparación con la base de proteínas Swiss-Pro arrojó como resultado que la cepa *Bbfla*<sup>-</sup> en fase virulenta secreta al medio de cultivo las proteínas pertactina (Prn) y BipA. La actividad como adhesina de Prn ha sido estudiada en ensayos *in vivo* e *in vitro* (28,112,238,356), pero su participación en el proceso infeccioso queda aún por ser determinada (356). La proteína BipA es característica de la denominada fase intermedia de *B. bronchiseptica*, su expresión es máxima durante dicha fase pero también se expresa en menor medida en la fase virulenta del microorganismo (101). Debido a que la secuencia de aminoácidos predicha para BipA presenta homología con adhesinas de otras especies bacterianas (415) ha sido sugerido que funciona como adhesina, participando en la transmisión de *Bordetella* entre un hospedador y el siguiente. Por lo tanto las dos proteínas secretadas diferencialmente por *Bbfla*<sup>-</sup> podrían ejercer una función de adhesina. Una diferencia

entre ellas es que ha sido reportado que Prn es secretada al medio extracelular en *B. pertussis* (455) pero la proteína BipA no lo es (101). Nuestros resultados indican claramente que existe una secreción diferencial por parte de *Bbfla*<sup>-</sup> respecto de la cepa parental. La identificación de estas dos adhesinas sugieren que el mutante es capaz de aumentar la secreción de ciertas proteínas y/o secretar proteínas que normalmente son intracelulares. Estudios realizados con otra adhesina de *Bordetella*, FHA, han demostrado que la secreción *in vivo* de esta proteína es fundamental en la colonización de pulmones de ratones BALB/c, facilitando esta adhesina el contacto de las bacterias con las células del hospedador (87). El mencionado trabajo sugiere que la liberación de esta adhesina tendría un rol en la dispersión de la bacteria desde microcolonias, y la posterior adhesión a nuevos sitios en el tracto respiratorio. Por lo tanto, una posible explicación de la mayor persistencia del mutante *Bbfla*<sup>-</sup> en los ensayos de colonización y persistencia en los pulmones murinos podría deberse a esta secreción de adhesinas, que podrían mediar mecanismos dinámicos de interacción patógeno - hospedador que deriven en mayor supervivencia dentro del organismo.

Los resultados presentados en este Capítulo indican que el flagelo, factor de avirulencia de *B. bronchiseptica*, no sólo no es necesario en ninguna de las etapas del ciclo infeccioso evaluadas (adhesión, invasión y persistencia en el modelo animal) sino que su ausencia resulta beneficiosa para la persistencia intracelular e intrapulmonar del microorganismo. Por otra parte la secreción diferencial de proteínas que presenta el mutante *Bbfla*<sup>-</sup> respecto de la cepa parental podría estar relacionada con la mayor supervivencia de *Bbfla*<sup>-</sup> tanto dentro de las células epiteliales de cultivo como en la infección pulmonar de los ratones. Como ha sido descrito en otros microorganismos, el aparato flagelar de *Bbfla*<sup>-</sup> podría cumplir una función dual de movilidad y secreción de proteínas de naturaleza no flagelar. La continuación del estudio de los factores secretados por el mutante *Bbfla*<sup>-</sup> y una posible interrelación entre este sistema y otros de secreción presentes en la bacteria nos permitirá profundizar el conocimiento del sistema de secreción flagelar de *Bordetella* y de su participación en la interacción patógeno-hospedador.

**Requerimiento de la fase  
avirulenta en la interacción  
*Bordetella bronchiseptica* –  
hospedador**

**Capítulo V**

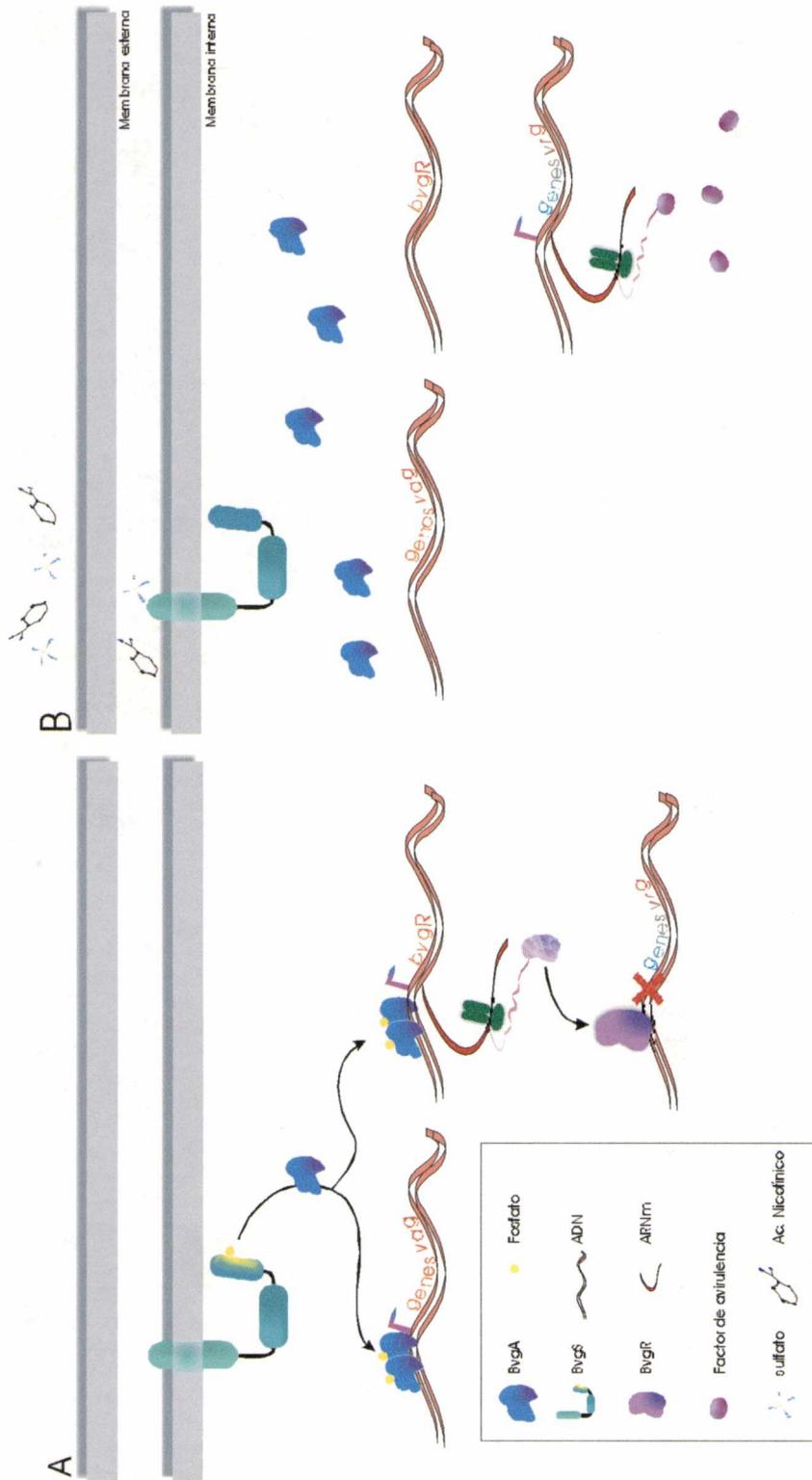
## Introducción

En el capítulo anterior caracterizamos del rol de un único factor *vrg* sobre el ciclo infeccioso de *B. bronchiseptica* a través de la construcción y caracterización de un mutante defectivo en la expresión de dicho factor. Nuestro objetivo más amplio sin embargo, es comprender el papel de los factores de avirulencia en general, los cuales son el resultado de una regulación coordinada. En esta etapa abordamos esta problemática, ya que decidimos trabajar sobre un gen que supuestamente está involucrado en la regulación negativa de los factores de avirulencia en su conjunto. Este punto fue un verdadero desafío debido a que durante mucho tiempo y hasta incluso en la actualidad, el conocimiento sobre la expresión de los factores de avirulencia en las diferentes especies del género *Bordetella* en general y en *B. bronchiseptica* en particular ha sido escaso.

La regulación negativa de los factores *vrg* comenzó a comprenderse a nivel molecular recién en 1995 y sólo para el caso de *B. pertussis* (284). En ese año se identificó una proteína a la que se denominó BvgR cuya función asignada es la de reprimir los factores *vrg* cuando la bacteria se encuentra en condiciones de cultivo de fase virulenta. La activación de esta proteína ocurre a nivel transcripcional junto con los factores *vag* cuando BvgAS está activo. Para una mejor comprensión del funcionamiento de este sistema de transducción de señales se muestra un esquema en la figura V.1.

En este esquema se observa que el locus *bvg* de *B. pertussis* codifica para tres proteínas BvgS (135 kDa), BvgA (23 kDa) y BvgR (32 kDa). La proteína BvgS se activa en ausencia de las señales externas a través de una autofosforilación a nivel de una histidina, seguida de dos fosfotransferencias intramoleculares que terminan en la transferencia de un grupo fosfato a la proteína BvgA, transformándola en BvgA~P. BvgA~P se une a secuencias que se encuentran en *cis* en la zona promotora de los genes *vag* y activa así la transcripción de dichos genes. La transcripción de *bvgR* también se activa mediante la acción de BvgA~P, la cual se une específicamente a la región promotora de *bvgR* mediante tres sitios denominados primario (P), secundario (S) y río arriba (U, por *upstream*) (283). La organización de estos sitios de unión en *bvgR* fue descrita en el año 2003 y resultó ser diferente respecto de los otros genes activados por BvgA (*fha*, *ptx*, *prn*, *cya* y *bipA*) en los cuales existe un sitio primario de unión de BvgA y uno o más sitios secundarios de unión (Capítulo I, pág. 41) (81). Se ha sugerido que inicialmente se une un dímero de BvgA~P al sitio primario (P) con alta afinidad y posteriormente y mediante interacciones cooperativas otras moléculas de BvgA~P ocupan sitios secundarios (S) de la región promotora para que finalmente BvgA~P interaccione directamente con la ARN polimerasa. A diferencia de los otros promotores anteriormente mencionados, el promotor de *bvgR* requiere la ocupación de ambos sitios, del P y del S, por dos dímeros de BvgA~P para activar la transcripción del gen correspondiente (283). La unión al sitio U no es necesaria para la activación de la transcripción, pero se estima contribuiría a la fuerza del promotor. A través de

ensayos de Northern blot o extensión a partir de primers se determinó los niveles de transcritos de *bvgR* en la célula son bajos. Otros ensayos mostraron que el promotor del gen *bvgR* es más fuerte que el del gen que codifica para la adhesina FHA. Más aún, se ha determinado que la expresión del gen *bvgR* ocurre al mismo tiempo que la del gen *fha*. Todos estos datos que acaban de publicarse indican que el transcripto del gen *bvgR* es inestable.



**Figura V.1.** Representación esquemática del funcionamiento del sistema de dos componentes BvgAS sobre los genes *vag* y los genes *vrg* en condiciones de cultivo: de la fase virulenta, **Panel A** y de la fase avirulenta, **Panel B**.

Este avance en el conocimiento constituye una base importante para profundizar la comprensión no sólo de la regulación y la identificación de nuevos factores *vrg* sino además en la determinación del rol de dichos factores en la patogénesis de *Bordetella*. Sin embargo, como hemos mencionado más arriba, los datos se corresponden a *B. pertussis* y no a *B. bronchiseptica*. Para esta última especie se ha informado que la expresión constitutiva de los factores de virulencia no reduce la capacidad de este microorganismo para colonizar y persistir dentro del hospedador (83). Sin embargo, Akerley y colaboradores (1995) informaron que la expresión inapropiada de un factor de avirulencia (gen *friI*) en un fenotipo virulento reducen la colonización de dicho patógeno (5). Ahora bien: debe recalcar que estos autores trabajaron con un mutante que expresaba ectópicamente un único factor de avirulencia y tras analizar el comportamiento de este mutante *in vivo* extrapolaron el resultado hallado a todos los factores *vrg* sin haber obtenido evidencias que fundamentaran tal generalización (5). Así, para *B. bronchiseptica* entre los otros genes *vrg* se han identificado, además de la ureasa y los sideróforos (para algunas cepas), enzimas de metabolismos alternativos, transportadores de aminoácidos a nivel de membrana y enzimas modificadoras del lipopolisacárido de membrana externa (391). Por lo tanto, un estudio de la función de los genes *vrg* debería analizar al conjunto de varios factores de avirulencia en la patogenicidad de este microorganismo, tratando de evaluar todas las etapas de un proceso infeccioso. Es por ello que focalizamos nuestros trabajos en obtener y caracterizar una cepa de *B. bronchiseptica* que exprese en forma simultánea todos los factores de virulencia y de avirulencia.

Teniendo en cuenta que las especies del género *Bordetella* son consideradas actualmente como subespecies que derivan de un ancestro similar a *B. bronchiseptica* (325,444) decidimos buscar el gen *bvgR* en *B. bronchiseptica*, y posteriormente construir y caracterizar una cepa defectiva en dicho gen que expresara en forma simultánea tanto los factores de virulencia como los factores de avirulencia. A continuación se describen los resultados obtenidos.

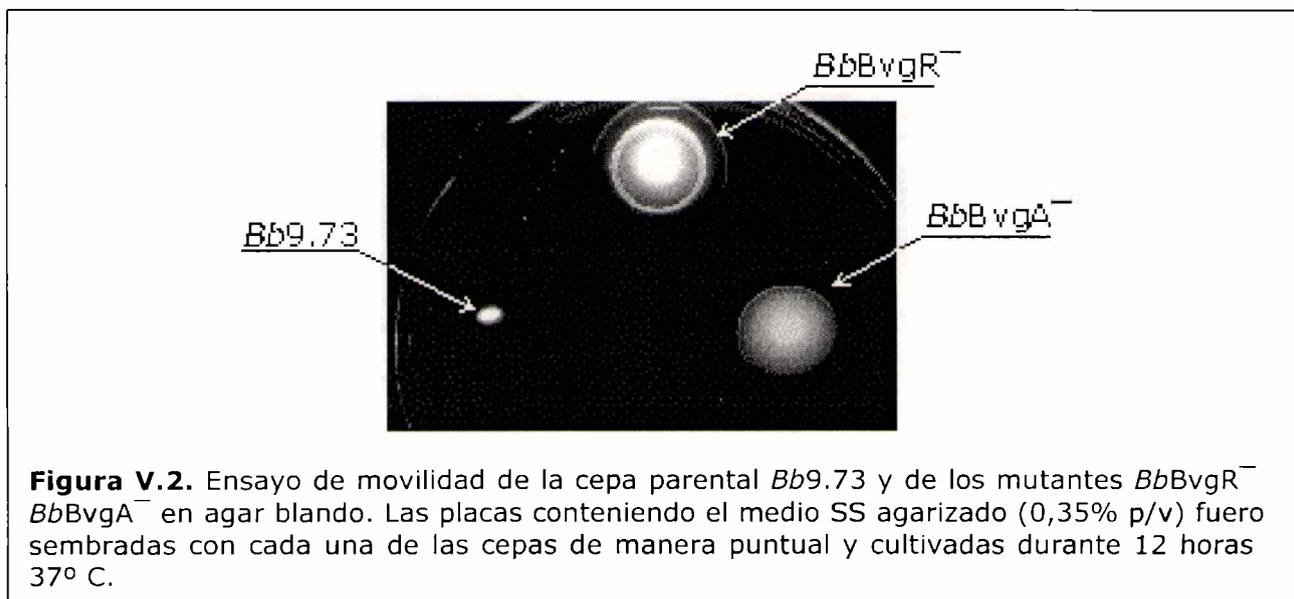
## Resultados

### Detección del gen de *bvgR* en el genoma de *B. bronchiseptica*

Como hemos mencionado en la introducción de este capítulo, en el momento de abordar mi trabajo de Tesis la secuencia del gen de *bvgR* sólo había sido descrita para *B. pertussis*. No se disponía en bibliografía de ningún dato referido a la presencia de este gen en *B. bronchiseptica*. Es por ello que para detectar y amplificar en esta última especie una secuencia que se corresponda con el gen *bvgR*, diseñamos secuencias oligonucleotídicas o primers en base a la secuencia reportada para *B. pertussis* (282,284). A partir de un molde de ADN obtenido de la cepa *B. bronchiseptica* CIP 9.73 y mediante un ensayo de PCR empleando los primers que denominamos *bvgR<sub>f</sub>* y *bvgR<sub>r</sub>*, pudimos amplificar un fragmento de ADN del tamaño esperado (500 pb). El amplicón obtenido fue secuenciado y del análisis comparativo de estos datos con los de la secuencia reportada para *B. pertussis* (Genbank AF071567) pudimos establecer una homología entre ambas secuencias mayor al 99 %.

### Construcción de un mutante de *B. bronchiseptica* defectivo en la expresión del gen *bvgR*

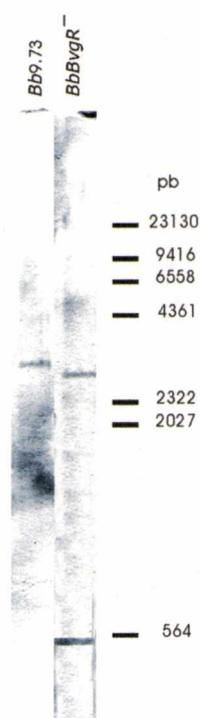
Una vez determinada la presencia del gen *bvgR* en *B. bronchiseptica* decidimos construir un mutante defectivo en la expresión de dicho gen para evaluar el rol del mismo en la patogénesis de este microorganismo. Para ello realizamos una mutagénesis insercional sitio específica por integración del plásmido recombinante que denominamos *pk18mob::bvgR*. A este plásmido lo construimos a partir del vector *pK18mob* movilizable y suicida en *B. bronchiseptica* y del producto de amplificación de 500 pb obtenido, correspondiente a una región interna de la secuencia codificante del gen *bvgR*. Esta construcción fue introducida por conjugación desde la cepa donadora *E. coli* S17 a la cepa receptora *B. bronchiseptica* 9.73 (*Sm<sup>r</sup>*) en fase virulenta. La



**Figura V.2.** Ensayo de movilidad de la cepa parental *Bb9.73* y de los mutantes *BbBvgR<sup>-</sup>* *BbBvgA<sup>-</sup>* en agar blando. Las placas conteniendo el medio SS agarizado (0,35% p/v) fueron sembradas con cada una de las cepas de manera puntual y cultivadas durante 12 horas 37° C.

selección de los transconjugantes de *Bordetella* que habían integrado al plásmido a través de un simple evento de recombinación homóloga se realizó por resistencia a los antibióticos Sm codificada en la cepa receptora y Km codificada en el plásmido. A partir de los transconjugantes Sm<sup>r</sup>Km<sup>r</sup> se procedió a la selección de colonias que expresaran marcadores de avirulencia en condiciones de virulencia. Para ello analizamos la movilidad de colonias sobre agar blando a 37°C, ya que este fenotipo es indicativo de la expresión del marcador de avirulencia flagelina, siendo la temperatura de 37°C la inductora de fase virulenta (Fig. V.2).

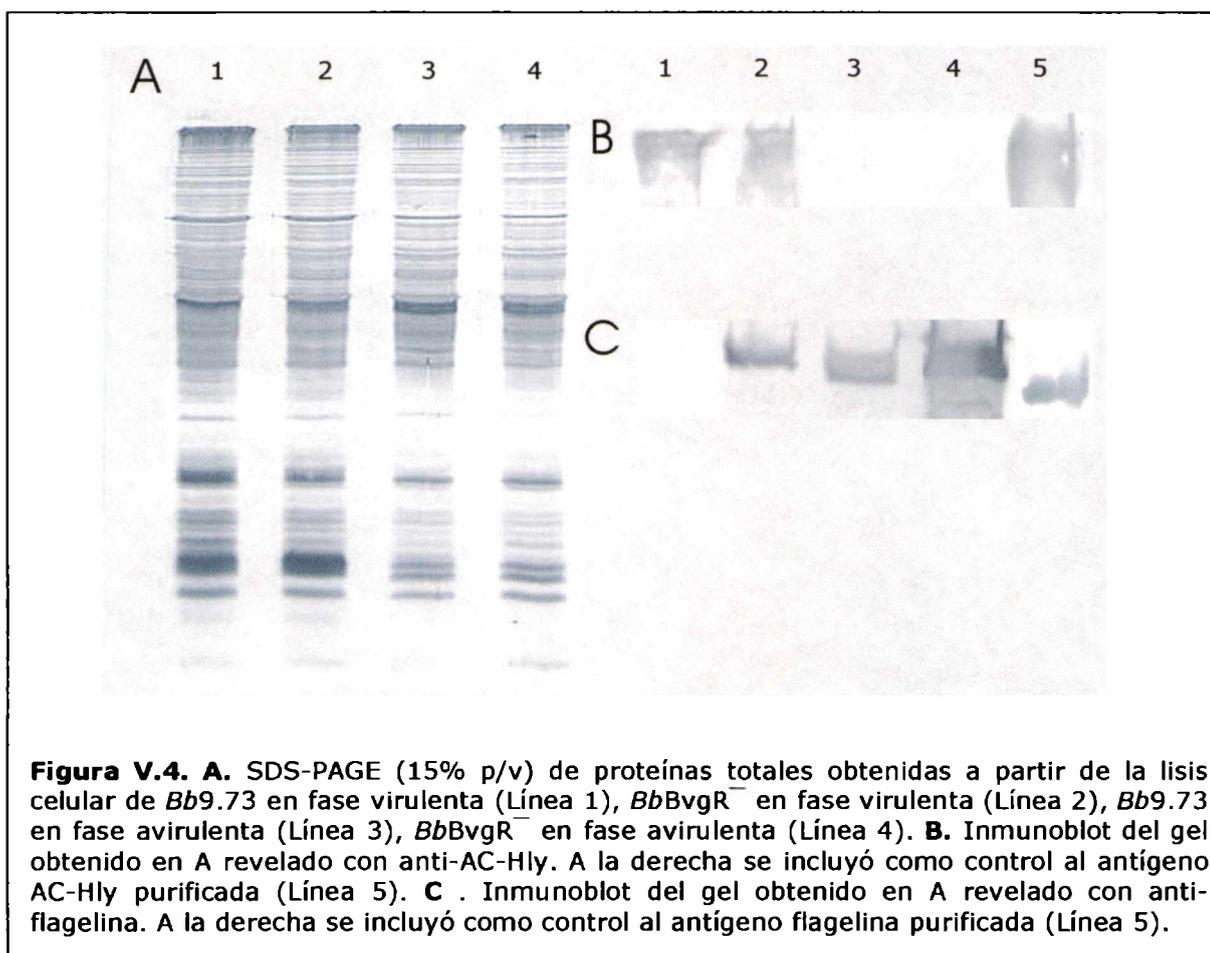
La construcción génica de los posibles mutantes fue luego evaluada entonces mediante la técnica de Southern blot (373). Para ello se procedió al aislamiento y posterior digestión con la enzima de restricción *EcoRI* del ADN total proveniente de la cepa parental y de los supuestos mutantes defectivos. La enzima *EcoRI* no reconoce ningún sitio en la secuencia del gen *bvgR* y sólo un sitio en el plásmido pK18mob por lo que al integrarse este plásmido al genoma de *Bordetella* adiciona un sitio más de reconocimiento para esa enzima. El material digerido fue sometido a una electroforesis en gel de agarosa y posteriormente transferido a una membrana de nylon la cual fue revelada con una sonda específica marcada con digoxigenina (*bvgRDIG*) que hibrida con la secuencia del gen *bvgR*. En la figura V.3 se muestran los resultados obtenidos. En dicha figura se puede observar que la sonda *bvgRDIG* hibrida con dos fragmentos en uno de los clones analizados (a este clon lo denominamos *BbBvgR*<sup>-</sup>); mientras que la cepa parental presenta una única banda cuyo tamaño (3.7 kpb) se corresponde aproximadamente a la suma de los tamaños de los fragmentos de *BbBvgR*<sup>-</sup> (3.3 kpb y 0.45 kpb).



**Figura V.3.** Southern blot de los ADN digeridos de la cepa parental *Bb9.73* (Línea 1) y del mutante *BbBvgR*<sup>-</sup> (Línea 2). Para el revelado se empleó una sonda marcada con digoxigenina obtenida por PCR. La misma corresponde a una región interna del gen *bvgR*. En el lado derecho de la figura se indican los pesos moleculares correspondientes a los fragmentos de ADN obtenidos de la digestión con *HindIII* del ADN del fago lambda.

### Expresión simultánea de marcadores de virulencia y avirulencia en el mutante *BbBvgR*

La similitud existente entre las distintas especies del género *Bordetella* nos permite predecir que un mutante en *B. bronchiseptica* defectivo en la expresión de la proteína reguladora BvgR debería expresar simultáneamente en fase virulenta los factores Bvg activados y Bvg reprimidos, como ocurre en *B. pertussis*. Analizamos entonces en el mutante *BbBvgR*<sup>-</sup> la expresión de factores de avirulencia en condiciones de virulencia. Realizamos inmunodetecciones sobre lisados proteicos obtenidos del mutante *BbBvgR*<sup>-</sup> en fase virulenta y de la cepa parental en ambas fases empleando como primer anticuerpo antisueros específicos contra el marcador de virulencia adenilato ciclasa – hemolisina (AC-Hly) y contra el marcador de avirulencia flagelina. Los resultados obtenidos se muestran en la figura V.4. Como puede observarse en dicha figura el anticuerpo anti-AC-Hly reconoce a esta proteína tanto en la cepa parental en fase virulenta como para el mutante *BbBvgR*<sup>-</sup> cultivado en condiciones de virulencia. Por su parte, el anticuerpo antiflagelina reconoce a esta proteína tanto en el cepa parental en fase avirulenta como en el mutante *BbBvgR*<sup>-</sup> cultivado en condiciones de virulencia. Como se esperaba, este anticuerpo no detecta flagelina en la cepa parental en fase virulenta. Como controles se emplearon además AC-Hly y flagelina purificadas por nosotros.

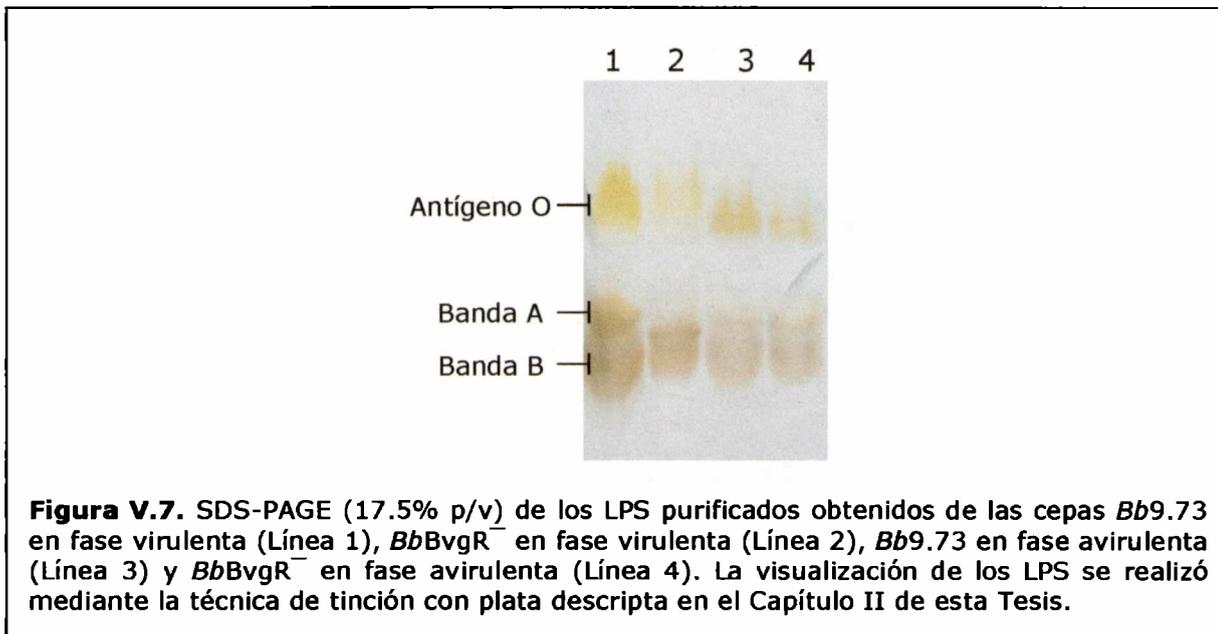
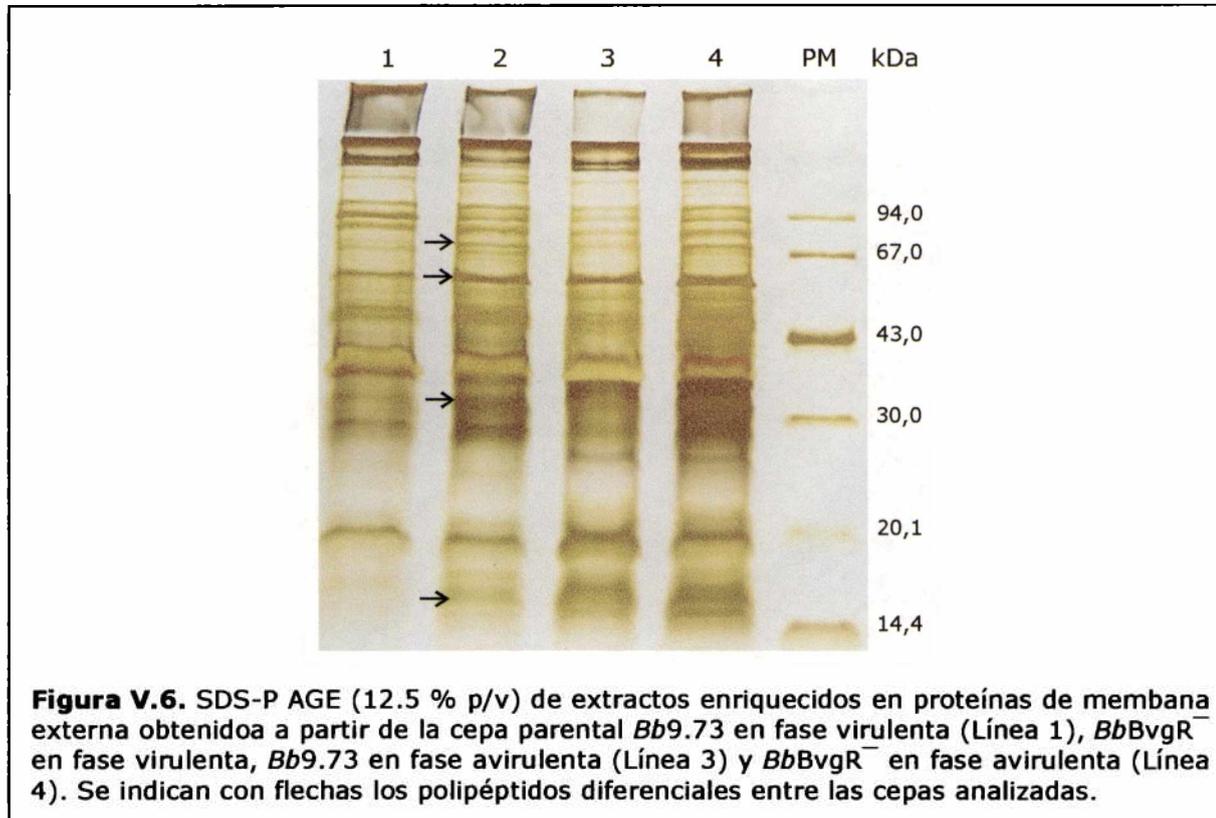


Además a partir de colonias del mutante defectivo que presentaban hemólisis en cajas con medio SS se realizaron ensayos de movilidad en medio SS semi blando. En este caso se emplearon como controles a la cepa parental en fase virulenta y la cepa *BbBvgA*<sup>-</sup> (que se encuentra constitutivamente en fase avirulenta). Como se observa en la Figura V.2, el mutante defectivo *BbBvgR*<sup>-</sup> presenta movilidad cuando es cultivada en condiciones de virulencia.

La presencia de flagelo en la cepa *BbBvgR*<sup>-</sup> en fase virulenta se visualizó además mediante microscopía electrónica de transmisión. Las muestras analizadas consistieron suspensiones bacterianas del mutante en condiciones de cultivo de fase virulenta y de la cepa parental en fase avirulenta, esta última empleada como control positivo de la expresión del flagelo. Estas muestras fueron preparadas a partir de células cultivadas durante 24 horas en placas conteniendo el medio sintético SSs. En la figura V.5.A se observa la presencia de flagelo en las bacterias *BbBvgR*<sup>-</sup> cultivadas en fase virulenta. En la misma figura puede apreciarse además que la morfología de la bacteria es de bacilo corto, característico de la fase virulenta. Mientras la cepa parental en fase virulenta no presenta flagelo, la misma en fase avirulenta presenta flagelos distribuidos alrededor de la superficie bacteriana (Fig. V.5.B). En este último caso la bacteria se presenta con una forma bacilar más alargada, característica de la fase avirulenta.

Con el fin de analizar si en nuestro mutante en fase virulenta se expresan otros factores de avirulencia además de la flagelina, preparamos extractos enriquecidos con polipéptidos de membrana externa (OMP) siguiendo la técnica descrita por Schnaitamn y col (1971) (388). En trabajos anteriores se han descrito diversos marcadores de avirulencia, que se encuentran justamente sobre la superficie de la bacteria (84,327). Los extractos proteicos enriquecidos en OMP obtenidos a partir de la cepa *BbBvgR*<sup>-</sup> y de la cepa parental, tanto en fase virulenta como en fase avirulenta fueron sometidos a corridas electroforéticas en geles de poli(acrilamida) conteniendo SDS. En la figura V.6 se observa que los polipéptidos de aproximadamente 74, 36 y 15 kDa son característicos de la cepa parental en fase avirulenta y se encuentran también el mutante *BbBvgR*<sup>-</sup>, tanto en fase virulenta como avirulenta. Asimismo, se observa un polipéptido de 63 kDa en todas las calles analizadas, pero existen diferencias cuantitativas entre ellas. La cantidad expresada por la cepa mutante en fase virulenta es similar a la presente en ambas cepas en fase avirulenta, mientras que en la cepa parental en fase virulenta este polipéptido se encuentra en menor cantidad.

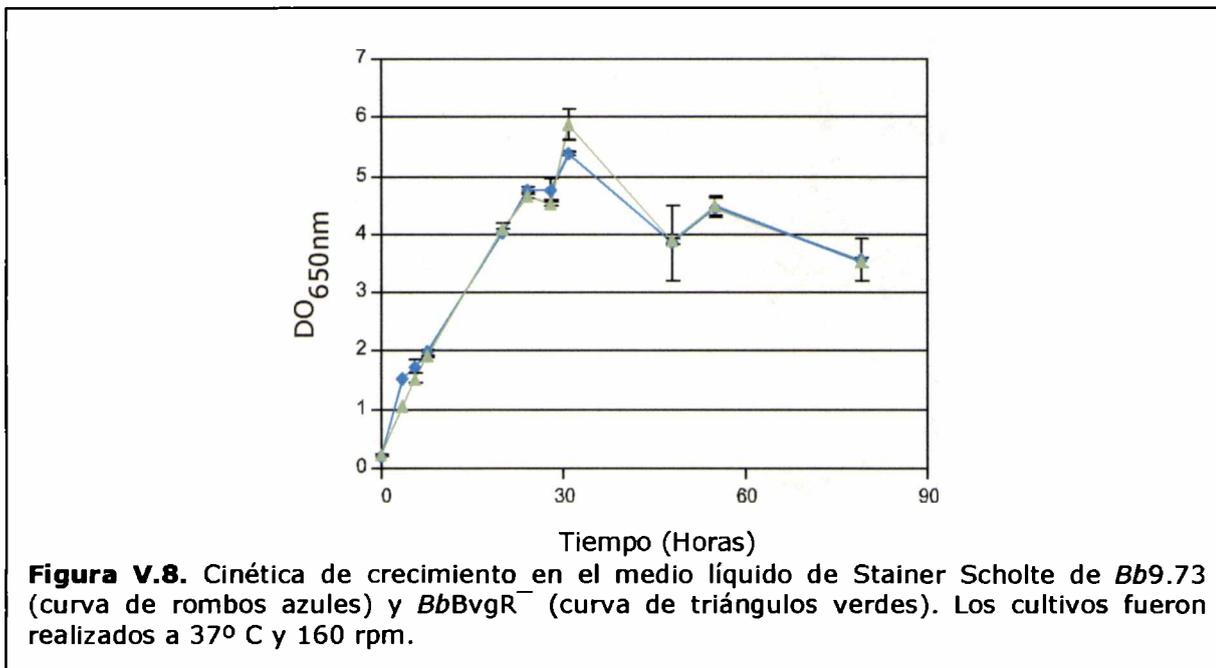
Además se analizó el perfil electroforético de un componente de membrana, el lipopolisacárido (LPS). En la figura V.7 se observa que la estructura del LPS de *BbBvgR*<sup>-</sup> es similar al de la cepa parental, tanto en fase virulenta como avirulenta.



### Cinética de crecimiento del mutante *BbBvgR<sup>-</sup>*

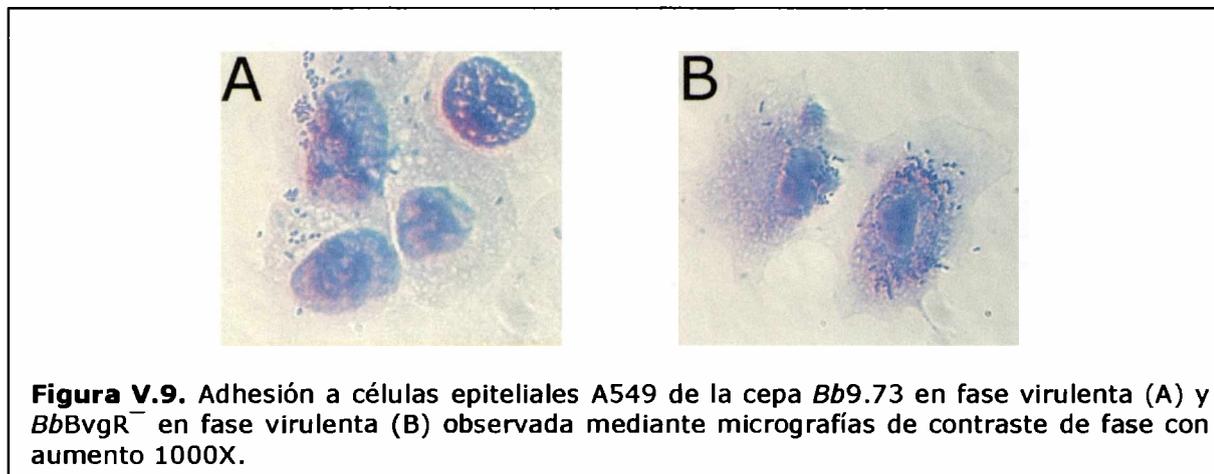
Se analizó el desarrollo del mutante *BbBvgR<sup>-</sup>* en frascos erlenmeyers utilizando el medio sintético de Stainer Scholte, ya descrito como óptimo para cultivo de este microorganismo. Los frascos se inocularon con una suspensión bacteriana de forma de alcanzar una densidad óptica a 650 nm de 0,2, y a partir de ahí a distintos tiempos

fueron tomadas alícuotas de forma de ir registrando a lo largo del tiempo valores de densidad óptica y número de unidades formadoras de colonias (UFC). Los datos obtenidos en comparación con la cepa parental se muestran en la figura V.8. Como puede observarse, la cepa mutante *BbBvgR* presenta una cinética de crecimiento similar a la de la cepa parental, alcanzando ambas un número máximo de aprox.  $1 \cdot 10^{10}$  UFC/ml con una velocidad de crecimiento de aproximadamente  $0,7 \text{ h}^{-1}$ .



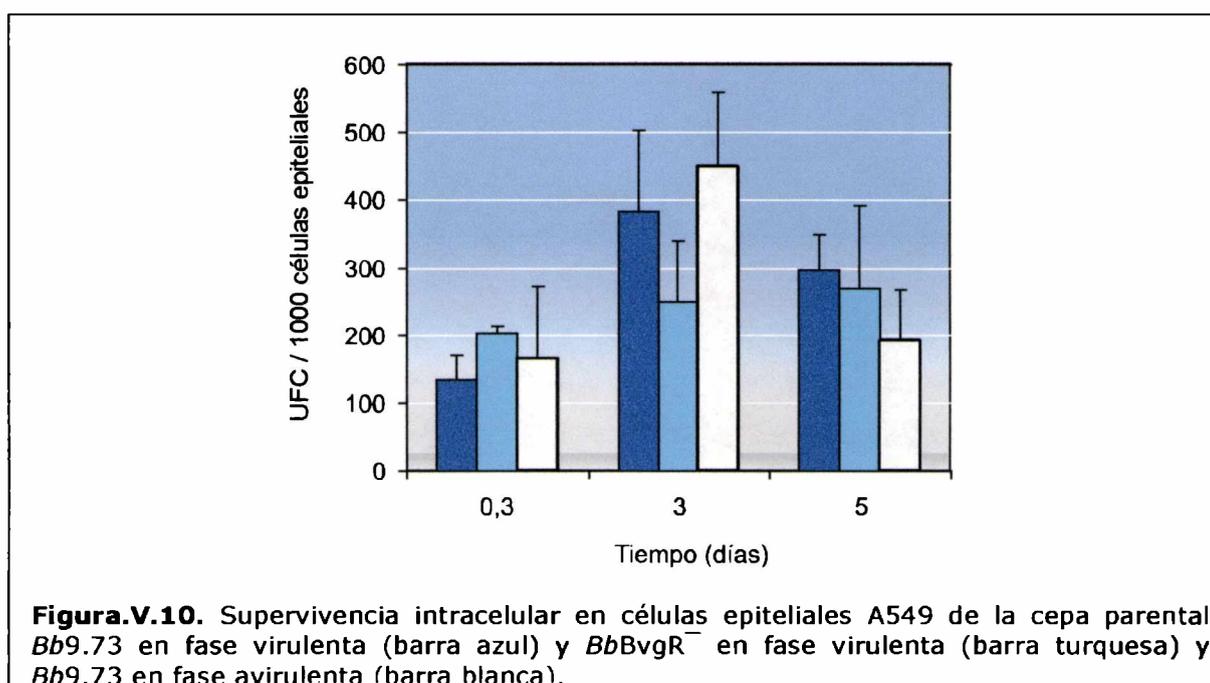
#### Adhesión y supervivencia de *BbBvgR<sup>-</sup>* en cultivos *in vitro*

Con el fin de analizar si la presencia de los factores *vrg* durante la fase virulenta afecta el proceso de adhesión y supervivencia de *B. bronchiseptica* en células epiteliales, se realizaron ensayos *in vitro* empleando células derivadas del epitelio pulmonar humano (A549). La elección de esta línea celular se basó en que este tipo de tejido es el que *B. bronchiseptica* encuentra en el transcurso del proceso infeccioso.



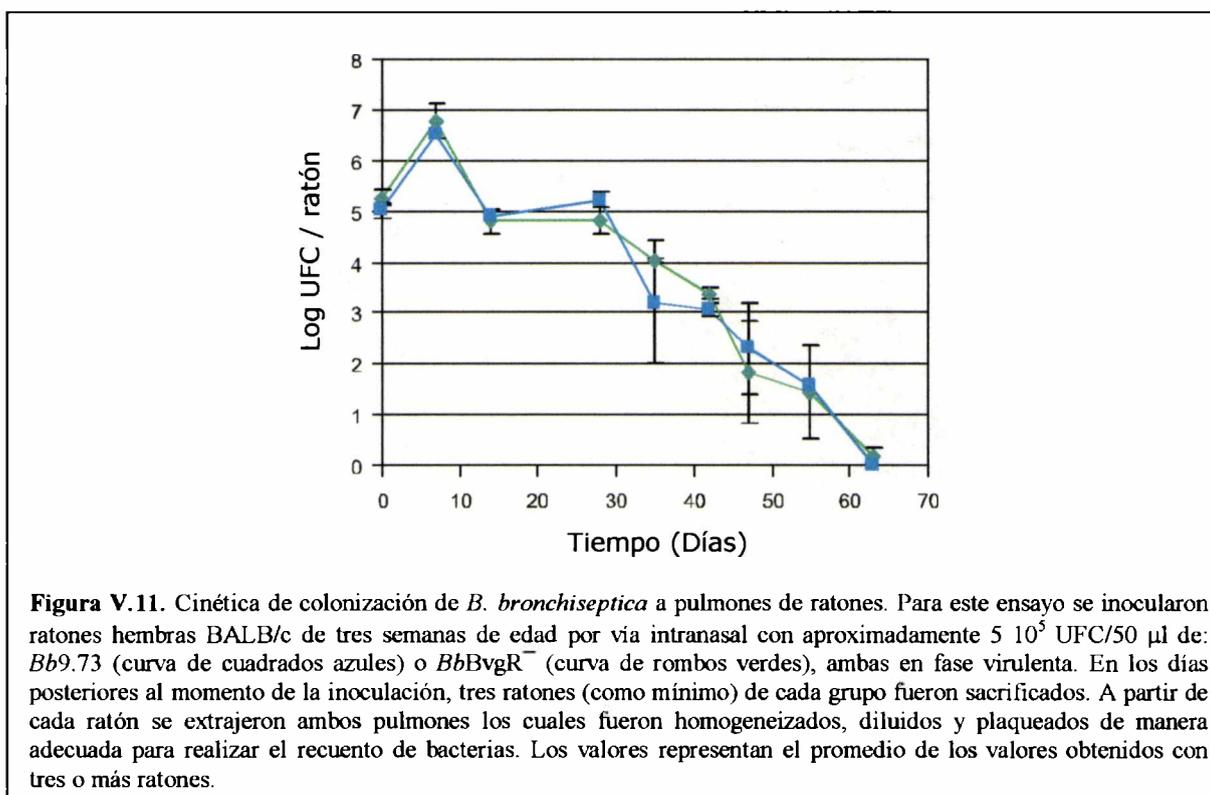
Los ensayos consistieron en incubar las suspensiones bacterianas de cada una de las cepas a analizar con cultivos de las células epiteliales desarrolladas hasta un 70-80% de confluencia. Para facilitar el proceso de adhesión y posterior invasión, se centrifugaron las bacterias sobre las monocapas de las células eucariotas. Transcurridas dos horas de incubación, se determinó el número de bacterias adheridas por célula epitelial. El número de bacterias de la cepa mutante *BbBvgR*<sup>-</sup> en fase virulenta adheridas a las células eucariotas fue de  $55 \pm 9$ , similar al de la cepa parental en la misma fase ( $46 \pm 13$ ) (Fig. V.9).

Al igual que la cepa parental, el mutante *BbBvgR*<sup>-</sup> es capaz de iniciar un proceso de invasión y supervivencia en la célula epitelial. Esta capacidad de *B. bronchiseptica* de invadir células eucariotas fue descrita previamente por varios autores (25,163,164,375,381). La cinética de supervivencia intracelular de la cepa mutante fue similar a la de la cepa parental (Fig. V.10). A las 72 horas post-invasión se observa un aumento a casi tres veces el valor inicial del número de UFC intracelulares para la cepa parental en ambas fases (aproximadamente 400 UFC/1000 células eucariotas respecto de valor inicial de 150 UFC/1000 células eucariotas), y un aumento leve para *BbBvgR*<sup>-</sup> (250 UFC/1000 células eucariotas respecto del valor inicial de 200 UFC/1000 células eucariotas), sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas. En el día quinto del ensayo se observa una disminución del número intracelular de bacterias en la cepa parental con respecto al día 3 del ensayo, que corresponde a un 30 % para las bacterias en fase virulenta y a un 60 % para la fase avirulenta. La cepa *BbBvgR*<sup>-</sup> en fase virulenta presenta un aumento de un 10 % en el número de UFC intracelulares respecto del punto anterior. Sin embargo, estas diferencias no tienen significado estadístico.



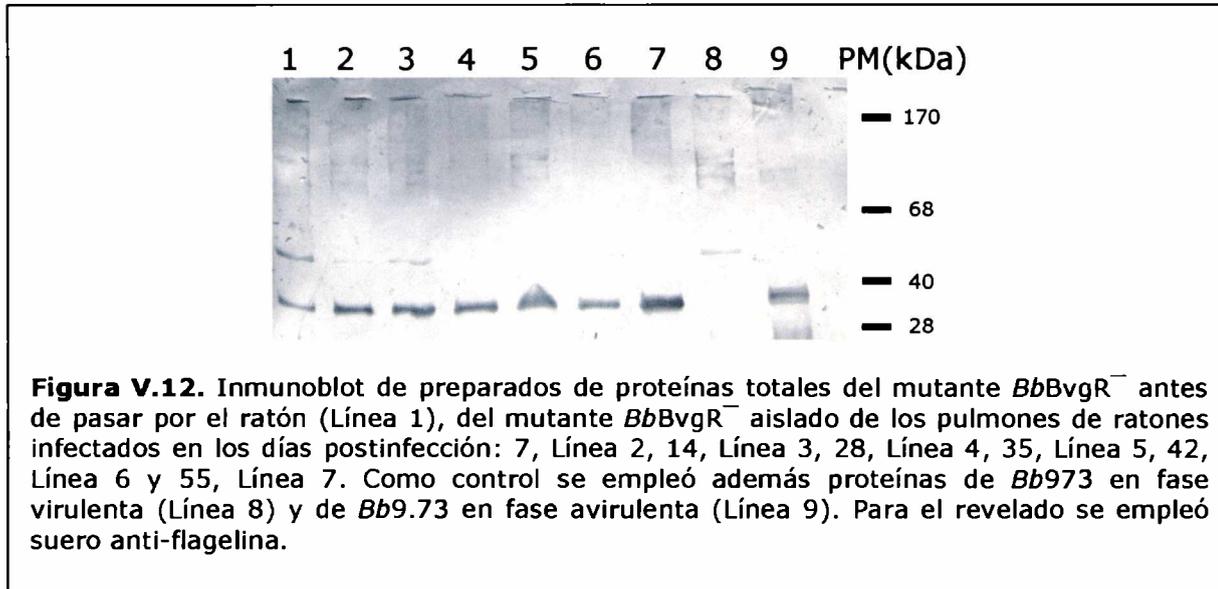
### Estudio del comportamiento de *BbBvgR*<sup>-</sup> *in vivo* empleando el modelo de infección intranasal en ratones

Con el fin de analizar el comportamiento de *BbBvgR*<sup>-</sup> durante el ciclo infeccioso, realizamos ensayos *in vivo* empleando el modelo de infección intranasal de *Bordetella* en ratones BALB/c. Para estos ensayos se inocularon ratones con 50  $\mu$ l de suspensiones bacterianas conteniendo aproximadamente  $5 \cdot 10^5$  UFC. A distintos tiempos post-inoculación se sacrificaron ratones a los que se les extrajeron los pulmones asépticamente. Diluciones apropiadas de los homogeneizados de pulmón se sembraron en placas conteniendo el medio sintético SSs suplementado con los antibióticos adecuados. Los resultados del recuento de bacterias se graficaron en la figura V.11. Como puede observarse, tanto la cepa parental como el mutante *BbBvgR*<sup>-</sup> siguen una cinética de colonización típica de *B. bronchiseptica* con un aumento en el número de las bacterias que colonizan los pulmones murinos a los siete días posteriores (aumento de un log en el número de UFC) que luego decae hasta desaparecer después del día 60 post inoculación (Fig. V.11).



Con el fin de analizar si las bacterias recuperadas de los ratones inoculados con *BbBvgR*<sup>-</sup> mantenían la expresión simultánea de marcadores de virulencia y avirulencia, se realizaron análisis de la actividad hemolítica en placas agar sangre e inmunodetecciones utilizando como antisuero anti-flagelina. Como controles se utilizaron la cepa parental en fase virulenta y en fase avirulenta o muestras de proteínas totales obtenidas a partir de ellas. Pudimos observar que todas las colonias *BbBvgR*<sup>-</sup> obtenidas a partir de los pulmones de ratones infectados eran hemolíticas. Además y como se observa en la figura V.12 las bacterias *BbBvgR*<sup>-</sup> recuperadas de los

pulmones expresan al marcador de fase avirulenta, flagelina. Estos resultados nos permiten corroborar la estabilidad de la construcción realizada en el mutante *BbBvgR*<sup>-</sup>.



## Discusión

En el capítulo anterior trabajamos en el análisis del papel que juega uno de los factores *vrg* durante el ciclo infeccioso de *B. bronchiseptica*. Si bien esta estrategia de estudio nos permitió determinar que la presencia de ese factor (la flagelina) en sí mismo no resulta esencial en ninguna de las etapas de la infección incluyendo la de persistencia, en esta etapa decidimos abordar el estudio de los factores de avirulencia desde una visión más abarcativa que incluya a los factores *vrg* en su conjunto y no a un sólo factor en particular. Para ello focalizamos nuestro trabajo en la construcción y caracterización de un mutante de *B. bronchiseptica* defectivo en la expresión de una proteína reguladora involucrada en la transcripción de los factores *vrg*, la proteína BvgR. En el momento de iniciar este trabajo sólo contábamos con datos recientemente publicados sobre la presencia de esta proteína y el rol de la misma en *B. pertussis*. El planteo de nuestro objetivo se basó en que dada la alta homología existente entre las distintas especies del género *Bordetella* es factible suponer que la proteína BvgR también se encuentre en *B. bronchiseptica*. Esta homología entre las distintas especies, sobre todo entre las especies denominadas *Bordetella* clásicas (*B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*) llega al punto que las mismas pueden ser consideradas como subespecies de una única especie con adaptaciones a diferentes hospedadores (444). Las secuencias del sistema de dos componentes BvgAS también presentan una alta homología, siendo de 96 % la identidad entre *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* (21). De hecho, el intercambio de los respectivos sistemas entre estas dos especies resulta funcional, como ha sido demostrado en ensayos *in vivo* (265). Con estos antecedentes nos planteamos la posibilidad de que la represión de los genes de avirulencia en la fase virulenta de *B. bronchiseptica* fuera también realizada a través de BvgR como ocurre en *B. pertussis* (282,284). De estar presente esta proteína en forma activa en *B. bronchiseptica*, podríamos obtener un mutante de este patógeno que exprese en forma simultánea los genes activados y los reprimidos por el sistema de dos componentes. La cepa así obtenida permitiría analizar las distintas etapas del proceso infeccioso en presencia de ambos tipos de factores, es decir de virulencia (*vag*) y avirulencia (*vrg*). Este aspecto es totalmente novedoso para *B. bronchiseptica*, ya que hasta el momento la participación de los factores de avirulencia en la patogénesis de este microorganismo ha sido estudiada en forma individual y no en su conjunto (5).

La primera etapa de nuestro trabajo consistió en la detección del gen que codifica a la proteína BvgR en *B. bronchiseptica*. Ensayos de PCR, de secuenciación y análisis de datos en forma comparativa con los del Banco de datos GenBank, nos permitieron determinar que en el genoma de *B. bronchiseptica* se encuentra una secuencia de ADN con una identidad del 99% respecto a la secuencia del gen *bvgR* de *B. pertussis*. Estos resultados no sólo fueron esenciales para la continuación de nuestro trabajo sino que además representan una base del conocimiento que se requiere para comprender la regulación de los factores en *B. bronchiseptica*.

A partir de un fragmento de ADN correspondiente a una región interna de la secuencia codificante del gen *BvgR* según los análisis comparativos con *B. pertussis*, construimos un mutante de *B. bronchiseptica* defectivo en la expresión de la proteína *BvgR*. Luego de realizar una conjugación biparental obtuvimos transconjugantes que se seleccionaron por su resistencia a antibióticos y por su capacidad para expresar en forma simultánea un factor de avirulencia (flagelo) y un factor de virulencia (hemolisina). Se obtuvo así un transconjugante (*BbBvgR*<sup>-</sup>) que presentaba hemólisis en placas de agar sangre (SSs) y movilidad en placas de agar blando. Este fenotipo de expresión simultánea de ambos marcadores de fase se confirmó además con ensayos del tipo inmunoblot, microscopía electrónica y análisis de proteínas de superficie. Los ensayos de inmunoblot realizados sobre proteínas totales de *BbBvgR*<sup>-</sup> en fase virulenta, utilizando anticuerpos específicos contra AC-Hly y contra flagelina, marcadores de fase virulenta y avirulenta respectivamente, mostraron que el mutante *BbBvgR*<sup>-</sup> es capaz de expresar ambos marcadores cuando se encuentra en fase virulenta (Fig. V.4). Mediante ensayos de microscopía electrónica de transmisión pudimos además observar la presencia del flagelo en *BbBvgR*<sup>-</sup> cuando se encontraba en fase virulenta. Para completar el estudio de la expresión de factores *vrg* en la fase virulenta del mutante *BbBvgR*<sup>-</sup> analizamos el perfil de extractos proteicos enriquecidos en proteínas de membrana externa. En los geles de poliacrilamida obtenidos pudimos observar varias bandas de polipéptidos características de la fase avirulenta de la cepa parental, que se encontraban también en *BbBvgR*<sup>-</sup> en fase virulenta. La expresión diferencial de proteínas de membrana externa ha sido descrita por otros autores y se la utiliza como marcadores de fase (84,327). Este último ensayo resulta interesante ya que nos permite visualizar que la mutación del gen *bvgR* conduce a cambios amplios en el perfil de expresión más allá de la flagelina.

Todos estos datos muestran la funcionalidad de la proteína *BvgR* en *B. bronchiseptica*, ya que la interrupción del gen que la codifica conduce a la expresión de los factores de avirulencia en condiciones de cultivo de fase virulenta. Esta es la primera vez que se describe la presencia de la proteína funcional *BvgR* en *B. bronchiseptica*. Nuestros resultados indican que la expresión del flagelo y de algunas proteínas de membrana externa son reprimidos por *bvgR* durante la fase virulenta de *B. bronchiseptica*.

Luego de confirmar que el transconjugante obtenido expresaba en forma simultánea factores de virulencia y avirulencia, decidimos avanzar en el estudio del comportamiento de *BbBvgR*<sup>-</sup> en la interacción patógeno – hospedador. Para ello analizamos primeramente en ensayos *in vitro* la interacción de este mutante con células eucariotas del hospedador, en particular con células epiteliales de pulmón (A549). Analizamos comparativamente con la cepa parental tanto la adhesión como la invasión y persistencia de *BbBvgR*<sup>-</sup> en dichas células. Estos ensayos mostraron que ninguno de los procesos analizados estaban alterados en el mutante *BbBvgR*<sup>-</sup> ya que no observamos diferencias entre los datos obtenidos con el mutante en fase virulenta y los correspondientes a la cepa parental, cultivada ya sea en condiciones de fase

virulenta o avirulenta. Por lo tanto, la presencia de factores de avirulencia durante la fase virulenta no altera la capacidad de *BbBvgR*<sup>-</sup> de adherirse y persistir en las células utilizadas.

A fin de evaluar la interacción patógeno - hospedador *in vivo*, realizamos ensayos empleando el modelo de infección intranasal de ratones. Para ello analizamos comparativamente la cinética de colonización de *BbBvgR*<sup>-</sup> y la de la cepa parental, ambas en fase virulenta. Como se observa en la figura V.11 *BbBvgR*<sup>-</sup> es capaz de colonizar y persistir en el hospedador de igual forma que lo hace la cepa parental. No se observaron diferencias significativas entre los datos obtenidos para una u otra cepa. Para confirmar si las bacterias recuperadas de los pulmones continuaban expresando tanto los factores de avirulencia como los de virulencia realizamos inmunodetecciones sobre proteínas totales de las mismas, enfrentándolas contra sueros anti - flagelina y anti - AC-Hly. Los resultados obtenidos muestran que a lo largo de todo el ensayo, el mutante continúa expresando en forma simultánea el marcador de fase virulenta (AC-Hly) y el de fase avirulenta (flagelina). Estos datos marcan la estabilidad de nuestra construcción, un aspecto esencial a la hora de establecer conclusiones.

El comportamiento *in vivo* de *BbBvgR*<sup>-</sup> indicaría que la expresión de los factores de avirulencia durante la fase virulenta no modifica de manera apreciable la interacción *Bordetella* - hospedador. Este resultado llamó nuestra atención, ya que había sido reportado que la expresión ectópica de un factor de avirulencia como el flagelo en una cepa de *B. bronchiseptica* cultivada en condiciones de virulencia alteraba de manera desfavorable la interacción entre la bacteria y el hospedador, a tal punto que dicho mutante no era capaz de colonizar el tracto respiratorio de ratas (5). Una posible explicación a estas diferencias entre los resultados obtenidos por dichos autores y los nuestros es que *BbBvgR*<sup>-</sup> expresa durante el cultivo en condiciones de fase virulenta el conjunto de factores de avirulencia además de los factores de virulencia, y la cepa antes mencionada solamente expresa un único factor *vrg*, el flagelo. Sin embargo, nuestros resultados son similares a los obtenidos en *B. pertussis*. Merkel y colaboradores (1998) reportaron que la delección del gen *bvgR* en *B. pertussis* no modifica la capacidad de esta bacteria de colonizar los pulmones murinos. Por lo tanto, también en *B. pertussis* la expresión del conjunto de factores de avirulencia no altera la capacidad de este patógeno de colonizar el modelo animal (282). Sin embargo, en este mismo trabajo observaron que la cepa mutante presentaba una menor capacidad de inducir enfermedad. Así, los ratones inoculados con la cepa mutante presentaron una mayor sobrevida que los inoculados con la cepa parental. Las diferencias observadas en el comportamiento del mutante obtenido por nosotros y el de *B. pertussis* pueden deberse a la diferencia en la patogénesis que causan ambas especies en el modelo de infección murino.

Los resultados aquí presentados indican que en *B. bronchiseptica*, al igual que en *B. pertussis*, está presente la proteína BvgR cuya función es la de reprimir la expresión de los factores de avirulencia durante las condiciones de cultivo de la fase virulenta, y

también que la presencia de factores de avirulencia durante la fase virulenta de la bacteria no es perjudicial para la interacción patógeno - hospedador. Este último aspecto reviste gran importancia para la comprensión del rol de la modulación fenotípica en el ciclo infeccioso.

Nuestros resultados nos alejan en parte del modelo que apoya que la expresión de los factores denominados de virulencia resultan ser esenciales para el inicio de la infección mientras que los factores denominados de avirulencia serían los responsables de que este microorganismo sea capaz de persistir tanto en el hospedador desencadenando procesos crónicos (160) como en el medio ambiente (334,295). Más aún, la función de BvgAS sería no sólo la de activar a los factores de virulencia en el momento de infección sino que además se encargaría de reprimir los factores que perturban la colonización de la bacteria en el hospedador. Este modelo cuenta con aceptación quizás por su sencillez pero en la actualidad no descansa en datos acabados que lo soporten en forma definitiva.

Una hipótesis respecto al rol del sistema BvgAS y al requerimiento de los diferentes factores en las diversas etapas del ciclo infeccioso de *B. bronchiseptica* que concuerda con nuestros datos estaría relacionada con el proceso evolutivo de las especies denominadas clásicas que parecen derivar de *B. bronchiseptica*. Así, el sistema BvgAS en un principio parecería que tuvo la misma función para las distintas especies sensando si la bacteria se encontraba dentro o fuera del hospedador de manera que los factores de avirulencia se expresaran sólo fuera del hospedador para permitir la vida de la bacteria en el medio ambiente. Esta función de BvgAS y de los factores de avirulencia parece continuarse para *B. bronchiseptica* ya que este patógeno es capaz de sobrevivir tanto dentro como fuera del hospedador. Para *B. pertussis* no sería esta la situación ya que sólo vive dentro del hospedador. Esta idea estaría de acuerdo con los resultados presentados por Tejada y colaboradores (1996). Estos autores construyeron quimeras del sistema de dos componentes con partes de la secuencia de *B. bronchiseptica* y partes de la de *B. pertussis*, y con este tipo de construcciones pudieron observar que la sensibilidad a los agentes moduladores es más baja para *B. pertussis* que para *B. bronchiseptica* (265). Esto significa que *B. pertussis* requiere de mayor concentración de los agentes moduladores para poder cambiar de fase, comportamiento que indicaría que este patógeno no necesitaría este sistema como un control fino de la regulación de los distintos factores, lo cual estaría asociado al hecho de que *B. pertussis* no vive fuera del hospedador a diferencia de *B. bronchiseptica* que sí lo hace. El hecho distintivo mostrado en este capítulo respecto a que los factores de avirulencia no perjudican ni favorecen ninguna de las etapas de la infección concuerda con la idea de que dentro del hospedador no resulta necesaria la regulación de dichos factores, por lo que para un patógeno que sólo vive dentro del hospedador el sistema BvgAS sería un vestigio evolutivo. Quedaría por investigar qué sucede durante la transmisión del patógeno de hospedador en hospedador; quizás allí la actividad del sistema de dos componentes cobra importancia para las diferentes especies.

# **CONCLUSIONES GENERALES**

## Conclusiones Generales

Las infecciones respiratorias representan uno de los principales problemas de salud entre los niños menores de cinco años de los países en desarrollo. En la Región de las Américas, las infecciones respiratorias se ubican entre las primeras cinco causas de defunción en niños de esas edades y representan la causa principal de enfermedad y consulta a los servicios de salud. Aunque la extensión de estas enfermedades es global, su impacto se refleja con gran disparidad entre los países industrializados y los menos desarrollados. La desnutrición infantil y el grado de acceso a los servicios de salud son elementos claves que explican esta diferencia. Se suma a esta problemática la existencia de infecciones crónicas que conllevan a la presencia de portadores asintomáticos del patógeno, causando la diseminación silenciosa del agente causal de la enfermedad entre la población susceptible.

La etapa de persistencia de la bacteria en el hospedador representa un verdadero problema epidemiológico que debe resolverse para poder erradicar en forma definitiva la enfermedad. En general, las estrategias de prevención contra las infecciones están dirigidas solamente a evitar las primeras etapas de la infección, sin tener en cuenta los estadios de cronicidad. Esto puede deberse en parte a que el conocimiento sobre esta etapa es en general escaso, quizás como consecuencia de la complejidad que el fenómeno en sí mismo reviste y de la diversidad de mecanismos que deben desarrollarse para que el patógeno pueda desencadenarlo. Esto es, procesos de adhesión, multiplicación, daño celular / tisular y luego inducción del proceso infeccioso crónico. Además, en cada una de estas etapas el patógeno debe evadir la respuesta inmune que el hospedador desarrolla ante su presencia. Si bien los mecanismos de evasión del patógeno son justamente los aspectos menos conocidos de la interacción patógeno – hospedador, sí se ha podido observar un fenómeno bastante distribuido entre los microorganismos que está asociado al cambio en el perfil de expresión de diferentes componentes bacterianos (variación antigénica) a lo largo de todo el proceso infeccioso (61,330,372,462). De esta forma, la respuesta montada por el hospedador durante las etapas tempranas de la enfermedad, que está dirigida contra el patógeno que inició la infección, no reconoce al patógeno en el estadio crónico.

*Bordetella bronchiseptica*, un patógeno que produce enfermedades crónicas, parece no ser la excepción ya que es capaz de alternar entre distintas fases fenotípicas o antigénicas a través del sistema de dos componentes BvgAS (21,42,101). Este sistema no sólo regula positivamente la expresión de los genes que codifican para factores de virulencia denominados *vag* (por virulence-activated genes) sino que además regula negativamente la expresión de otro grupo de genes a los que se denomina *vrg* (por virulence repressed genes). En los extremos de dicha variación fenotípica se encuentra por un lado, la fase Bvg<sup>+</sup> o virulenta caracterizada por la expresión de los genes *vag*, que resultan esenciales para el inicio de la infección y por otro la fase Bvg<sup>-</sup> o avirulenta en la que los genes *vag* están reprimidos y los genes *vrg* se están transcribiendo. Las bacterias en fase avirulenta son incapaces de iniciar

una infección pero se ha sugerido que esta fase es la más apta para persistir (84). Este cambio en el perfil de expresión de componentes bacterianos, que se denomina modulación fenotípica, podría contribuir *in vivo* a la inmunoevasión que posibilita la persistencia de la bacteria dentro del hospedador, transformándolo en un portador asintomático. Sin embargo, son pocos los datos experimentales que apoyan esta hipótesis. De hecho sólo se ha podido poner de manifiesto el funcionamiento del sistema BvgAS en condiciones de laboratorio mediante la presencia de determinadas señales externas. No se ha esclarecido todavía el rol del sistema BvgAS durante el proceso infeccioso y menos aún el rol de los factores *vrg* o de avirulencia, si es que lo tienen, durante este ciclo de *B. bronchiseptica*. Sobre estos aspectos es que hemos focalizado el trabajo de Tesis doctoral que aquí se presenta.

Debido a que al momento de iniciar este trabajo la fase avirulenta era considerada la más apta para persistir en condiciones de escasez de nutrientes, nos propusimos analizar particularmente la participación de esta fase y de los factores que se expresan durante la misma en la supervivencia de *B. bronchiseptica*. Para ello construimos por un lado una cepa de *B. bronchiseptica* que se encuentra bloqueada en la fase avirulenta, y por ende no puede pasar a la fase virulenta, y por otro un mutante defectivo en la expresión de un factor de avirulencia, la flagelina, al que denominamos *Bbfla*<sup>-</sup>. De esta forma y con el empleo de estas cepas se esperaba poder definir el rol de la fase avirulenta —en forma global y particularizando en uno de los componentes que la caracterizan— en la supervivencia.

Comenzamos entonces nuestros estudios realizando ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad de *B. bronchiseptica* para persistir en diferentes condiciones nutricionales. Pudimos observar que en condiciones de escasez de nutrientes *B. bronchiseptica* persiste durante largos períodos de tiempo, independientemente del número de bacterias presentes al inicio del cultivo, tal como había sido descrito anteriormente. Sin embargo, el resultado más sorprendente fue que las bacterias que persistían lo hacían en fase virulenta. Más aún, la bacteria bloqueada en fase avirulenta no fue capaz de persistir. Además, la ausencia de un único factor de avirulencia como la flagelina no modificó en ningún aspecto la persistencia de *B. bronchiseptica*. Estos resultados no sólo profundizan el conocimiento de la participación de las fases de virulencia en el ciclo de vida de este patógeno, sino que plantea un nuevo problema desde el punto de vista epidemiológico: *las bacterias que se encuentran en el medio ambiente (en condiciones de escasez de nutrientes) se encontrarían en fase virulenta, que es la fase requerida para iniciar una infección.*

Todos estos datos resultaron sorprendentes por alejarse de la hipótesis más aceptada que presenta a la fase avirulenta como la más capacitada para sobrevivir. Sin embargo, corresponden a ensayos *in vitro* que no pueden generalizarse a lo que ocurre *in vivo*. Es por ello que en la siguiente etapa de este trabajo abordamos el estudio del rol que juegan los **factores de avirulencia** de *B. bronchiseptica* en la infección, y en particular en la persistencia de este patógeno en el hospedador. Para ello empleamos dos herramientas diferentes en sistemas de estudio similares. Una de

ellas consistió en emplear la bacterias defectivas en la expresión del marcador de avirulencia construidas para los ensayos *in vitro* antes descritos y la otra en la construcción de una cepa que expresara simultáneamente factores de virulencia y avirulencia. En ambos casos analizamos el comportamiento de las bacterias en su interacción con el hospedador, ya sea a través de ensayos empleando células de línea o *in vivo* empleando el modelo de infección intranasal en ratones.

Para el primer caso utilizamos el mutante *Bbfla*<sup>-</sup> defectivo en la expresión del marcador flagelina y analizamos su comportamiento en las primeras etapas de la infección. Si bien los ensayos en células de línea y los ensayos *in vivo* empleando el modelo de infección en ratones proporcionan diferente información, se observó que las primeras etapas de la interacción patógeno – hospedador no se vieron modificadas al emplear el mutante defectivo en flagelina. Esto es, la adhesión a células epiteliales y la colonización en pulmones de ratón resultaron ser similares para la cepa parental y para el mutante defectivo. Sin embargo, la etapa de persistencia resultó de diferente duración para la dos cepas. El mutante defectivo en flagelina fue capaz de sobrevivir tanto en células de línea como *in vivo* por períodos más largos de tiempo. Esta diferencia de comportamiento entre la cepa parental y el mutante defectivo nos condujo a pensar, entre otras posibilidades, que el mutante se presenta diferente a la cepa parental dentro del hospedador, o destruye más eficazmente las defensas del hospedador, o utiliza estrategias de evasión de la respuesta inmune del hospedador diferentes a las que utiliza la cepa parental, o una combinación de esas posibilidades.

A fin de evaluar si dentro del hospedador el mutante se mostraba diferente a la cepa parental, realizamos ensayos con sueros de los ratones infectados con *Bbfla*<sup>-</sup> o con la cepa parental. Estos ensayos nos permitieron observar claras diferencias en el perfil de reconocimiento de las proteínas de una u otra cepa. Estas diferencias entre las cepas se extendían al perfil de proteínas secretadas. En particular pudimos identificar dos de las proteínas secretadas exclusivamente por *Bbfla*<sup>-</sup> en fase virulenta, siendo una de ellas el factor de virulencia PRN y otra la proteína característica de fase intermedia BipA. Esta secreción diferencial de proteínas podría ser consecuencia de la propia deficiencia en la estructura del sistema flagelar que al no tener flagelina quedaría simplemente como un pequeño orificio en la membrana por el que se secretarían las proteínas. La secreción de factores de virulencia a través del sistema de secreción flagelar tipo III es un fenómeno que ya ha sido descrito en otros patógenos (142,383). Más allá de si la secreción ocurre a través del sistema flagelar o no, el hecho de que se secreten proteínas en forma diferencial para el mutante permite explicar en parte la mayor persistencia en el modelo animal de infección.

La segunda estrategia que empleamos fue estudiar los factores de avirulencia en su conjunto, pero sobre una cepa que fuera capaz de infectar. Esto no es posible utilizando una cepa salvaje en fase avirulenta ya que al no lograr iniciar una infección resulta inadecuada para esta clase de estudios. Sin embargo, una cepa que expresara simultáneamente ambos tipos de factores permitiría que la infección se inicie, ya que

expresa los factores de virulencia, y permitiría al mismo tiempo analizar el rol de los factores de avirulencia en dicha infección. Obtuvimos entonces un mutante defectivo en el gen regulador *bvgR* que codifica para una proteína represora de los genes *vrg* durante la fase virulenta de la bacteria. Este mutante, denominado  $BbBvgR^-$ , fue capaz de expresar en forma simultánea los factores de virulencia y avirulencia. En este trabajo se realiza la primera descripción de este gen en *B. bronchiseptica*, ya que hasta el momento sólo había sido descrita su funcionalidad en *B. pertussis*. Pudimos determinar que  $BbBvgR^-$  es capaz de expresar el flagelo en condiciones de cultivo de fase virulenta, indicando que esta proteína actuaría como regulador de la transcripción de los genes involucrados en la biosíntesis del flagelo.

En los ensayos *in vitro* e *in vivo* realizados, el mutante  $BbBvgR^-$  se comportó de manera análoga a la cepa parental. Estos resultados indican que la presencia del conjunto de factores de avirulencia durante la fase virulenta de *B. bronchiseptica* no es perjudicial ni beneficiosa en las etapas de la infección analizadas. Es decir la expresión de los factores de avirulencia no alteran la interacción patógeno - hospedador. El consenso actual sobre la participación del sistema BvgAS en el ciclo infeccioso de *Bordetella* considera que este sistema no sólo tiene una función fundamental en activar la expresión de los genes *vag* para que el patógeno pueda producir una infección, sino que también sería crucial en la represión de los genes *vrg*, ya que la expresión ectópica de un factor de avirulencia en fase virulenta se había presentado como perjudicial en la colonización. El comportamiento observado en el mutante  $BbBvgR^-$  indica que dicha represión no es indispensable para que la bacteria logre establecer una infección, al menos en el modelo utilizado. Nuestros resultados parecen contradictorios a los obtenidos empleando la cepa que expresa ectópicamente un factor de avirulencia; sin embargo dicha discrepancia podría deberse a que por un lado, en aquel trabajo se empleó otro modelo de infección (ratas en lugar de ratones) y por otro se trabajó con la expresión de un único factor de avirulencia y no con el conjunto como es nuestro caso.

Los resultados presentados aquí asignarían menor importancia al rol del sistema BvgAS durante el ciclo infeccioso de *B. bronchiseptica* y la sobrevivencia de la bacteria fuera del hospedador. En nuestros estudios la fase virulenta se presenta no sólo como la fase esencial para la infección sino además como la más adaptada a sobrevivir fuera del hospedador. Más aún, la presencia de los factores de avirulencia regulados por este sistema no sería beneficiosa ni perjudicial en la interacción patógeno - hospedador. Queremos destacar sin embargo que la variación antigénica ha sido observada por otros autores (160) pero quizás esté asociada a otros sistemas regulatorios de *Bordetella*, como el sistema de dos componentes Ris, o alguno de los 16 sistemas de dos componentes que se han identificado a partir de la secuenciación del genoma de este patógeno (325,187). Estudios similares a los aquí presentados deberían realizarse sobre estos sistemas a fin de comprender mejor el rol de la variación antigénica en *Bordetella*.

## **REFERENCIAS**

## Referencias

1. **Abramson T., Kedem H., Relman D.A. 2001.** Proinflammatory and proapoptotic activities associated with *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *Infect Immun.* 69:2650-8.
2. **Agiato, L.A., Dyer D.W. 1992.** Siderophore production and membrane alterations by *Bordetella pertussis* in response to iron starvation. *Infect. Immun.* 60:117-23.
3. **Aizawa S.I. 2001.** Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol Lett.* 202:157-64.
4. **Aizawa S.I., Harwood C.S., Kadner R.J. 2000.** Signaling components in bacterial locomotion and sensory reception. *J Bacteriol.* 182:1459-71.
5. **Akerley B.J., Cotter P.A., Miller J.F. 1995.** Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *Bordetella*-host interaction. *Cell.* 80:611-20.
6. **Akerley B.J., Miller J.F. 1993.** Flagellin gene transcription in *Bordetella bronchiseptica* is regulated by the BvgAS virulence control system. *J Bacteriol.* 175:3468-79.
7. **Akerley B.J., Monack D.M., Falkow S., Miller J.F. 1992.** The bvgAS locus negatively controls motility and synthesis of flagella in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol.* 174:980-90.
8. **Aldridge P., Hughes K.T. 2001.** How and when are substrates selected for type III secretion? *Trends Microbiol.* 9:209-14.
9. **Aldridge P., Hughes K.T. 2002.** Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol.* 5:160-5.
10. **Alfano M., Vallanti G., Biswas P., Bovolenta C., Vicenzi E., Mantelli B., Pushkarsky T., Rappuoli R., Lazzarin A., Bukrinsky M., Poli G. 2001.** The binding subunit of pertussis toxin inhibits HIV replication in human macrophages and virus expression in chronically infected promonocytic U1 cells. *J Immunol.* 166:1863-70.
11. **Allen A.G., Isobe T., Maskell D.J. 1998.** Identification and cloning of *waaF* (*rfaF*) from *Bordetella pertussis* and use to generate mutants of *Bordetella* spp. with deep rough lipopolysaccharide. *J Bacteriol.* 180:35-40.
12. **Alonso S., Pethe K., Mielcarek N., Raze D., Locht C. 2001.** Role of ADP-ribosyltransferase activity of *pertussis* toxin in toxin-adhesin redundancy with filamentous hemagglutinin during *Bordetella pertussis* infection. *Infect Immun.* 69:6038-43.
13. **Anderson D.M., Schneewind O. 1997.** A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* 278:1140-3.
14. **Anderson K.V. 2000.** Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol.* 12:13-9.
15. **Anderson T.R., Montie T.C., Murphy M.D., McCarthy V.P. 1989.** *Pseudomonas aeruginosa* flagellar antibodies in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 27:2789-93.
16. **Andersson S.G.E., Kurland C.G. 1998.** Reductive evolution of resident genomes. *Trends Microbiol* 6:263-8.
17. **Antoine R, Alonso S, Raze D, Coutte L, Lesjean S, Willery E, Locht C, Jacob-Dubuisson F. 2000.** New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.*182:5902-5
18. **Aricò B., Beier; Uhl M.A., Miller J.F. 1994.** Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:1163-7.
19. **Aricò B., Gross R., Smida J., Rappuoli R. 1987.** Evolutionary relationships in the genus *Bordetella*. *Mol. Microbiol.* 1:301-8.
20. **Aricò B., Miller J.F., Roy C., Stibitz S., Monack D., Falkow S., Gross R., Rappuoli R. 1989.** Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:6671-5.
21. **Aricò B., Scarlato V., Monack D.M., Falkow S., Rappuoli R. 1991.** Structural and genetic analysis of the bvg locus in *Bordetella* species. *Mol Microbiol.* 5: 2481-91.
22. **Armstrong S.K., Parker C.D. 1986.** Surface proteins of *Bordetella pertussis*: comparison of virulent and avirulent strains and effects of phenotypic modulation. *Infect Immun.* 54: 308-14.
23. **Arp L.H., Cheville N.F. 1984.** Tracheal lesions in young turkeys infected with *Bordetella avium*. *Am J Vet Res.* 45:2196-200.
24. **Bahrani F.K., Johnson D.E., Robbins D., Mobley H.L. 1991.** *Proteus mirabilis* flagella and MR/P fimbriae: isolation, purification, N-terminal analysis, and serum antibody response following experimental urinary tract infection. *Infect Immun.* 59:3574-80.
25. **Banemann A., Gross R. 1997.** Phase variation affects long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in professional phagocytes. *Infect Immun.* 65:3469-73.
26. **Barenkamp S.J., St Geme J.W. 3rd. 1994.** Genes encoding high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* are part of gene clusters. *Infect Immun.* 62:3320-8.
27. **Barry E.M., Weiss A.A., Ehrmann I.E., Gray M.C., Hewlett E.L., Goodwin M.S. 1991.** *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *J Bacteriol.* 173:720-6,

28. **Bassinat L., Gueirard P., Maitre B., Housset B., Gounon P., Guiso N. 2000.** Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 68:1934-41.
29. **Beall B., Sanden G. N. 1995.** A *Bordetella pertussis* *fepA* homologue required for utilization of exogenous ferric enterobactin. *Microbiology* 141:3193-205.
30. **Beall, B. 1998.** Two iron-regulated putative ferric siderophore receptor genes in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis*. *Res. Microbiol.* 149:189-201.
31. **Beattie D.T., Mahan M.J., Mekalanos J.J. 1993.** Repressor binding to a regulatory site in the DNA coding sequence is sufficient to confer transcriptional regulation of the vir-repressed genes (vrg genes) in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 175:519-27.
32. **Beattie D.T., Shahin R., Mekalanos J.J. 1992.** A vir-repressed gene of *Bordetella pertussis* is required for virulence. *Infect Immun.* 60:571-7.
33. **Beier D., Schwarz B., Fuchs T.M., Gross R. 1995.** *In vivo* characterization of the unorthodox BvgS two-component sensor protein of *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol.* 248:596-610.
34. **Belunis C.J., Mdluli K.E., Raetz C.R., Nano F.E. 1992.** A novel 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase from *Chlamydia trachomatis* required for expression of the genus-specific epitope. *J Biol Chem.* 267:18702-7.
35. **Ben Hassen A., Ben Redjeb S. 1995.** Septicemia dissemination factors of Gram negative bacteria. *Tunis Med.* 73:169-73.
36. **Bennett J.C., Hughes C. 2000.** From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperones. *Trends Microbiol.* 8:202-4.
37. **Bergfors E., Trollfors B., Taranger J., Lagergard T., Sundh V., Zackrisson G. 1999.** Parapertussis and pertussis: differences and similarities in incidence, clinical course, and antibody responses. *Int J Infect Dis.* 3:140-6.
38. **Berggard K., Johnsson E., Mooi F.R., Lindahl G. 1997.** *Bordetella pertussis* binds the human complement regulator C4BP: role of filamentous hemagglutinin. *Infect Immun.* 65:3638-43.
39. **Beutler B. 2000.** Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol.* 12:20-6
40. **Blair D.F. 2003.** Flagellar movement driven by proton translocation. *FEBS Lett.* 545:86-95.
41. **Blevess S., Marenne M.N., Detry G., Cornelis G.R. 2002.** Up-regulation of the *Yersinia enterocolitica* yop regulon by deletion of the flagellum master operon *flhDC*. *J Bacteriol.* 184:3214-23.
42. **Bock A., Gross R. 2001.** The BvgAS two-component system of *Bordetella* spp.: a versatile modulator of virulence gene expression. *Int J Med Microbiol.* 291:119-30.
43. **Bock A., Gross R. 2002.** The unorthodox histidine kinases BvgS and EvgS are responsive to the oxidation status of a quinone electron carrier. *Eur J Biochem.* 269: 3479-84.
44. **Bokoch G.M., Gilman A.G. 1984.** Inhibition of receptor-mediated release of arachidonic acid by pertussis toxin. *Cell.* 39: 301-8.
45. **Bordet J., Gengou G. 1909.** Léndotoxine coquelucheuse. *Ann Inst Pasteur (Paris).* 23:415-419.
46. **Boschwitz J.S., van der Heide H.G., Mooi F.R., Relman D.A. 1997.** *Bordetella bronchiseptica* expresses the fimbrial structural subunit gene *fimA*. *J Bacteriol.* 179:7882-5
47. **Boucher P.E., Maris A.E., Yang M.S., Stibitz S. 2003.** The response regulator BvgA and RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain bind simultaneously to different faces of the same segment of promoter DNA. *Mol Cell.* 11:163-73.
48. **Boucher P.E., Menozzi F.D., Loch C. 1994.** The modular architecture of bacterial response regulators. Insights into the activation mechanism of the BvgA transactivator of *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol.* 241:363-77.
49. **Boucher P.E., Murakami K., Ishihama A., Stibitz S. 1997.** Nature of DNA binding and RNA polymerase interaction of the *Bordetella pertussis* BvgA transcriptional activator at the *fha* promoter. *J Bacteriol.* 179:1755-63.
50. **Boucher P.E., Stibitz S. 1995.** Synergistic binding of RNA polymerase and BvgA phosphate to the pertussis toxin promoter of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 177:6486-91.
51. **Boucher P.E., Yang M.S., Schmidt D.M., Stibitz S. 2001.** Genetic and biochemical analyses of BvgA interaction with the secondary binding region of the *fha* promoter of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 183:536-44.
52. **Boursaux-Eude C., Guiso N. 2000.** Polymorphism of repeated regions of pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* 68:4815-7. Erratum in: *Infect Immun* 2000. 68:7214.
53. **Bradford P.G., Rubin R.P. 1985.** Pertussis toxin inhibits chemotactic factor-induced phospholipase C stimulation and lysosomal enzyme secretion in rabbit neutrophils. *FEBS Lett.* 183:317-20.
54. **Bradford, M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54.

55. **Brandt S.J., Dougherty R.W., Lapetina E.G., Niedel J.E. 1985.** Pertussis toxin inhibits chemotactic peptide-stimulated generation of inositol phosphates and lysosomal enzyme secretion in human leukemic (HL-60) cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:3277-80.
56. **Braun V. 2001.** Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol.* 291:67-79.
57. **Brennan M.J., Hannah J.H., Leininger E. 1991.** Adhesion of *Bordetella pertussis* to sulfatides and to the GalNAc beta 4Gal sequence found in glycosphingolipids. *J Biol Chem.* 266:18827-31.
58. **Brickman T.J., J.G. Hansel, M.J. Miller, Armstrong S.K. 1996.** Purification, spectroscopic analysis and biological activity of the macrocyclic dihydroxamate siderophore alcaligin produced by *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Biometals* 9:191-203;
59. **Brockmeier S.L., Register K.B. 2000.** Effect of temperature modulation and *bvg* mutation of *Bordetella bronchiseptica* on adhesion, intracellular survival and cytotoxicity for swine alveolar macrophages. *Vet Microbiol.* 73:1-12.
60. **Brockmeier S.L., Register K.B., Magyar T., Lax A.J., Pullinger G.D., Kunkle R.A. 2002.** Role of the dermonecrotic toxin of *Bordetella bronchiseptica* in the pathogenesis of respiratory disease in swine. *Infect Immun.* 70:481-90.
61. **Brodsky F.M., Lem L., Solache A., Bennett E.M. 1999.** Human pathogen subversion of antigen presentation. *Immunol Rev.* 168:199-215.
62. **Burns D.L. 1999.** Biochemistry of type IV secretion. *Curr Opin Microbiol.* 2: 25-9.
63. **Caroff M., Aussel L., Zarrouk H., Martin A., Richards J.C., Therisod H., Perry M.B., Karibian D. 2001.** Structural variability and originality of the *Bordetella* endotoxins. *J Endotoxin Res.* 7: 63-8.
64. **Caroff M., Brisson J., Martin A., Karibian D. 2000.** Structure of the *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. *FEBS Lett.* 477:8-14.
65. **Caroff M., Chaby R., Karibian D., Perry J., Deprun C., Szabo L. 1990.** Variations in the carbohydrate regions of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides: electrophoretic, serological, and structural features. *J Bacteriol.* 172:1121-8.,
66. **Cassiday P., Sanden G., Heuvelman K., Mooi F., Bisgard K.M., Popovic T. 2000.** Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935-1999. *J Infect Dis.* 182:1402-8.
67. **Charles I., Fairweather N., Pickard D., Beesley J., Anderson R., Dougan G., Roberts M. 1994.** Expression of the *Bordetella pertussis* P.69 pertactin adhesin in *Escherichia coli*: fate of the carboxy-terminal domain. *Microbiology.* 140:3301-8.
68. **Charles I.G., Dougan G., Pickard D., Chatfield S., Smith M., Novotny P., Morrissey P., Fairweather N.F. 1989.** Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:3554-3558.
69. **Chatterji D, Ojha AK. 2001.** Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr Opin Microbiol.* 4:160-5.
70. **Chen W., Alley M.R., Manktelow B.W., Hopcroft D., Bennett R. 1988.** Pneumonia in lambs inoculated with *Bordetella parapertussis*: bronchoalveolar lavage and ultrastructural studies. *Vet Pathol.* 25:297-303.
71. **Cheng HP, Walker GC. 1998.** Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* 180:5183-91.
72. **Cheng L.W., Schneewind O. 2000.** Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods. *Trends Microbiol* 8:214-20.
73. **Choi S.H., Greenberg E.P. 1991.** The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:11115-9.
74. **Chomczynski P. 1992.** One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal Biochem.* 201:134-9.
75. **Cookson B.T., Tyler A.N., Goldman W.E. 1989.** Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Biochemistry.* 28:1744-9.
76. **Cookson B.T., Vandamme P., Carlson L.C., Larson A.M., Sheffield J.V., Kersters K., Spach D.H. 1994.** Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, "*B. hinzii*". *J Clin Microbiol.* 32: 2569-71.
77. **Coote J.G. 1991.** Antigenic switching and pathogenicity: environmental effects on virulence gene expression in *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol.* 137:2493-503.
78. **Cornelis G., Vanootegem J.C., Sluiter C. 1987.** Transcription of the *yop* regulon from *Y. enterocolitica* requires trans acting pYV and chromosomal genes. *Microb Pathog.* 2:367-79.
79. **Cornelis G.R. 1998.** The *Yersinia* deadly kiss. *J Bacteriol.* 180:5495-504.
80. **Costerton J.W. 2001.** Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol.* 9:50-2.
81. **Cotter P.A., DiRita V.J. 2000.** Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu Rev Microbiol* 54:519-65.
82. **Cotter P.A., Jones A.M. 2003.** Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol.* 11:367-73.

83. **Cotter P.A., Miller J.F. 1994.** BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect Immun.* 62:3381-90.
84. **Cotter P.A., Miller J.F. 1997.** A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* bvgS gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens. *Mol Microbiol.* 24: 671-85.
85. **Cotter P.A., Miller J.F. 1998.** *In vivo* and *ex vivo* regulation of bacterial virulence gene expression. *Curr Opin Microbiol.* 1:17-26.
86. **Cotter P.A., Yuk M.H., Mattoo S., Akerley B.J., Boschwitz J., Relman D.A., Miller J.F. 1998.** Filamentous hemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* is required for efficient establishment of tracheal colonization. *Infect Immun.* 66:5921-9.
87. **Coutte L., Alonso S., Reveneau N., Willery E., Quatannens B., Loch C., Jacob-Dubuisson F. 2003.** Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen. *J Exp Med.* 197:735-42.
88. **Coutte L., Antoine R., Drobecq H., Loch C., Jacob-Dubuisson F. 2001.** Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J.* 20:5040-8.
89. **Cover T.L., Tummuru M.K., Cao P., Thompson S.A., Blaser M.J. 1994.** Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem.* 269:10566-73.
90. **Cowell J.L., Hewlett E.L., Manclark C.R. 1979.** Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 25:896-901.
91. **Cundell D.R., Kanthakumar K., Taylor G.W., Goldman W.E., Flak T., Cole P.J., Wilson R. 1994.** Effect of tracheal cytotoxin from *Bordetella pertussis* on human neutrophil function *in vitro*. *Infect Immun.* 62:639-643.
92. **David A.B., Jalilian-Marian A. 1986.** DTP: drug manufacturers' liability in vaccine-related injuries. *J Leg Med.* 7:187-233.
93. **de Bernard M., Arico B., Papini E., Rizzuto R., Grandi G., Rappuoli R., Montecucco C. 1997.** *Helicobacter pylori* toxin VacA induces vacuole formation by acting in the cell cytosol. *Mol Microbiol.* 26:665-74.
94. **Delafuente J., Albo C., Griffith AH. 1989.** Permanent brain damage and pertussis vaccinations: is the end of the saga in sight? *Vaccine* 7:199-210.
95. **de la Fuente J., Albo C., Rodriguez A., Sopena B., Martinez C. 1994.** *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in a patient with AIDS. *Thorax.* 49:719-20.
96. **de Melker H. E., Conyn-van Spaendonck M.A.E., Rümke H.C., van Wijngaarden J.K., Mooi F.R., Schellekens J.F.P. 1997.** *Pertussis* in the Netherlands: an outbreak despite high levels of immunization with whole-cell vaccine. *Emerg. Infect. Dis.* 3:175-178.
97. **de Serres G., Bouliane N., Douville-Fradet M., Duval B. 1995.** *Pertussis* in Quebec: ongoing epidemic since the late 1980s. *Ca. Commun. Dis. Rep.* 15:45-48.
98. **Delisse-Gathoye A.M., Loch C., Jacob F., Raaschou-Nielsen M., Heron I., Ruelle J.L., de Wilde M., Cabezon T. 1990.** Cloning, partial sequence, expression, and antigenic analysis of the filamentous hemagglutinin gene of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 58:2895-905.
99. **Deora R. 2002.** Differential regulation of the *Bordetella bipA* gene: distinct roles for different BvgA binding sites. *J Bacteriol.* 184:6942-51.
100. **Deora R. 2004.** Multiple mechanisms of *bipA* gene regulation by the *Bordetella* BvgAS phosphorelay system. *Trends Microbiol.* 12:63-5.
101. **Deora R., Bootsma H.J., Miller J., Cotter P.A. 2001.** Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Molec Microbiol.* 40:669-83.
102. **Desvaux M., Parham N.J., Henderson I.R. 2004.** The autotransporter secretion system. *Res Microbiol.* 155:53-60.
103. **Di Fabio J.L., Caroff M., Karibian D., Richards J.C., Perry M.B. 1992.** Characterization of the common antigenic lipopolysaccharide O-chains produced by *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *FEMS Microbiol Lett.* 76:275-81.
104. **DiRita V.J., Parsot C., Jander G., Mekalanos J.J. 1991.** Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:5403-7.
105. **Domenighini M., Relman D., Capiou C., Falkow S., Prugnola A., Scarlato V., Rappuoli R. 1990.** Genetic characterization of *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. *Mol Microbiol.* 4:787-800.
106. **Donabedian H. 2003.** Quorum sensing and its relevance to infectious diseases, *Journal of Infection*, Volume 46, Issue 4, Pages 207-14.
107. **D'Orazio S.E., Thomas V., Collins C.M. 1996.** Activation of transcription at divergent urea-dependent promoters by the urease gene regulator UreR. *Mol Microbiol.* 21:643-55.
108. **Dunny G.M., Leonard B.A. 1997.** Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 51:527-64.
109. **Eaton K.A., Suerbaum S., Josenhans C., Krakowka S. 1996.** Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun.* 64:2445-8
110. **Ebert D. 1998.** Experimental evolution of parasites. *Science.* 282:1432-5.

111. **Emsley P., Charles I.G., Fairweather N.F., Isaacs N.W. 1996.** Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature*. 381:90-2.
112. **Everest P., Li J., Douce G., Charles I., De Azavedo J., Chatfield S., Dougan G., Roberts M. 1996.** Role of the *Bordetella pertussis* P.69/pertactin protein and the P.69/pertactin RGD motif in the adherence to and invasion of mammalian cells. *Microbiology*. 142:3261-8.
113. **Ezzell J.W., Dobrogosz W.J., Kloos W.E., Manclark C.R. 1981.** Phase-shift markers in the genus *Bordetella*: loss of cytochrome d-629 in phase IV variants. *Microbios*. 31:171-81.
114. **Farizo K.M., Cafarella T.G., Burns D.L. 1996.** Evidence for a ninth gene, *ptII*, in the locus encoding the *pertussis* toxin secretion system of *Bordetella pertussis* and formation of a PtlI-PtlF complex. *J Biol Chem*. 271:31643-9.
115. **Farizo K.M., Huang T., Burns D.L. 2000.** Importance of holotoxin assembly in Ptl-mediated secretion of *pertussis* toxin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 68:4049-54.
116. **Feng P., Fields P.I., Swaminathan B., Whittam T.S. 1996.** Characterization of nonmotile variants of *Escherichia coli* O157 and other serotypes by using an anti-flagellin monoclonal antibody. *J Clin Microbiol*. 34:2856-9.
117. **Feng P., Sugawara R.J., Schantz A. 1990.** Identification of a common enterobacterial flagellin epitope with a monoclonal antibody. *J Gen Microbiol*. 136:337-42.
118. **Fernández J., Sisti F., Hozbor D.** Manuscrito en preparación.
119. **Fernandez L.A., Berenguer J. 2000.** Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 24:21-44.
120. **Fernandez R.C., Weiss A.A. 1994.** Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun*. 62:4727-38.
121. **Fernandez R.C., Weiss A.A. 1996.** Susceptibilities of *Bordetella pertussis* strains to antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 40:1041-3.
122. **Ferry P. 1910.** A preliminary report of bacterial findings in canine distemper. *Am Vet Rev* 37:499-504.
123. **Fingermann M., Fernández J., Sisti F., Llanos C., Rocca L., Gatti B., Mooi F., Rodriguez M.E., Hozbor D. 2002.** Phenotypic And Genotypic Characterization Of *Bordetella pertussis* Clinical Isolates Obtained In Argentina. Seventh International Symposium on *Pertussis*: Genome, Pathogenesis, and Immunity. Cambridge, UK.
124. **Finlay B.B., Falkow S. 1997.** Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 61:136-69.
125. **Finn T.M., Amsbaugh D.F. 1998.** *Vag8*, a *Bordetella pertussis* *bvg*-regulated protein. *Infect Immun*. 66:3985-9.
126. **Finn T.M., Shahin R., Mekalanos J.J. 1991.** Characterization of vir-activated *TnphoA* gene fusions in *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 59:3273-9.
127. **Finn T.M., Stevens L.A. 1995.** Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol Microbiol*. 16:625-34.
128. **Flak T.A., Goldman W.E. 1996.** Autotoxicity of nitric oxide in airway disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 154:S202-6.
129. **Forde C.B., Shi X., Li J., Roberts M. 1999.** *Bordetella bronchiseptica*-mediated cytotoxicity to macrophages is dependent on *bvg*-regulated factors, including pertactin. *Infect Immun*. 67:5972-8.
130. **Francis N.R., Irikura V.M., Yamaguchi S., DeRosier D.J., Macnab R.M. 1992.** Localization of the *Salmonella typhimurium* flagellar switch protein FliG to the cytoplasmic M-ring face of the basal body. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:6304-8.
131. **Fraser G.M., Gonzalez-Pedrajo B., Tame J.R., Macnab R.M. 2003.** Interactions of FliJ with the *Salmonella* type III flagellar export apparatus. *J Bacteriol*. 185:5546-54.
132. **Fry N.K., Neal S., Harrison T.G., Miller E., Matthews R., George R.C. 2001.** Genotypic variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertactin and *pertussis* toxin in historical and recent clinical isolates in the United Kingdom. *Infect Immun*. 69:5520-8. Erratum in: *Infect Immun*. 69:6564.
133. **Fuchslocher B., Millar L.L., Cotter P.A. 2003.** Comparison of *bipA* alleles within and across *Bordetella* species. *Infect Immun*. 71:3043-52.
134. **Funke G., Hess T., von Graevenitz A., Vandamme P. 1996.** Characteristics of *Bordetella hinzii* strains isolated from a cystic fibrosis patient over a 3-year period. *J Clin Microbiol*. 34:966-9.
135. **Gadea I., Cuenca-Estrella M., Benito N., Blanco A., Fernandez-Guerrero M.L., Valero-Guillen P.L., Soriano F. 2000.** *Bordetella hinzii*, a "new" opportunistic pathogen to think about. *J Infect*. 40:298-9.
136. **Galán J.E., Collmer A. 1999.** Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284:1322-1328.
137. **Gallegos M.T., Schleif R., Bairoch A., Hofmann K., Ramos J.L. 1997.** Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev*. 61:393-410.
138. **Garcia Vescovi E., Soncini F.C., Groisman E.A. 1996.**  $Mg^{2+}$  as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell*. 84: 165-74.

139. **Gentile F., Knipling L.G., Sackett D.L., Wolff J. 1990.** Invasive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. Physical, catalytic, and toxic properties. *J Biol Chem.* 265:10686-92.
140. **Geuijen C.A., Willems R.J., Bongaerts M., Top J., Gielen H., Mooi F.R. 1997.** Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. *Infect Immun.* 65:4222-4228.
141. **Geuijen C.A., Willems R.J., Mooi F.R. 1996.** The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars. *Infect Immun.* 64:2657-65.
142. **Ghelardi E., Celandroni F., Salvetti S., Beecher D.J., Gominet M., Lereclus D., Wong A.C., Senesi S. 2002.** Requirement of flhA for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol.* 184:6424-33.
143. **Giardina P.C., Foster L.A., Musser J.M., Akerley B.J., Miller J.F., Dyer D.W. 1995.** Repression of alcaligin synthesis in *Bordetella bronchiseptica* is associated with phylogenetic lineage. *J Bacteriol.* 177:6058-63.
144. **Glaser P., Ladant D., Sezer O., Pichot F., Ullmann A., Danchin A. 1988.** The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2:19-30.
145. **Glaser P., Sakamoto H., Bellalou J., Ullmann A., Danchin A. 1988.** Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* 7:3997-4004.
146. **Goldman S., Hanski E., Fish F. 1984.** Spontaneous phase variation in *Bordetella pertussis* is a multistep non-random process. *EMBO J.* 3:1353-6.
147. **Goodnow R.A. 1980.** Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Rev.* 44:722-38.
148. **Gordon V.M., Young W.W. Jr, Lechler S.M., Gray M.C., Leppla S.H., Hewlett E.L. 1989.** Adenylate cyclase toxins from *Bacillus anthracis* and *Bordetella pertussis*. Different processes for interaction with and entry into target cells. *J Biol Chem.* 264:14792-6
149. **Grant C.C., Konkil M.E., Cieplak W. Jr, Tompkins L.S. 1993.** Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. *Infect Immun.* 61:1764-71.
150. **Grass S., Buscher A.Z., Swords W.E., Apicella M.A., Barenkamp S.J., Ozchlewski N., St Geme J.W. 3rd. 2003.** The *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin is glycosylated in a process that requires HMW1C and phosphoglucomutase, an enzyme involved in lipooligosaccharide biosynthesis. *Mol Microbiol.* 48:737-51.
151. **Gray M., Szabo G., Otero A.S., Gray L., Hewlett E. 1998.** Distinct mechanisms for K<sup>+</sup> efflux, intoxication, and hemolysis by *Bordetella pertussis* AC toxin. *J Biol Chem.* 273:18260-7.
152. **Greco D., Salmaso S., Mastrantonio P., Giuliano M., Tozzi A.E., Anemona A., Ciofi degli Atti M.L., Giammanco A., Panei P., Blackwelder W.C., Klein D.L., Wassilak S.G. 1996.** A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group. *N Engl J Med.* 334:341-8
153. **Greenlee D.V., Andreasen T.J., Storm D.R. 1982.** Calcium-independent stimulation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase by calmodulin. *Biochemistry.* 21:2759-64.
154. **Groisman E.A. 1998.** The ins and outs of virulence gene expression: Mg<sup>2+</sup> as a regulatory signal. *Bioessays.* 20: 96-101
155. **Gross R., Rappuoli R. 1988.** Positive regulation of *pertussis* toxin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:3913-7.
156. **Gueirard P. 1995.** Infection respiratoire à *Bordetella bronchiseptica*: facteurs impliqués, réponses immunes, conséquences vaccinales. Tesis Doctoral. Université Paris V. Faculté de Médecine Cochin. France.
157. **Gueirard P., Druilhe A., Pretolani M., Guiso N. 1998.** Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection *in vivo*. *Infect Immun.* 66:1718-25
158. **Gueirard P., Guiso N. 1993.** Virulence of *Bordetella bronchiseptica*: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun.* 61:4072-8.
159. **Gueirard P., Le Blay K., Le Coustumier A., Chaby R., Guiso N. 1998.** Variation in *Bordetella bronchiseptica* lipopolysaccharide during human infection. *FEMS Microbiol Lett.* 162:331-337.
160. **Gueirard P., Weber C., Le Coustumier A., Guiso N. 1995.** Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. *J Clin Microbiol.* 33:2002-2006.
161. **Guiso N., Rocancourt M., Szatanik M., Alonso J.M. 1989.** *Bordetella* adenylate cyclase is a virulence associated factor and an immunoprotective antigen. *Microb Pathog.* 7:373-80
162. **Guiso N., Szatanik M., Rocancourt M. 1991.** Protective activity of *Bordetella* adenylate cyclase-hemolysin against bacterial colonization. *Microb Pathog.* 11:423-31
163. **Guzman C.A., Rohde M., Bock M., Timmis K.N. 1994.** Invasion and intracellular survival of *Bordetella bronchiseptica* in mouse dendritic cells. *Infect Immun.* 62:5528-37
164. **Guzman C.A., Rohde M., Timmis K.N. 1994.** Mechanisms involved in uptake of *Bordetella bronchiseptica* by mouse dendritic cells. *Infect Immun.* 62:5538-44.

165. Haas R., Meyer T.F. 1986. The repertoire of silent pilus genes in *Neisseria gonorrhoeae*: Evidence for gene conversion. *Cell* 44:107-115,
166. Hackett M., Guo L., Shabanowitz J., Hunt D.F., Hewlett E.L. 1994. Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science*. 266:433-5.
167. Hall A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 279:509-14143,
168. Hannah J.H., Menozzi F.D., Renaud G., Locht C., Brennan M.J. 1994. Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infect Immun*. 62:5010-9.
169. Harvill E.T., Cotter P.A., Miller J.F. 1999. Pregenomic comparative analysis between *Bordetella bronchiseptica* RB50 and *Bordetella pertussis* tohama I in murine models of respiratory tract infection. *Infect Immun*. 67:6109-18.
170. Harvill E.T., Cotter P.A., Yuk M.H., Miller J.F. 1999. Probing the function of *Bordetella bronchiseptica* adenylate cyclase toxin by manipulating host immunity. *Infect Immun*. 67:1493-500.
171. Harvill E.T., Preston A., Cotter P.A., Allen A.G., Maskell D.J., Miller J.F. 2000. Multiple roles for *Bordetella* lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. *Infect Immun*. 68:6720-8.
172. Hazenbos W.L., van den Berg B.M., Geuijen C.W., Mooi F.R., van Furth R. 1995. Binding of FimD on *Bordetella pertussis* to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases. *J. Immunol*. 1995 155:3972-8.
173. Heiss L.N., Lancaster J.R. Jr, Corbett J.A., Goldman W.E. 1994. Epithelial autotoxicity of nitric oxide: role in the respiratory cytopathology of *pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:267-70.
174. Heiss L.N., Moser S.A., Unanue E.R., Goldman W.E. 1993. Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of *pertussis*. *Infect Immun*. 61:3123-8
175. Hellwig S.M., Rodriguez M.E., Berbers G.A., van de Winkel J.G., Mooi F.R. 2003. Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity. *J Infect Dis*. 188:738-42. Erratum in: *J Infect Dis*. 2004 189:354
176. Henderson I.R., Navarro-Garcia F., Nataro J.P. 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol*. 6:370-8
177. Heveker N., Ladant D. 1997. Characterization of mutant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxins with reduced affinity for calmodulin. Implications for the mechanism of toxin entry into target cells. *Eur J Biochem*. 243:643-9
178. Heymann P., Gerads M., Schaller M., Dromer F., Winkelmann G., Ernst J.F. 2002. The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. *Infect Immun*. 70:5246-55;
179. Hoch J.A. 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol*. 2000 Apr;3(2):165-70.
180. Holden M.T., Ram Chhabra S., de Nys R., Stead P., Bainton N.J., Hill P.J., Manefield M., Kumar N., Labatte M., England D., Rice S., Givskov M., Salmond G.P., Stewart G.S., Bycroft B.W., Kjelleberg S., Williams P. 1999. Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Mol Microbiol*. 33:1254-66.
181. Horiguchi Y., Sugimoto N., Matsuda M. 1993. Stimulation of DNA synthesis in osteoblast-like MC3T3-E1 cells by *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin. *Infect Immun*. 61:3611-5.
182. Horiguchi Y., Sugimoto N., Matsuda M. 1994. *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin stimulates protein synthesis in an osteoblastic clone, MC3T3-E1 cells. *FEMS Microbiol Lett*. 120:19-22.
183. Horiguchi Y., Nakai, T. and Kume, K. 1990. Simplified procedure for purification of *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin. *FEMS Microbiol. Lett*. 66, 39-43;
184. Horsburgh M.J., Ingham E., Foster S.J. 2001. In *Staphylococcus aureus*, fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. *J Bacteriol*. 183:468-75;
185. House D., Bishop A., Parry C., Dougan G., Wain J. 2001. Typhoid fever: pathogenesis and disease. *Curr Opin Infect Dis*. 14:573-8.
186. <http://textbookofbacteriology.net/pathogenesis.html>
187. <http://www.expasy.org>
188. Hueck C.J., 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:379-433
189. Hultgren S.J., Abraham S., Caparon M., Falk P., St Geme J.W. 3rd, Normark S. 1993. Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell*. 4; 73:887-901.
190. Hynes R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 69:11-25.
191. Ishibashi Y., Claus S., Relman D.A. 1994. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J Exp Med*. 180:1225-33.,

192. **Ishibashi Y., Relman D.A., Nishikawa A. 2001.** Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and alpha5beta1 integrin. *Microb Pathog.* 30:279-88.
193. **Isobe T., White K.A., Allen A.G., Peacock M., Raetz C.R., Maskell D.J. 1999.** *Bordetella pertussis* waaA encodes a monofunctional 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase that can complement an *Escherichia coli* waaA mutation. *J Bacteriol.* 181:2648-51.
194. **Jacob-Dubuisson F., Buisine C., Mielcarek N., Clement E., Menozzi F.D., Locht C. 1996.** Amino-terminal maturation of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol.* 19:65-78.
195. **Jacob-Dubuisson F., El-Hamel C., Saint N., Guedin S., Willery E., Molle G., Locht C. 1999.** Channel formation by FhaC, the outer membrane protein involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem.* 274:37731-5.
196. **Jefferson T., Rudin M., DiPietrantonj C. 2003.** Systematic review of the effects of pertussis vaccines in children. *Vaccine.* 21:2003-14.
197. **Jenner, E. 1798.** An Inquiry into the causes and effects of the variolae vaccine. Low, London.
198. **Ji W.S., Hu J.L., Qiu J.W., Peng D.R., Shi B.L., Zhou S.J., Wu K.C., Fan D.M. 2001.** Polymorphism of flagellin A gene in *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol.* 7:783-7.
199. **Jungnitz H., West N.P., Walker M.J., Chhatwal G.S., Guzman C.A. 1998.** A second two-component regulatory system of *Bordetella bronchiseptica* required for bacterial resistance to oxidative stress, production of acid phosphatase, and in vivo persistence. *Infect Immun.* 66:4640-50.
200. **Kahn D, Ditta G. 1991.** Modular structure of FixJ: homology of the transcriptional activator domain with the -35 binding domain of sigma factors. *Mol Microbiol.* 5:987-97.
201. **Kania S.A., Rajeev S., Burns E.H. Jr, Odom T.F., Holloway S.M., Bemis D.A. 2000.** Characterization of fimN, a new *Bordetella bronchiseptica* major fimbrial subunit gene. *Gene.* 256:149-55.
202. **Karimova G., Bellalou J., Ullmann A. 1996.** Phosphorylation-dependent binding of BvgA to the upstream region of the cyaA gene of *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 20:489-96.
203. **Karimova G., Fayolle C., Gmira S., Ullmann A., Leclerc C., Ladant D. 1998.** Charge-dependent translocation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin into eukaryotic cells: implication for the in vivo delivery of CD8(+) T cell epitopes into antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:12532-7.
204. **Karlsson K.A. 2001.** Pathogen-host protein-carbohydrate interactions as the basis of important infections. *Adv Exp Med Biol.* 491:431-43;
205. **Kaslow H.R., Burns D.L. 1992.** Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *FASEB J.* 6:2684-90.
206. **Kattar M.M., Chavez J.F., Limaye A.P., Rassouljian-Barrett S.L., Yarfitz S.L., Carlson L.C., Houze Y., Swanzy S., Wood B.L., Cookson B.T. 2000.** Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the causative agent of fatal septicemia. *J Clin Microbiol.* 38:789-94.
207. **Kennedy M.J., Rosey E.L., Yancey R.J. Jr. 1997.** Characterization of flaA- and flaB- mutants of *Serpulina hyodysenteriae*: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility and intestinal colonization. *FEMS Microbiol Lett.* 153:119-28.
208. **Kerr J.R., Rigg G.P., Matthews R.C., Burnie J.P. 1999.** The Bpel locus encodes type III secretion machinery in *Bordetella pertussis*. *Microb Pathog.* 27:349-67.
209. **Kessler E., Safrin M. 1988.** Synthesis, processing, and transport of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J Bacteriol.* 170:5241-7.
210. **Khelef N., Bachelet C.M., Vargaftig B.B., Guiso N. 1994.** Characterization of murine lung inflammation after infection with parental *Bordetella pertussis* and mutants deficient in adhesins or toxins. *Infect Immun.* 62:2893-900. Erratum en: *Infect Immun* 1994 62:5707.
211. **Khelef N., Guiso N. 1995.** Induction of macrophage apoptosis by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *FEMS Microbiol Lett.* 134:27-32.
212. **Khelef N., Sakamoto H., Guiso N. 1992.** Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microb Pathog.* 12:227-35
213. **Khelef N., Zychlinsky A., Guiso N. 1993.** *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun.* 61:4064-71.
214. **Khelef N., Guiso N. 1995.** Induction of macrophage apoptosis by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *FEMS Microbiol Lett.* 134:27-32.
215. **Kim K.S., Rao N.N., Fraley C.D., Kornberg A. 2002.** Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:7675-80.
216. **King A.J., Berbers G., van Oirschot H.F., Hoogerhout P., Knipping K., Mooi F.R. 2001.** Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity. *Microbiology.* 147:2885-95.
217. **Kinnear S.M., Marques R.R., Carbonetti N.H. 2001.** Differential regulation of Bvg-activated virulence factors plays a role in *Bordetella pertussis* pathogenicity. *Infect Immun.* 69:1983-93.

218. **Kinnear S.M., Boucher P.E., Stibitz S., Carbonetti N.H. 1999.** Analysis of BvgA activation of the pertactin gene promoter in *Bordetella pertussis*. J Bacteriol. 181:5234-41.
219. **Kitten T., Barrera A.V., Barbour A.G. 1993.** Intragenic recombination and a chimeric outer membrane protein in the relapsing fever agent *Borrelia hermsii*. J Bacteriol. 175:2516-22.,
220. **Klauser T., Kramer J., Otzelberger K., Pohlner J., Meyer T.F. 1993.** Characterization of the *Neisseria Iga* beta-core. The essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion. J Mol Biol. 234:579-93.
221. **Kloos W.E., Mohapatra N., Dobrogosz W.J., Ezzell J.W., Manclark C.R., 1981.** Deoxyribonucleotide sequence relationships among *Bordetella* species, Int. J. Syst. Bacteriol. 31:173-6.
222. **Knapp S., Mekalanos J.J. 1988.** Two trans-acting regulatory genes (*vir* and *mod*) control antigenic modulation in *Bordetella pertussis*. J Bacteriol. 170:5059-66.
223. **Koster M., Bitter W., Tommassen J. 2000.** Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. Int J Med Microbiol 290:325-31.
224. **Kubori T., Matsushima Y., Nakamura D., Uralil J., Lara-Tejero M., Sukhan A., Galan J.E., Aizawa S.I. 1998.** Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. Science. 280:602-5.
225. **Kuhn M., Goebel W. 1998.** Host cell signalling during *Listeria monocytogenes* infection. Trends Microbiol. 6:11-5.
226. **Kuroda A., Murphy H., Cashel M., Kornberg A. 1997.** Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 272:21240-3.
227. **Kuwae A., Ohishi M., Watanabe M., Nagai M., Abe A. 2003.** BopB is a type III secreted protein in *Bordetella bronchiseptica* and is required for cytotoxicity against cultured mammalian cells. Cell Microbiol. 5:973-83.
228. **Lacey B.W. 1960.** Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. J Hyg (Lond). 58:57-93.
229. **Lad P.M., Olson C.V., Smiley P.A. 1985.** Association of the N-formyl-Met-Leu-Phe receptor in human neutrophils with a GTP-binding protein sensitive to pertussis toxin. Proc Natl Acad Sci U S A. 82:869-73.
230. **Ladant D. 1988.** Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with calmodulin. Identification of two separated calmodulin-binding domains. J Biol Chem. 263:2612-8.
231. **Ladant D., Michelson S., Sarfati R., Gilles A.M., Predeleanu R., Barzu O. 1989.** Characterization of the calmodulin-binding and of the catalytic domains of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. J Biol Chem. 264:4015-20.
232. **Ladant D., Ullmann A. 1999.** *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. Trends Microbiol. 7:172-6.
233. **Laemmli U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-5.
234. **Lambert-Buisine C, Willery E, Loch C, Jacob-Dubuisson F. 1998.** N-terminal characterization of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. Mol Microbiol. 28:1283-93
235. **Lebbar S., Caroff M., Szabo L., Merienne C., Szilogyi L. 1994.** Structure of a hexasaccharide proximal to the hydrophobic region of lipopolysaccharides present in *Bordetella pertussis* endotoxin preparations. Carbohydr Res. 259:257-75
236. **Lee C.A. 1997.** Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? Trends Microbiol. 5:148-56.
237. **Lee V.T., Schneewind O. 2001.** Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. Genes and Develop 15:1725-52.
238. **Leininger E., Roberts M., Kenimer J.G., Charles I.G., Fairweather N., Novotny P., Brennan M.J. 1991.** Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 88:345-9.
239. **Leslie P.H., Gardner A.D. 1931.** The phases of *Haemophilus pertussis*. J. Hyg. 31:423-34;
240. **Lesnick M.L., Guiney D.G. 2000.** The best defense is a good offense--*Salmonella* deploys an ADP-ribosylating toxin. Trends Microbiol. 9:2-4.
241. **Leusch M.S., Paulaitis S., Friedman R.L. 1990.** Adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*: production, purification, and partial characterization. Infect Immun. 58:3621-6.
242. **Levin B.R. 1996.** The evolution and maintenance of virulence in microparasites. Emerg Infect Dis. 2:93-102.
243. **Li J., Fairweather N.F., Novotny P., Dougan G., Charles I.G. 1992.** Cloning, nucleotide sequence and heterologous expression of the protective outer-membrane protein P.68 pertactin from *Bordetella bronchiseptica*. J Gen Microbiol. 138:1697-705.
244. **Li L.J., Dougan G., Novotny P., Charles I.G. 1991.** P.70 pertactin, an outer-membrane protein from *Bordetella parapertussis*: cloning, nucleotide sequence and surface expression in *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 5:409-17.
245. **Liaudet L., Szabo C., Evgenov O.V., Murthy K.G., Pacher P., Virag L., Mabley J.G., Marton A., Soriano F.G., Kirov M.Y., Bjertnaes L.J., Salzman A.L. 2003.** 2003. Flagellin from gram-negative bacteria is a potent mediator of acute pulmonary inflammation in sepsis. Shock. 19:131-7.

246. Lillehoj E.P., Kim B.T., Kim K.C. 2002. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 282:L751-6.
247. Livey I., Duggleby C.J., Robinson A. 1987. Cloning and nucleotide sequence analysis of the serotype 2 fimbrial subunit gene of *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol*. 1:203-9.
248. Livey I., Wardlaw A.C. 1984. Production and properties of *Bordetella pertussis* heat-labile toxin. *J Med Microbiol*. 17:91-103.23.
249. Lloyd S.A., Sjöström M., Andersson S., Wolf-Watz H. 2002. Molecular characterization of the type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences. *Mol Microbiol* 43:51-9.
250. Lo Re V. 3rd, Brennan P.J., Wadlin J., Weaver R., Nachamkin I. 2001. Infected branchial cleft cyst due to *Bordetella bronchiseptica* in an immunocompetent patient. *J Clin Microbiol*. 39:4210-2.
251. Locht C., Antoine R. 1995. A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit. *Biochimie*. 77:333-40.
252. Locht C., Antoine R., Veithen A., Raze D. 2000. Pertussis toxin: structure-function relationship. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Bacterial proteins toxins, vol 145 Locht C., Antoine R. A proposed mechanism of ADP-ribosylation by the pertussis toxin S1 subunit. 1995. *Biochimie* 77:333-340.
253. Locht C., Geoffroy M.C., Renaud G. 1992. Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the *papC* and *papD* gene families. *EMBO J*. 11:3175-83.
254. Lorenzo-Pajuelo B., Villanueva J.L., Rodriguez-Cuesta J., Vergara-Irigaray N., Bernabeu-Wittel M., Garcia-Curiel A., Martinez de Tejada G. 2002. Cavitory pneumonia in an AIDS patient caused by an unusual *Bordetella bronchiseptica* variant producing reduced amounts of pertactin and other major antigens. *J Clin Microbiol*. 40:3146-54.
255. Losada L., Sussan T., Pak K., Zeyad S., Rozenbaum I., Hutcheson S.W. 2004. Identification of a novel *Pseudomonas syringae* Psy61 effector with virulence and avirulence functions by a HrpL-dependent promoter-trap assay. *Mol Plant Microbe Interact*. 17:254-62.
256. Loveless B.J., Saier M.H. Jr. 1997. A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors. *Mol Membr Biol*. 14:113-23.
257. Luker K.E., Collier J.L., Kolodziej E.W., Marshall G.R., Goldman W.E. 1993. *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin and other muramyl peptides: distinct structure-activity relationships for respiratory epithelial cytopathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:2365-9.
258. Macnab R.M. 1999. The bacterial flagellum: reversible rotary propeller and type III export apparatus. *J Bacteriol*. 181:7149-53.
259. Macnab R. M. 1996. Flagella and motility, p. 123-145. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
260. Makela, P. 2000. Vaccines, coming of age after 200 years. *FEMS Microbiol. Rev*. 24: 9-20.
261. Makhov A.M., Hannah J.H., Brennan M.J., Trus B.L., Kocsis E., Conway J.F., Wingfield P.T., Simon M.N., Steven A.C. 1994. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. A bacterial adhesin formed as a 50-nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in beta strands and turns. *J Mol Biol*. 241:110-24.
262. Makoff A.J., Oxer M.D., Ballantine S.P., Fairweather N.F., Charles I.G. 1990. Protective surface antigen P69 of *Bordetella pertussis*: its characterization and very high level expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)*. 8:1030-3.
263. Manetti R., Arico B., Rappuoli R., Scarlato V. 1994. Mutations in the linker region of BvgS abolish response to environmental signals for the regulation of the virulence factors in *Bordetella pertussis*. *Gene*. 150:123-7. Erratum en: *Gene* 155:147.
264. Manson M.D., Armitage J.P., Hoch J.A., Macnab R.M. 1998. Bacterial locomotion and signal transduction. *J Bacteriol*. 180:1009-22.
265. Martinez de Tejada G., Miller J.F., Cotter P.A. 1996. Comparative analysis of the virulence control systems of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol*. 22:895-908.
266. Martinez de Tejada G., Cotter P.A., Heininger U., Camilli A., Akerley B.J., Mekalanos J.J., Miller J.F. 1998. Neither the Bvg- phase nor the vrg6 locus of *Bordetella pertussis* is required for respiratory infection in mice. *Infect Immun*. 66:2762-8.
267. Mastrantonio P., Spigaglia P., van Oirschot H., van der Heide H.G., Heuvelman K., Stefanelli P., Mooi F.R. 1999. Antigenic variants in *Bordetella pertussis* strains isolated from vaccinated and unvaccinated children. *Microbiology*. 145:2069-75.
268. Masuda M., Minami M., Shime H., Matsuzawa T., Horiguchi Y. 2002. In vivo modifications of small GTPase Rac and Cdc42 by *Bordetella* dermonecrotic toxin. *Infect Immun*. 70:998-1001.
269. Mattoo S., Foreman-Wykert A.K., Cotter P.A., Miller J.F. 2001. Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis. *Front Biosci*. 6:E168-86.

270. **Matsuzawa T., Kashimoto T., Katahira J., Horiguchi Y. 2002.** Identification of a receptor-binding domain of *Bordetella* dermonecrotic toxin. *Infect Immun.* 70:3427-32.
271. **Mattoo S., Miller J.F., Cotter P.A. 2000.** Role of *Bordetella bronchiseptica* fimbriae in tracheal colonization and development of a humoral immune response. *Infect Immun.* 68:2024-33.
272. **Mattsson A., Tinnert A., Hamlet A., Lonroth H., Bolin I., Svennerholm A. M. 1998.** Specific antibodies in sera and gastric aspirates of symptomatic and asymptomatic *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Clin Diagn Lab Immunol.* 5:288-93.
273. **Mazengia E., Silva E.A., Peppe J.A., Timperi R., George H. 2000.** Recovery of *Bordetella holmesii* from patients with pertussis-like symptoms: use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize circulating strains. *J Clin Microbiol.* 38:2330-3.
274. **McGuirk P., Mills K.H. 2000.** Direct anti-inflammatory effect of a bacterial virulence factor: IL-10-dependent suppression of IL-12 production by filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Eur J Immunol.* 30:415-22.
275. **McMillan D.J., M. Shojaei, G.S. Chhatwal, C.A. Guzmán and M.J. Walker, 1996.** Molecular analysis of the *bvg*-repressed urease of *Bordetella bronchiseptica*, *Microbial Pathogenesis* 21:379-94.
276. **McMillan D.J., Mau M., Walker M.J. 1998.** Characterisation of the urease gene cluster in *Bordetella bronchiseptica*. *Gene.* 208:243-51.
277. **McMillan D.J., Medina E., Guzman C.A., Walker M.J. 1999.** Expression of urease does not affect the ability of *Bordetella bronchiseptica* to colonise and persist in the murine respiratory tract. *FEMS Microbiol Lett.* 178:7-11.
278. **Meade B.D., Kind P.D., Ewell J.B., McGrath P.P., Manclark C.R. 1984.** In vitro inhibition of murine macrophage migration by *Bordetella pertussis* lymphocytosis-promoting factor. *Infect Immun.* 45:718-25.
279. **Menestrina G., Moser C., Pellet S., Welch R. 1994.** Pore formation by *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxins family. *Toxicology.* 87:249-67.
280. **Menestrina G., Serra M.D., Prevost G. 2001.** Mode of action of beta barrel pore forming toxins of the staphylococcal alpha hemolysin family. *Toxicon.* 39:1661-72.
281. **Menzio F.D., Mutombo R., Renaud G., Gantiez C., Hannah J.H., Leininger E., Brennan M.J., Locht C. 1994.** Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 62:769-78.
282. **Merkel T.J., Barros C., Stibitz S. 1998.** Characterization of the *bvgR* locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 180:1682-90.
283. **Merkel T.J., Boucher P.E., Stibitz S., Grippe V.K. 2003.** Analysis of *bvgR* Expression in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 185:6902-12.
284. **Merkel T.J., Stibitz S. 1995.** Identification of a locus required for the regulation of *bvg*-repressed genes in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 177:2727-36.
285. **Mesnard R., Guiso N., Michelet C., Sire J.M., Pouedras P., Donnio P.Y., Avril J.L. 1993.** Isolation of *Bordetella bronchiseptica* from a patient with AIDS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 12:304-306.
286. **Middendorf B., Gross R. 1999.** Representational difference analysis identifies a strain-specific LPS biosynthesis locus in *Bordetella* spp. *Mol Gen Genet.* 262:189-98.
287. **Miller E., Ashworth L.A., Redhead K., Thornton C., Waight P.A., Coleman T. 1997.** Effect of schedule on reactivity and antibody persistence of acellular and whole-cell pertussis vaccines: value of laboratory tests as predictors of clinical performance. *Vaccine.* 15:51-60.
288. **Miller J.F. 1996.** Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay. *J Biol Chem.* 271:33176-80.
289. **Miller J.F., Johnson S.A., Black W.J., Beattie D.T., Mekalanos J.J., Falkow S. 1992.** Constitutive sensory transduction mutations in the *Bordetella pertussis* *bvgS* gene. *J Bacteriol.* 174:970-9.
290. **Miller S.I., Kukral A.M., Mekalanos J.J. 1989.** A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:5054-8.
291. **Miller V.L., Taylor R.K., Mekalanos J.J. 1987.** Cholera toxin transcriptional activator *toxR* is a transmembrane DNA binding protein. *Cell.* 48:271-9.
292. **Milton D.L., O'Toole R., Horstedt P., Wolf-Watz H. 1996.** Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol.* 178:1310-9.
293. **Mims Pathogenesis of Infections Diseases. 1995.** Fourth Edition. Stephen Ed. Academic Press. NY.
294. **Minamino T., Macnab R.M. 1999.** Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J Bacteriol.* 181:1388-94.
295. **Mitscherlich E., Ann Marth E. H. 1984.** Bacteria and Rickettsiae important in human and animal health in: *Microbial survival in the environment*, pp. 45-47. Springer-Verlag, Berlin.
296. **Mitscherlich E., Ann Marth E.H. 1984.** Bacteria and Rickettsiae important in human and animal health in: *Microbial survival in the environment*, pp. 45-47. Springer-Verlag, Berlin

297. **Mobley H.L., Hausinger R.P. 1989.** Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol Rev.* 53:85-108.
298. **Mobley H.L., Island M.D., Hausinger R.P. 1995.** Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev.* 59:451-80.
299. **Mock M., Ullmann A. 1993.** Calmodulin-activated bacterial adenylate cyclases as virulence factors. *Trends Microbiol.* 1:187-92.
300. **Moens S., Vanderleyden J. 1996.** Functions of bacterial flagella. *Crit Rev Microbiol.* 22:67-100.
301. **Monack D.M., Falkow S. 1993.** Cloning of *Bordetella bronchiseptica* urease genes and analysis of colonization by a urease-negative mutant strain in a guinea-pig model. *Mol Microbiol.* 10:545-53.
302. **Monack D.M., Arico B., Rappuoli R., Falkow S. 1989.** Phase variants of *Bordetella bronchiseptica* arise by spontaneous deletions in the *vir* locus. *Mol Microbiol.* 3:1719-28.
303. **Montaraz J.A., Novotny P., Ivanyi J. 1985.** Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* 47:744-51.
304. **Mooi F.R., He Q., van Oirschot H., Mertsola J. 1999.** Variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors *pertussis* toxin and *pertactin* in vaccine strains and clinical isolates in Finland. *Infect Immun.* 67:3133-4.
305. **Mooi F.R., Jansen W.H., Brunings H., Gielen H., van der Heide H.G., Walvoort H.C., Guinee P.A. 1992.** Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. *Microb Pathog.* 12:127-35.
306. **Mooi F.R., van Oirschot H., Heuvelman K., van der Heide H.G., Gaastra W., Willems R.J. 1998.** Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/*pertactin* and *pertussis* toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect Immun.* 66:670-5.
307. **Moore, C. H., L. A. Foster, D. G. Gerbig, D. W. Dyer, and B. W. Gibson. 1995.** Identification of alcaligin as the siderophore produced by *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *J. Bacteriol.* 177:1116-8.
308. **Moss J. 1994.** Activation of cholera toxin by ADP-ribosylation factors. *Methods Enzymol.* 235-640-7.
309. **Mouallem M. 1990.** *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect Immun.* 58:3759-64.
310. **Moxon E.R., Rainey P.B., Nowak M.A., Lenski R.E. 1994.** Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Curr Biol.* 4:24-33.
311. **Muller M., Hildebrandt A. 1993.** Nucleotide sequences of the 23S rRNA genes from *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* and *B. avium*, and their implications for phylogenetic analysis. *Nucleic Acids Res.* 21:3320.
312. **Musser J.M., Hewlett E.L., Peppler M.S., Selander R.K. 1986.** Genetic diversity and relationships in populations of *Bordetella* spp. *J Bacteriol.* 166:230-7.
313. **Musser J.M., Rapp V.J., Selander R.K. 1987.** Clonal diversity and host distribution in *Bordetella bronchiseptica*. *J. Bacteriol.* 169:2793-803.
314. **Nataro J.P., Blaser M.J.** Cunningham-Rundles, S. *En Persistent bacterial infections.* 2000 ASM Press, Washington, D. C. p: 3-9.
315. **Nicholson M.L., Beall B. 1999.** Disruption of *tonB* in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis* prevents utilization of ferric siderophores, haemin and haemoglobin as iron sources. *Microbiology* 145:2453-61.
316. **Novotny P. 1990.** Pathogenesis in *Bordetella* species. *J Infect Dis.* 161:581-3.
317. **Novotny P., Chubb A.P., Cownley K., Charles I.G. 1991.** Biologic and protective properties of the 69-kDa outer membrane protein of *Bordetella pertussis*: a novel formulation for an acellular *pertussis* vaccine. *J Infect Dis.* 164:114-22.
318. **O'Gara, J.P., Humphreys H. 2001.** *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol.* 50:582-7.
319. **O'Brien A.D., Tesh V.L., Donohue-Rolfe A., Jackson M.P., Olsnes S., Sandvig K., Lindberg A.A., Keusch G.T. 1992.** Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 180:65-94.
320. **Oda T., Kojima Y., Akaike T., Ijiri S., Molla A., Maeda H. 1990.** Inactivation of chemotactic activity of C5a by the serratal 56-kilodalton protease. *Infect Immun.* 58:1269-72.
321. **O'Loughlin E.V., Robins-Browne R.M. 2001.** Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect.* 3:493-507.
322. **Otero A.S., Yi X.B., Gray M.C., Szabo G., Hewlett E.L. 1995.** Membrane depolarization prevents cell invasion by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J Biol Chem.* 270:9695-7.
323. **Page A.L., Parsot C. 2002.** Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol Microbiol:* 46:1-11.
324. **Papini E., de Bernard M., Milia E., Bugnoli M., Zerial M., Rappuoli R., Montecucco C. 1994.** Cellular vacuoles induced by *Helicobacter pylori* originate from late endosomal compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:9720-4.
325. **Parkhill J., Sebahia M., Preston A., Murphy L.D., Thomson N., Harris D.E., Holden M.T., Churcher C.M., Bentley S.D., Mungall K.L., Cerdeno-Tarraga A.M., Temple L., James K., Harris**

- B., Quail M.A., Achtman M., Atkin R., Baker S., Basham D., Bason N., Cherevach I., Chillingworth T., Collins M., Cronin A., Davis P., Doggett J., Feltwell T., Goble A., Hamlin N., Hauser H., Holroyd S., Jagels K., Leather S., Moule S., Norberczak H., O'Neil S., Ormond D., Price C., Rabinowitsch E., Rutter S., Sanders M., Saunders D., Seeger K., Sharp S., Simmonds M., Skelton J., Squares R., Squares S., Stevens K., Unwin L., Whitehead S., Barrell B.G., Maskell D.J. 2003. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet.* 35:32-40.
326. Passerini De Rossi B.N., Friedman L.E., Darnaud S., De Torres R.A., Franco M.A. 2001. Characterization of intermediate phenotypes induced by chemically undefined laboratory media in virulent *Bordetella bronchiseptica* strains. *J Gen Appl Microbiol.* 47:39-46.
327. Passerini de Rossi B.N., Friedman L.E., Darnaud S., de Torres R.A., Franco M.A. 1997. Flagellin, a major protein present in SDS-PAGE profiles of Sarkosyl-OMP-enriched fractions from *Bordetella bronchiseptica* Bvg- or modulated Bvg+ strains. *Vet Microbiol.* 56:65-77.
328. Pasteur, Louis. 1884. Microbes pathogènes et vaccins, C. R. Congrès périodique international des sciences médicales, 8e session, Copenhague, séance du 10 août 1884, Copenhague, 1886, I, pp. 19-28. - Semaine médicale, IV, 1884, pp. 318-320.
329. Perraud A.L., Weiss V., Gross R. 1999. Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol.* 7:115-20.
330. Pieters J. 2001. Evasion of host cell defense mechanisms by pathogenic bacteria. *Curr Opin Immunol.* 13:37-44.
331. Pittman M. 1984. The concept of *pertussis* as a toxin-mediated disease. *Pediatr Infect Dis.* 3:467-86.
332. Plano G.V., Barve S.S., Straley S.C. 1991. LcrD, a membrane-bound regulator of the *Yersinia pestis* low-calcium response. *J Bacteriol.* 173:7293-303.
333. Plano G.V., Day J.B., Ferracci F. 2001. Type III export: new uses for an old pathway. *Mol Microbiol* 40:284-93.
334. Porter J.F., Wardlaw A.C. 1993. Long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in lakewater and in buffered saline without added nutrients. *FEMS Microbiol Lett.* 110:33-6.
335. Poulsen K., Brandt J., Hjorth J.P., Thogersen H.C., Kilian M. 1989. Cloning and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene (*iga*) of *Haemophilus influenzae* serotype b. *Infect Immun.* 57:3097-105.
336. Pradel E., Guiso N., Loch C. 1998. Identification of AlcR, an AraC-type regulator of alcaligin siderophore synthesis in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* 180:871-80.
337. Pradel E., Guiso N., Menozzi F.D., Loch C. 2000. *Bordetella pertussis* TonB, a Bvg-Independent Virulence Determinant. *Inf. Immun.* 68:1919-27.
338. Pragman A.A., Yarwood J.M., Tripp T.J., Schlievert P.M. 2004. Characterization of Virulence Factor Regulation by SrrAB, a Two-Component System in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 186:2430-8.
339. Prasad S.M., Yin Y., Rodzinski E., Tuomanen E.I., Masure H.R. 1993. Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 61:2780-5.
340. Preston A., Mandrell R.E., Gibson B.W., Apicella M.A. 1996. The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol.* 22:139-80.
341. Preston A., Allen A.G., Cadisch J., Thomas R., Stevens K., Churcher C.M., Badcock K.L., Parkhill J., Barrell B., Maskell D.J. 1999. Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *Bordetellae*. *Infect Immun.* 67:3763-7.
342. Preston A., Maxim E., Toland E., Pishko E.J., Harvill E.T., Caroff M., Maskell D.J. 2003. *Bordetella bronchiseptica* PagP is a Bvg-regulated lipid A palmitoyl transferase that is required for persistent colonization of the mouse respiratory tract. *Mol Microbiol.* 48:725-736.
343. Raffel T.R., Register K.B., Temple L.M. 2000. Incidence of *Bordetella avium* in Wild Birds as Measured by Serology and Tracheal Cultures. 2000 American Society of Microbiology General Meeting Arp y Cheville, 1984.
344. Ramakrishnan G., Zhao J.L., Newton A. 1991. The cell cycle-regulated flagellar gene *flbF* of *Caulobacter crescentus* is homologous to a virulence locus (*lcrD*) of *Yersinia pestis*. *J Bacteriol.* 173:7283-92.
345. Ramphal R., Arora S.K., Ritchings B.W. 1996. Recognition of mucin by the adhesin-flagellar system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med.* 154:S170-4.
346. Rao N.N., Kornberg A. 1996. Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 178:1394-400.
347. Redhead K., Hill T. 1991. Acquisition of iron from transferrin by *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 61:303-7.
348. Redhead K., Hill T., Chart H. 1987. Interaction of lactoferrin and transferrins with the outer membrane of *Bordetella pertussis*. *J. Gen. Microbiol.* 133:891-8.

349. Register K.B., Ackermann M.R. 1997. A highly adherent phenotype associated with virulent Bvg+-phase swine isolates of *Bordetella bronchiseptica* grown under modulating conditions. *Infect Immun.* 65:5295-300.
350. Register K.B., Ducey T.F., Brockmeier S.L., Dyer D.W. 2001. Reduced virulence of a *Bordetella bronchiseptica* siderophore mutant in neonatal swine. *Infect Immun.* 69:2137-43.
351. Regue M., Climent N., Abitio N., Coderch N., Merino S., Izquierdo L., Altarriba M., Tomas J.M. 2001. Genetic characterization of the *Klebsiella pneumoniae* *waa* gene cluster, involved in core lipopolysaccharide biosynthesis. *J Bacteriol.* 183:3564-73.
352. Relman D., Tuomanen E., Falkow S., Golenbock D.T., Saukkonen K., Wright S.D. 1990. Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell.* 61:1375-82.
353. Relman D.A., Domenighini M., Tuomanen E., Rappuoli R., Falkow S. 1989. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:2637-41.
354. Renaud-Mongenie G., Mielcarek N., Cornette J., Schacht A.M., Capron A., Riveau G., Loch C. 1996. Induction of mucosal immune responses against a heterologous antigen fused to filamentous hemagglutinin after intranasal immunization with recombinant *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:7944-9.
355. Riboli B., Pedroni P., Cuzzoni A., Grandi G., de Ferra F. 1991. Expression of *Bordetella pertussis* fimbrial (fim) genes in *Bordetella bronchiseptica*: fimX is expressed at a low level and vir-regulated. *Microb Pathog.* 10:393-403.
356. Roberts M., Fairweather N.F., Leininger E., Pickard D., Hewlett E.L., Robinson A., Hayward C., Dougan G., Charles I.G. 1991. Construction and characterization of *Bordetella pertussis* mutants lacking the vir-regulated P.69 outer membrane protein. *Mol Microbiol.* 5:1393-404.
357. Roberts M., Cropley I., Chatfield S., Dougan G. 1993. Protection of mice against respiratory *Bordetella pertussis* infection by intranasal immunization with P.69 and FHA. *Vaccine* 9: 901-6.
358. Robertson B.D., Meyer T.F. 1992. Genetic variation in pathogenic bacteria. *Trends Genet.* 8:422-7.
359. Rodríguez M.E. 1995. Estudio de los efectores externos que modifican el crecimiento y la expresión antigénica de *Bordetella pertussis* Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.
360. Rogel A., Hanski E. 1992. Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. *J Biol Chem.* 267:22599-605.
361. Rose T., Sebo P., Bellalou J., Ladant D. 1995. Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem.* 270:26370-6.
362. Rose T., Sebo P., Bellalou J., Ladant D. 1995. Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem.* 270:26370-6.
363. Rosenthal R.S., Nogami W., Cookson B.T., Goldman W.E., Folkening W.J. 1987. Major fragment of soluble peptidoglycan released from growing *Bordetella pertussis* is tracheal cytotoxin. *Infect Immun.* 55:2117-20.
364. Roy C.R., Falkow S. 1991. Identification of *Bordetella pertussis* regulatory sequences required for transcriptional activation of the *fhaB* gene and autoregulation of the *bvgAS* operon. *J Bacteriol.* 173:2385-92.
365. Roy C.R., Miller J.F., Falkow S. 1989. The *bvgA* gene of *Bordetella pertussis* encodes a transcriptional activator required for coordinate regulation of several virulence genes. *J Bacteriol.* 171:6338-44.
366. Roy C.R., Miller J.F., Falkow S. 1990. Autogenous regulation of the *Bordetella pertussis* *bvgABC* operon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:3763-7.
367. Rudenko G., Cross M., Borst P. 1998. Changing the end: antigenic variation orchestrated at the telomeres of African trypanosomes. *Trends Microbiol.* 6:113-6.
368. Rudney J.D., Hickey K.L., Ji Z. 1999. Cumulative correlations of lysozyme, lactoferrin, peroxidase, S-IgA, amylase, and total protein concentrations with adherence of oral viridans streptococci to microplates coated with human saliva. *J Dent Res.* 78:759-68.
369. Rudenko G., Cross M., Borst P. 1998. Changing the end: antigenic variation orchestrated at the telomeres of African trypanosomes. *Trends Microbiol.* 6:113-6.
370. Ruoslahti E., Pierschbacher M.D. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 238:491-7.
371. Sakarya S., Ertem G.T., Oncu S., Kocak I., Erol N., Oncu S. 2003. *Escherichia coli* bind to urinary bladder epithelium through nonspecific sialic acid mediated adherence. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 39:45-50.

- 372. Salaun L., Snyder L.A., Saunders N.J. 2003.** Adaptation by phase variation in pathogenic bacteria. *Adv Appl Microbiol.* 52:263-301.
- 373. Sambrook J., Fritsch E.F, Maniatis T. 1989.** Molecular cloning. A laboratory manual. 2da Edición. ColdSpring Harbor Laboratory Press. U.S.A.
- 374. Saukkonen K., Cabellos C., Burroughs M., Prasad S., Tuomanen E. 1991.** Integrin-mediated localization of *Bordetella pertussis* within macrophages: role in pulmonary colonization. *J Exp Med.* 173:1143-9.
- 375. Savelkoul P.H., Kremer B., Kusters J.G., van der Zeijst B.A., Gastra W. 1993.** Invasion of HeLa cells by *Bordetella bronchiseptica*. *Microb Pathog.* 14:161-8.
- 376. Scarlato V., Arico B., Domenighini M., Rappuoli R. 1993.** Environmental regulation of virulence factors in *Bordetella* species. *Bioessays.* 15:99-104.
- 377. Scarlato V., Arico B., Prugnola A., Rappuoli R. 1991.** Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* 10:3971-5.
- 378. Scarlato V., Prugnola A., Arico B., Rappuoli R. 1990.** Positive transcriptional feedback at the bvg locus controls expression of virulence factors in *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:10067.
- 379. Schafer A., Tauch A., Jager W., Kalinowski J., Thierbach G., Puhler A. 1994.** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene.* 145:69-73.
- 380. Schiavo G., Benfenati F., Poulain B., Rossetto O., Polverino de Laureto P., DasGupta B.R., Montecucco C. 1992.** Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature.* 359:832-5.
- 381. Schipper H., Krohne G.F., Gross R. 1994.** Epithelial cell invasion and survival of *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* 62:3008-11.
- 382. Schmidt G., Goehring U.M., Schirmer J., Lerm M., Aktories K. 1999.** Identification of the C-terminal part of *Bordetella* dermonecrotic toxin as a transglutaminase for rho GTPases. *J Biol Chem.* 274:31875-81.
- 383. Schmiel D.H., Young G.M., Miller V.L. 2000.** The *Yersinia enterocolitica* phospholipase gene *yplA* is part of the flagellar regulon. *J Bacteriol.* 182:2314-20.
- 384. Schmitt C.K., Darnell S.C., O'Brien A.D. 1996.** The attenuated phenotype of a *Salmonella typhimurium* flgM mutant is related to expression of FlhC flagellin. *J Bacteriol.* 178:2911-5.
- 385. Schmitt C.K., Ikeda J.S., Darnell S.C., Watson P.R., Bispham J., Wallis T.S., Weinstein D.L., Metcalf E.S., O'Brien A.D. 2001.** Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis. *Infect Immun.* 69:5619-25.
- 386. Schnaitman C.A. 1970.** Examination of the protein composition of the cell envelope of *Escherichia coli* by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Bacteriol.* 104:882-9.
- 387. Schnaitman C.A., Klena J.D. 1993.** Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol Rev.* 57:655-82.
- 388. Schnaitman C.A. 1971.** Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. *J Bacteriol.* 108:545-52.
- 389. Schneider B., Gross R. 2001.** *Bordetella pertussis*: increasing problems with a well-known pathogen and its relatives. *Contrib Microbiol.* 8:123-36.
- 390. Schneider B., Gross R., Haas A. 2000.** Phagosome acidification has opposite effects on intracellular survival of *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *Infect Immun.* 68:7039-48.
- 391. Schneider B., Stubs D., Gross R. 2002.** Identification and genomic organization of gene loci negatively controlled by the virulence regulatory BvgAS two-component system in *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Genet Genomics.* 267:526-35.
- 392. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. 1996.** Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 68:850-8.
- 393. Shigenobu S., Watanabe H., Hattori M., Sakaki Y., Ishikawa H. 2000.** Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. *Nature.* 407:81.
- 394. Shin S, Park C. 1995.** Modulation of flagellar expression in *Escherichia coli* by acetyl phosphate and the osmoregulator OmpR. *J Bacteriol.* 177:4696-702.
- 395. Simon. 1983.** *Technology* 1:784-791.
- 396. Sinha R.K., Rosenthal R.S. 1980.** Release of soluble peptidoglycan from growing conococci: demonstration of anhydro-muramyl-containing fragments. *Infect Immun.* 29:914
- 397. Sisti F., Fernandez J., Rodriguez M.E., Lagares A., Guiso N., Hozbor D.F. 2002.** *In vitro* and *in vivo* characterization of a *Bordetella bronchiseptica* mutant strain with a deep rough lipopolysaccharide structure. *Infect Immun.* 70:1791-8. ;
- 398. Sisti F. 2004.** El lipopolisacárido de *Bordetella bronchiseptica* componente esencial en la colonización y persistencia de este patógeno en el hospedador. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.

399. **Smarda J., Smajs D. 1998.** Colicins--exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiol (Praha)*. 43:563-82
400. **Smith A.M., Guzman C.A., Walker M.J. 2001.** The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS Microbiol Rev.* 25:309-33.
401. **Smith G.A., Portnoy D.A. 1997.** How the *Listeria monocytogenes* ActA protein converts actin polymerization into a motile force. *Trends Microbiol.* 5:272-6;
402. **Smith KD, Ozinsky A. 2002.** Toll-like receptor-5 and the innate immune response to bacterial flagellin. *Curr Top Microbiol Immunol.* 270:93-108.
403. **Smith A.M., Yan H., Groves N., Dalla Pozza T., Walker M.J. 2000.** Co-expression of the *Bordetella pertussis* leader peptidase I results in enhanced processing and expression of the pertussis toxin S1 subunit in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 191:177-82.
404. **Soutourina O.A., Bertin P.N. 2003.** Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 27:505-23
405. **Spangrude G.J., Sacchi F., Hill H.R., Van Epps D.E., Daynes R.A. 1985.** Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by *pertussis* toxin. *J Immunol.* 135:4135-43.
406. **Stainer DW, Scholte MJ. 1970.** A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol.* 63:211-20.
407. **Steed L.L., Setareh M., Friedman R.L. 1991.** Intracellular survival of virulent *Bordetella pertussis* in human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol.* 50:321-30.
408. **Stefanelli P., Mastrantonio P., Hausman S.Z., Giuliano M., Burns D.L. 1997.** Molecular characterization of two *Bordetella bronchiseptica* strains isolated from children with coughs. *J Clin Microbiol.* 35:1550-5.
409. **Steffen P., Goyard S., Ullmann A. 1996.** Phosphorylated BvgA is sufficient for transcriptional activation of virulence-regulated genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* 15:102-9.; Uhl M.A.,
410. **Stenson T.H., Patton A.K., Weiss A.A. 2003.** Reduced glutathione is required for *pertussis* toxin secretion by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 71:1316-20.
411. **Stibitz S., Aaronson W., Monack D., Falkow S. 1989.** Phase variation in *Bordetella pertussis* by frameshift mutation in a gene for a novel two-component system. *Nature.* 338:266-9.
412. **Stibitz S., Yang M.S. 1991.** Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the vir locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 173:4288-96
413. **Stibitz S., Yang M.S. 1997.** Genomic fluidity of *Bordetella pertussis* assessed by a new method for chromosomal mapping. *J Bacteriol.* 179:5820-6
414. **Stockbauer K.E., Foreman-Wykert A.K., Miller J.F. 2003.** *Bordetella* type III secretion induces caspase 1-independent necrosis. *Cell Microbiol.* 5:123-32
415. **Stockbauer K.E., Fuchslocher B., Miller J.F., Cotter P.A. 2001.** Identification and characterization of BipA, a *Bordetella* Bvg-intermediate phase protein. *Mol Microbiol.* 39:65-78
416. **Suzuki T., Lett M.C., Sasakawa C. 1995.** Extracellular transport of VirG protein in *Shigella*. *J Biol Chem.* 270:30874-80.
417. **Suzuki H., Yonekura K., Murata K., Hirai T., Oosawa K., Namba K. 1998.** A structural feature in the central channel of the bacterial flagellar FlIF ring complex is implicated in type III protein export. *J Struct Biol.* 124:104-14.
418. **Sweet C.R., Preston A., Toland E., Ramirez S.M., Cotter R.J., Maskell D.J., Raetz C.R. 2002.** Relaxed acyl chain specificity of *Bordetella* UDP-N-acetylglucosamine acyltransferases. *J Biol Chem.* 277:18281-90.
419. **Szabo C. 2003.** Role of flagellin in the pathogenesis of shock and acute respiratory distress syndrome: therapeutic opportunities. *Crit Care Med.* 31:S39-45.
420. **Tamura M., Nogimori K., Murai S., Yajima M., Ito K., Katada T., Ui M., Ishii S. 1982.** Subunit structure of islet-activating protein, *pertussis* toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry.* 21:5516-22.
421. **Tang Y.W., Hopkins M.K., Kolbert C.P., Hartley P.A., Severance P.J., Persing D.H. 1998.** *Bordetella holmesii*-like organisms associated with septicemia, endocarditis, and respiratory failure. *Clin Infect Dis.* 26:389-92.,
422. **Thanassi D.G., y Hultgren S.J. 2000.** Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Op Cell Biol* 12:420-430.
423. **Tomich M., Griffith A., Herfst C.A., Burns J.L., Mohr C.D. 2003.** Attenuated virulence of a *Burkholderia cepacia* type III secretion mutant in a murine model of infection. *Infect Immun.* 71:1405-15.
424. **Tomich M., Herfst C.A., Golden J.W., Mohr C.D. 2002.** Role of flagella in host cell invasion by *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun.* 70: 1799-1806
425. **Torre D., Pugliese A., Speranza F., Fiori G.P., Perversi L., Marone P., Tambini R. 1993.** Interferon-gamma levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of mice infected with *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis.* 167:762-5.
426. **Torres A.G., Redford P., Welch R.A., Payne S.M. 2001.** TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infect Immun.* 69:6179-85

427. **Trollfors B. 1984.** *Bordetella pertussis* whole cell vaccines--efficacy and toxicity. *Acta Paediatr Scand.* 73:417-25.
428. **Tung W.L., Chow K.C. 1995.** A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genetics.* 11:128-9.
429. **Tuomanen E., Weiss A. 1985.** Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory-epithelial cells. *J Infect Dis.* 152:118-25.
430. **Tuomanen E. 1995.** Can microbial pathogenesis team up with immunology?. *Trends Microbiol.* 3:456-7.
431. **Uhl M.A., Miller J.F. 1996.** Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay. *J Biol Chem.* 271:33176-80.
432. **Uhl M.A., Miller J.F. 1996.** Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J.* 15:1028-36.
433. **Valverde C., Hozbor D.F., Lagares A. 1997.** Rapid preparation of affinity-purified lipopolysaccharide samples for electrophoretic analysis. *Biotechniques.* 22:230-2.
434. **Van Asten F.J., Hendriks H.G., Koninkx J.F., Van der Zeijst B.A., Gaastra W. 2000.** Inactivation of the flagellin gene of *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* strongly reduces invasion into differentiated Caco-2 cells. *FEMS Microbiol Lett.* 185(2):175-9.
435. **Van Damme P., Burgess M. 2004.** Immunogenicity of a combined diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine in adults. *Vaccine.* 22:305-8
436. **van den Akker W.M. 1998.** Lipopolysaccharide expression within the genus *Bordetella*: influence of temperature and phase variation. *Microbiology.* 144:1527-35.
437. **van den Akker W.M. 1997.** *Bordetella bronchiseptica* has a BvgAS-controlled cytotoxic effect upon interaction with epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett.* 156:239-44.
438. **van den Berg B.M., Beekhuizen H., Willems R.J., Mooi F.R., van Furth R. 1999.** Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. *Infect Immun.* 67:1056-62.
439. **Vandamme P., Heyndrickx M., Vancanneyt M., Hoste B., De Vos P., Falsen E., Kersters K., Hinz K.H. 1996.** *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983. *Int J Syst Bacteriol.* 46:849-58,
440. **Vandamme P., Hommez J., Vancanneyt M., Monsieurs M., Hoste B., Cookson B., Wirsing von Konig C.H., Kersters K., Blackall P.J. 1995.** *Bordetella hinzii* sp. nov., isolated from poultry and humans. *Int J Syst Bacteriol.* 45:37-45.
441. **van't Wout J., Burnette W.N., Mar V.L., Rozdzinski E., Wright S.D., Tuomanen E.I. 1992.** Role of carbohydrate recognition domains of pertussis toxin in adherence of *Bordetella pertussis* to human macrophages. *Infect Immun.* 60:3303-8.
442. **Viejo G, de la Iglesia P, Otero L, Blanco MI, Gomez B, De Miguel D, Del Valle A, De la Fuente B. 2002.** *Bordetella bronchiseptica* pleural infection in a patient with AIDS. *Scand J Infect Dis.* 34:628-9.
443. **von Wintzingerode F, Schattke A, Siddiqui RA, Rosick U, Gobel UB, Gross R. 2001.** *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51:1257-65
444. **von Wintzingerode F., Gerlach G., Schneider B., Gross. 2002.** Phylogenetic relationships and virulence evolution in the genus *Bordetella*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 264:177-99.
445. **Wassenaar T. M., B. A. van der Zeijst, R. Ayling y D. G. Newell. 1993.** Colonization of chicks by motility mutants of *Campylobacter jejuni* demonstrates the importance of flagellin A expression. *J Gen Microbiol.* 139:1171-5
446. **Watanabe M., Takimoto H., Kumazawa Y., Amano K. 1990.** Biological properties of lipopolysaccharides from *Bordetella* species. *J Gen Microbiol.* 136:489-93
447. **Watson N., Duniak D.S., Rosey E.L., Slonczewski J.L., Olson E.R. 1992.** Identification of elements involved in transcriptional regulation of the *Escherichia coli* cad operon by external pH. *J Bacteriol.* 174:530-40.
448. **Way S.S., Thompson L.J., Lopes J.E., Hajjar A.M., Kollmann T.R., Freitag N.E., Wilson C.B.** Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and immunity. *Cell Microbiol.* 6:235-42.
449. **Weiss A.A., Falkow S. 1984.** Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 43:263-9.
450. **Weiss A.A., Hewlett E.L., Myers G.A., Falkow S. 1984.** Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis.* 150:219-22.
451. **Weiss A.A., Johnson F.D., Burns D.L. 1993.** Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:2970-4.
452. **Weiss A.A., Melton A.R., Walker K.E., Andraos-Selim C., Meidl J.J. 1989.** Use of the promoter fusion transposon Tn5 lac to identify mutations in *Bordetella pertussis* vir-regulated genes. *Infect Immun.* 57:2674-82.

453. **Welch R. A. 1991.** Pore-forming cytolysins of gram - negative bacteria. *Mol. Microbiol* 5: 521-528.
454. **West N.P., Jungnitz H., Fitter J.T., McArthur J.D., Guzman C.A., Walker M.J. 2000.** Role of phosphoglucomutase of *Bordetella bronchiseptica* in lipopolysaccharide biosynthesis and virulence. *Infect Immun.* 68:4673-80.
455. **Westdijk J, van den Ijssel J, Thalen M, Beuvery C, Jiskoot W. 1997.** Quantification of cell-associated and free antigens in *Bordetella pertussis* suspensions by antigen binding ELISA. *J Immunoassay.* 18:267-84.
456. **Weyant R.S., Hollis D.G., Weaver R.E., Amin M.F., Steigerwalt A.G., O'Connor S.P., Whitney A.M., Daneshvar M.I., Moss C.W., Brenner D.J. 1995.** *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J Clin Microbiol.* 33:1-7.
457. **Willems R.J., van der Heide H.G., Mooi F.R. 1992.** Characterization of a *Bordetella pertussis* fimbrial gene cluster which is located directly downstream of the filamentous haemagglutinin gene. *Mol Microbiol.* 6:2661-71 *Natl Acad Sci U S A.* 86:2637-41.
458. **Williams A.W., Yamaguchi S., Togashi F., Aizawa S.I., Kawagishi I., Macnab R.M. 1996.** Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 178:2960-70.
459. **Wilson J.W., Schurr M.J., LeBlanc C.L., Ramamurthy R., Buchanan K.L., Nickerson C.A. 2002.** Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad Med J.* 78:216-24.
460. **Woestyn S., Sory M.P., Boland A., Lequenne O., Cornelis G.R. 1996.** The cytosolic SycE and SycH chaperones of *Yersinia* protect the region of YopE and YopH involved in translocation across eukaryotic cell membranes. *Mol Microbiol.* 20:1261-71.
461. **Woolfrey B.F., Moody J.A. 1991.** Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin Microbiol Rev.* 4:243-55.
462. **Workman M.L. 2003.** The cellular basis of bacterial infection. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 15:1-11.;
463. **Yabuuchi E., Kawamura Y., Kosako Y., Ezaki T. 1998.** Emendation of genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac) comb. nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian et al.) comb. nov., and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (Ruger and Tan) comb. nov. *Microbiol Immunol.* 42:429-38.
464. **Yang Y., Isberg R.R. 1997.** Transcriptional regulation of the *Yersinia pseudotuberculosis* pH6 antigen adhesin by two envelope-associated components. *Mol Microbiol.* 24:499-510.
465. **Yih W.K., Silva E.A., Ida J., Harrington N., Lett S.M., George H. 1999.** *Bordetella holmesii*-like organisms isolated from Massachusetts patients with *pertussis*-like symptoms. *Emerg Infect Dis.* 5:441-3.
466. **Yonekura K., Maki-Yonekura S., Namba K. 2002.** Growth mechanism of the bacterial flagellar filament. *Res Microbiol.* 153:191-7. Erratum in: *Res Microbiol.* 2002. 153:385.
467. **Young G.M., Schmiel D.H., Miller V.L. 1999.** A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:6456-61.
468. **Young G.M., Badger J.L., Miller V.L. 2000.** Motility is required to initiate host cell invasion by *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun.* 68:4323-6.
469. **Yuk M.H., Harvill E.T., Miller J.F. 1998.** The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol.* 28:945-59.
470. **Yuk M.H., Harvill E.T., Cotter P.A., Miller J.F. 2000.** Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation by the *Bordetella* type III secretion system. *Mol Microbiol.* 35:991-1004.
471. **Zhang, Y.L. and Sekura, R.D. 1991.** Purification and characterization of the heat-labile toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun* 59: 3754-3759.
472. **Zimna K., Medina E., Jungnitz H., Guzman C.A. 2001.** Role played by the response regulator *Ris* in *Bordetella bronchiseptica* resistance to macrophage killing. *FEMS Microbiol Lett.* 201:177-80
473. **Zu T., Manetti R., Rappuoli R., Scarlato V. 1996.** Differential binding of BvgA to two classes of virulence genes of *Bordetella pertussis* directs promoter selectivity by RNA polymerase. *Mol Microbiol.* 21:557-65.