

CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO INFECTANTE DE *BORDETELLA PERTUSSIS*.

MICROBIOLOGÍA CELULAR E INMUNOPROTEÓMICA

APLICADAS AL ESTUDIO DE SU INTERACCIÓN CON EL HOSPEDADOR.

TESIS DOCTORAL

MARIA LAURA PEREZ VIDA KOVICS



M. EUGENIA RODRIGUEZ
DIRECTOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

OSVALDO YANTORNO
CO-DIRECTOR

CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO INFECTANTE DE *BORDETELLA PERTUSSIS*.

MICROBIOLOGÍA CELULAR E INMUNOPROTEÓMICA

APLICADAS AL ESTUDIO DE SU INTERACCIÓN CON EL HOSPEDADOR.

MARIA LAURA PEREZ VIDA KOVICS

CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO INFECTANTE DE *BORDETELLA PERTUSSIS*.
MICROBIOLOGÍA CELULAR E INMUNOPROTEÓMICA APLICADAS AL ESTUDIO DE SU INTERACCIÓN
CON EL HOSPEDADOR.

AUTOR: MARIA LAURA PEREZ VIDA KOVICS



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

TAPA:

FRENTE:

FIGURA SUPERIOR, REPRESENTACIÓN DE *B. PERTUSSIS*, FACTORES DE VIRULENCIA Y SISTEMA BVG.

FIGURA CENTRAL, IMAGEN GEL 2-DE DE PROTEÍNAS TOTALES DE *B. PERTUSSIS*.

FIGURA INFERIOR, REPRESENTACIÓN DE LA ADHESIÓN DE *B. PERTUSSIS* A CÉLULAS EPITELIALES EN PRESENCIA DE ANTICUERPOS.

DORSO:

ADHESIÓN DE *B. PERTUSSIS* A CÉLULAS EPITELIALES RESPIRATORIAS (LÍNEA CELULAR HUMANA A549).

©2007. M. LAURA PEREZ VIDA KOVICS, LA PLATA, BS. AS., ARGENTINA.

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

PARTE DE LOS RESULTADOS PRESENTADOS EN ESTE TRABAJO DE TESIS HAN DADO ORIGEN A LAS SIGUIENTES PUBLICACIONES:

PÉREZ VIDA KOVICS, M. L., SERRA, D., LAMBERTI, Y. AND RODRÍGUEZ, M. E. IRON STRESS INCREASES *B. PERTUSSIS* MUCIN BINDING CAPACITY AND ATTACHMENT TO RESPIRATORY EPITHELIAL CELLS. *FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY*. IN PRESS.

PÉREZ VIDA KOVICS, M. L., PABA, J., LAMBERTI, Y., RICART, C. A., VALLE DE SOUSA, M. AND RODRÍGUEZ, M. E. PROFILING THE *BORDETELLA PERTUSSIS* PROTEOME DURING IRON STARVATION. *JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH*, **2007** JUL; 6 (7): 2518–2528.

PÉREZ VIDA KOVICS, M. L., LAMBERTI, Y., YANTORNO, O. AND RODRÍGUEZ, M. E. ADENYLATE CYCLASE INFLUENCES FILAMENTOUS HAEMAGGLUTININ-MEDIATED ATTACHMENT OF *BORDETELLA PERTUSSIS* TO EPITHELIAL ALVEOLAR CELLS. *FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY*, **2006** OCT; 48 (1): 140-147.

RODRIGUEZ, M. E., HELLWIG S. M., **PÉREZ VIDA KOVICS M. L.**, BERBERS G. A. M. AND VAN DE WINKEL J.G. J. *BORDETELLA PERTUSSIS* ATTACHMENT TO RESPIRATORY EPITHELIAL CELLS CAN BE IMPAIRED BY FIMBRIAE-SPECIFIC ANTIBODIES. *FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY*, **2006** FEB; 46 (1): 39-47.

A MI MAMA, MARIA DEL CARMEN.
POR SU AMOR Y COMPRESIÓN,
POR SU TENACIDAD Y PACIENCIA,
POR SER LA FUERZA IMPULSORA...

MI RECONOCIMIENTO AL CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET), A LA AGENCIA NACIONAL DE PROMOCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA (ANPCYT), AL MINISTERIO DE SALUD Y MEDIO AMBIENTE DE LA NACIÓN, Y A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA POR HABER HECHO POSIBLE LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.

MI AGRADECIMIENTO

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), donde se me permitió realizar este trabajo.

A la Dra. María Eugenia Rodríguez, por compartir su experiencia y conocimientos durante todo este trabajo. Por su dedicación, paciencia, apoyo y confianza. Por alentarme a continuar a pesar de las adversidades. Por escuchar, entender, discutir y compartir tantas veces en estos años.

Al Dr. Osvaldo Yantorno, por su colaboración, confianza y apoyo en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio... en orden cronológico...

Claudia y Ana por ayudarme en los inicios de mi experiencia en el trabajo de laboratorio. Florencia, por compartir los primeros años de éxitos y fracasos entre cromatografías y geles de poliacrilamida, por el apoyo emocional y por amenizar tan gratamente las largas jornadas de trabajo. Diego, Yanina y Alejandro, Gracias!!! Por estar ahí, por compartir las mañanas y tardes de trabajo, las dificultades y los logros, los congresos, los viajes, las entregas, los posters y todo aquello que suma y contribuye a que estos años se transformen en un tiempo inolvidable. Dra. Alejandra Bosch, por permitirme compartir este último tiempo de trabajo con música clásica (a pesar de la oposición del resto del elenco), por su compañía y consejos, desde nuestros rincones... gracias por hacer tan amenas las interminables horas frente a la compu. A los nuevos y futuros integrantes; Diego N., Jimena, Viviana, Marina, Juan... por compartir el lugar de trabajo con la mejor onda. A todos ustedes: por saber escuchar, poner el hombro, levantar el ánimo, por ser tan buena gente, Gracias!

A Julio Figari, por su infinita paciencia conmigo, por su increíble meticulosidad para el trabajo, por enseñarme y por la ayuda en todo lo que pudiera necesitar, Gracias!

A los compañeros del CINDEFI, los de siempre (porque viejos queda feo) y los nuevos, por compartir y dar una mano siempre que fuera necesario.

Al CBSP de Brasilia y al Dr. Marcelo del valle Sousa, por darme la oportunidad de aprender nuevas técnicas y permitir mi estadía en la Universidad de Brasilia.

A Jaime Paba, por enseñarme absolutamente todo lo que sé sobre Proteómica, por compartir conmigo los secretos de la electroforesis bidimensional, por su paciencia, por su ayuda, por su generosidad y profesionalismo, gracias!

A los chicos del IBBM, los compañeros por adopción: Marina, Eduardo, Leticia, Ricardo (Pelado), Fernanda, Alejandra, Cecilia, Karina, Javier, Ricardo (porque él es un pibe también). Gracias por compartir estos años, entre trabajo, visitas de laboratorio, cenas y cumpleaños, y por ayudar en todo lo que pudieron.

A Eva, Natalia y Nicky, por su amistad y por estar presentes a pesar de la distancia.

A Nancy, Enrique y Seba, por compartir todos mis logros, por creer en mí, por apoyarme y ayudarme en todo.

A Agustín, mi amor, por alentarme a continuar siempre, por compartir y aguantar las extensas jornadas de trabajo, por escucharme, por los consejos, por las infinitas veces que me ayudaste con la computadora, por tu amor, tu paciencia, tu comprensión y apoyo sin los cuales nada de esto hubiera sido posible ni remotamente divertido. Infinitas veces, Gracias!!!!!!

A mi Familia. Papá, por enseñarme lo que importa y heredarme la fortaleza necesaria para superar todos los obstáculos. Mis hermanos, Bárbara y Julián, por ser los mejores hermanos que se puede tener, por compartir todos mis logros y por creer en mí, por aguantar y perdonar mi ausencia

durante estos 6 años. Abuela, por tus palabras y consejos, por tu sabiduría, siempre te llevaré conmigo. Mamá, por estar siempre conmigo, por escucharme, por acompañarme, por creer en mí, por aguantar la distancia, por ser incondicional, en fin, por ser mamá y dar todo sin recibir casi nada...

Y, por último, a todas aquellas personas que alguna vez se cruzaron en mi camino y de alguna u otra forma me enseñaron, me ayudaron o compartieron conmigo este viaje, a todos aquellos que dijeron no se puede, es muy difícil, es imposible, o simplemente no... Gracias a todos, porque incluso en el peor momento, lograron ser una chispa que avivó el impulso de superarme a mí misma.

CONTENIDO

ÍNDICE	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ÍNDICE DE TABLAS	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS	XVIII

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 TOS CONVULSA.	4
1.2 EPIDEMIOLOGÍA.	5
1.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS.	6
1.4 <i>B. PERTUSSIS</i> : FACTORES Y FASES DE VIRULENCIA.	7
1.4.1. FACTORES DE VIRULENCIA REGULADOS POR EL SISTEMA BVG.	10
1.4.1.1. Hemaglutinina Filamentosa (FHA).	10
1.4.1.2. Fimbrias (Fim).	11
1.4.1.3. Pertactina (Prn) y otros Autotransportadores.	11
1.4.1.4. Toxina Adenilato Ciclasa (ACT).	12
1.4.1.5. Toxina Dermonecrótica (DNT).	13
1.4.1.6. Toxina Pertussis (PT).	13
1.4.2. FACTORES DE VIRULENCIA NO REGULADOS POR EL SISTEMA BVG.	13
1.4.2.1. Citotoxina Tranqueal (TCT).	13
1.4.2.2. Lipopolisacarido (LPS).	14
1.4.2.3. Sistemas de Captura de Hierro.	14
1.5 PATOGÉNESIS E INMUNIDAD.	19
1.6 VACUNACIÓN.	23
1.7 OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.	24
1.8 REFERENCIAS.	26
2. FACTORES DE VIRULENCIA REGULADOS POR EL SISTEMA BVG. SU PARTICIPACIÓN EN LA COLONIZACIÓN DEL EPITELIO RESPIRATORIO.	40
2.1 INTRODUCCIÓN.	40
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.	41
2.2.1. CEPAS BACTERIANAS.	41
2.2.2. SUEROS Y ANTICUERPOS.	41
2.2.3. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO DE <i>B. PERTUSSIS</i> .	42
2.2.4. CONDICIONES DE CULTIVO DE LÍNEA CELULAR A549.	42
2.2.5. ENSAYOS DE AGLUTINACIÓN.	43
2.2.6. ENSAYO DE ADHESIÓN.	43
2.2.7. DETERMINACIÓN DE INVASIÓN Y SOBREVIDA.	43
2.2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	44
2.3 RESULTADOS.	46
2.3.1. ADHESIÓN DE <i>B. PERTUSSIS</i> A CÉLULAS EPITELIO-ALVEOLARES.	46

2.3.1.1.	Factores de virulencia regulados por Bvg involucrados en la adhesión a células epiteliales.	46
2.3.1.2.	Especificidad de los anticuerpos que bloquean la adhesión bacteriana a células epiteliales.	47
2.3.2.	INVASIÓN Y PERSISTENCIA DE <i>B. PERTUSSIS</i> EN CÉLULAS EPITELIO-ALVEOLARES.	51
2.4	DISCUSIÓN.	54
2.5	CONCLUSIONES.	58
2.6	REFERENCIAS.	60

3. INTERACCIÓN ENTRE FACTORES DE VIRULENCIA DURANTE LA MODULACIÓN DE FASE. SU IMPORTANCIA EN LA COLONIZACIÓN DEL EPITELIO RESPIRATORIO. 66

3.1	INTRODUCCIÓN.	66
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS.	68
3.2.1.	CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.	68
3.2.2.	CONDICIONES DE CULTIVO DE LÍNEA CELULAS A549.	68
3.2.3.	SUEROS Y ANTICUERPOS.	68
3.2.4.	ENSAYO DE ADHESIÓN.	69
3.2.5.	WESTERN BLOT.	69
3.2.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	69
3.3	RESULTADOS.	70
3.3.1.	LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ACT NO AFECTA LA ADHESIÓN DE <i>B. PERTUSSIS</i> A CÉLULAS EPITELIALES.	70
3.3.2.	LA AUSENCIA DE EXPRESIÓN DE ACT NO AFECTA LA EXPRESIÓN DE FHA EN <i>B. PERTUSSIS</i> .	71
3.3.3.	LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE FHA Y ACT EN RESPUESTA A FACTORES MODULADORES AFECTA LA ADHESIÓN DE <i>B. PERTUSSIS</i> A CÉLULAS EPITELIO-ALVEOLARES.	72
3.3.4.	LA EXPRESIÓN DE ACT AFECTA LA ACTIVIDAD ADHESINA DE FHA INHIBIBLE POR HEPARINA.	74
3.4	DISCUSIÓN.	75
3.5	CONCLUSIONES.	78
3.6	REFERENCIAS.	79

4. ADAPTACIÓN FENOTÍPICA A LAS CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y SUS CONSECUENCIAS EN LA INTERACCIÓN DE *B. PERTUSSIS* CON CÉLULAS EPITELIALES. 84

4.1	INTRODUCCIÓN.	84
4.2	MATERIALES Y MÉTODOS.	86
4.2.1.	CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.	86
4.2.2.	DETECCIÓN DE SIDERÓFOROS.	86
4.2.3.	SUEROS Y ANTICUERPOS.	87
4.2.4.	LECTINAS.	87
4.2.5.	CONDICIONES DE CULTIVO DE LÍNEA CELULAR A549.	87
4.2.6.	ENSAYO DE UNIÓN A LECTINAS.	88
4.2.7.	ENSAYO DE UNIÓN A MUCINA.	88
4.2.8.	ENSAYO DE ADHESIÓN.	88
4.2.9.	OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA.	89

4.2.10.	WESTERN BLOT.	89
4.2.11.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	90
4.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	91
4.4	CONCLUSIONES.	99
4.5	REFERENCIAS.	100
5.	PROTEÓMICA COMPARATIVA E INMUNOPROTEÓMICA APLICADA A LA BÚSQUEDA DE FACTORES DE VIRULENCIA E INMUNÓGENOS EXPRESADOS <i>IN VIVO</i> .	104
<hr/>		
5.1	INTRODUCCIÓN.	104
5.2	MATERIALES Y MÉTODOS.	106
5.2.1.	CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.	106
5.2.2.	CONDICIONES DE CULTIVO DE LÍNEA CELULAR A549.	106
5.2.3.	DETECCIÓN DE SIDERÓFOROS.	106
5.2.4.	OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE <i>B. PERTUSSIS</i> .	107
5.2.5.	OBTENCIÓN DE FRACCIÓN ENRIQUECIDA EN PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE <i>B. PERTUSSIS</i> .	107
5.2.6.	ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.	108
5.2.7.	ANÁLISIS DE IMAGEN DE GELES 2-DE.	109
5.2.8.	EXTRACCIÓN Y DIGESTIÓN TRÍPTICA DE PÉPTIDOS.	109
5.2.9.	ESPECTROMETRÍA DE MASA POR DESORCIÓN/IONIZACIÓN MEDIANTE LÁSER ASISTIDA POR MATRIZ (MALDI).	110
5.2.10.	BÚSQUEDA EN BANCO DE DATOS PARA IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS.	110
5.2.11.	ENSAYO DE INMUNODETECCIÓN (DOT BLOT).	111
5.2.12.	OBTENCIÓN DE SUEROS.	111
5.2.13.	ELISA.	112
5.2.14.	ENSAYO DE AGLUTINACIÓN.	112
5.2.15.	ENSAYO DE OPSONIZACIÓN.	112
5.2.16.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	113
5.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	114
5.3.1.	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES REQUERIDAS PARA EL ANÁLISIS 2-DE DE PROTEÍNAS TOTALES Y DE FRACCIÓN ENRIQUECIDA EN PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE <i>B. PERTUSSIS</i> .	114
5.3.1.1.	Tipo de Equipo de isoelectroenfoque (IEF).	114
5.3.1.2.	Gradiente de pH en geles IPG y porcentaje de acrilamida en geles SDS-PAGE.	115
5.3.1.3.	Buffers y Protocolos de solubilización.	115
5.3.1.4.	Método de carga de la muestra en el IPG.	117
5.3.1.5.	Tipo de Protocolo de IEF.	118
5.3.2.	ANÁLISIS COMPARATIVO DEL PROTEOMA DE PROTEÍNAS TOTALES DE <i>B. PERTUSSIS</i> CULTIVADA EN CONDICIONES DE DIFERENTE DISPONIBILIDAD DE HIERRO.	119
5.3.3.	ANÁLISIS COMPARATIVO DEL PROTEOMA DE FRACCIÓN ENRIQUECIDA EN PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE <i>B. PERTUSSIS</i> CULTIVADA EN CONDICIONES DE DIFERENTE DISPONIBILIDAD DE HIERRO.	129
5.3.4.	ANÁLISIS SEROLÓGICO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA INDUCIDAS POR LIMITACIÓN DE HIERRO.	136

5.3.5.	CAPACIDAD ANTIGÉNICA DE LAS PROTEÍNAS IRP1-3 Y AFUA.	137
5.3.6.	ANTICUERPOS ANTI-IRP1-3 Y ANTI-AFUA RECONOCEN ESTRUCTURAS DE SUPERFICIE EN <i>B. PERTUSSIS</i> .	138
5.3.7.	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ANTICUERPOS INDUCIDOS CONTRA IRP1-3 Y AFUA.	139
5.3.7.1.	Actividad Aglutinante de los sueros anti-IRP1-3 y anti-Afua.	139
5.3.7.2.	Actividad Opsonofagocítica de los sueros Anti-IRP1-3 y anti-Afua.	139
5.4	CONCLUSIONES.	141
5.5	REFERENCIAS.	142
<hr/>		
6.	DISCUSIÓN GENERAL	148
6.	DISCUSIÓN GENERAL.	148

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO 1

Fig. 1 Número de casos notificados de tos convulsa en Argentina, 1997-2005.	6
Fig. 2A Fosforilación de BvgAS.	8
Fig. 2B Representación de las fases Bvg ⁺ , Bvg ^l y Bvg ⁻ .	8
Fig. 2C Representación de los promotores clase 1, 2 y 3.	8
Fig. 3 Modelo del mecanismo molecular de la regulación transcripcional del operon <i>alcABCDE/alcRS/fauA</i> de <i>B. pertussis</i> .	16
Fig. 4 Modelo del mecanismo molecular de la regulación transcripcional del operon <i>hurIR/bhuRSTUV</i> de <i>B. pertussis</i> .	18
Fig. 5 Sistemas de captura de hierro de <i>B. pertussis</i> .	19
Fig. 6 Desarrollo de inmunidad contra <i>B. pertussis</i> en hospedadores no inmunes.	21

CAPITULO 2

Fig. 1 Adhesión de <i>B. pertussis</i> a células epitelio-alveolares A549.	46
Fig. 2 Factores de virulencia involucrados en la adhesión de <i>B. pertussis</i> a células epitelio-alveolares.	47
Fig. 3 Efecto de los anticuerpos monoclonales contra FHA, Prn, ACT y Fim (2 y 3) en la adhesión de <i>B. pertussis</i> a células epitelio-alveolares.	48
Fig. 4 Efecto de la presencia de suero inmune depletado de anticuerpos anti-Fim en la adhesión de <i>B. pertussis</i> a células epitelio-alveolares.	50
Fig. 5 Efecto de suero inmune contra <i>B. pertussis</i> en la adhesión a células epitelio-alveolares.	50
Fig. 6 Anticuerpos anti-Fim, efecto de la actividad aglutinante en la adhesión de <i>B. pertussis</i> a células epiteliales.	51
Fig. 7 Persistencia de diferentes cepas de <i>B. pertussis</i> en células epiteliales respiratorias.	53

CAPITULO 3

Fig. 1 Efecto de la presencia de anticuerpos anti-ACT y anti-FHA en la adhesión de <i>B. pertussis</i> a células epitelio-alveolares.	70
Fig. 2 La ausencia de expresión de ACT no afecta la expresión de FHA.	71
Fig. 3 Modulación fenotípica y su efecto en la adhesión de <i>B. pertussis</i> a células epitelio-alveolares humanas.	73
Fig. 4 Efecto de heparina en la adhesión de <i>B. pertussis</i> a células epitelio-alveolares.	74

CAPITULO 4

Fig. 1 Efecto de la limitación en hierro en la adhesión de <i>B. pertussis</i> a células epitelio-alveolares humanas.	91
Fig. 2 Adhesión de <i>B. pertussis</i> , cultivada bajo diferentes condiciones de disponibilidad de hierro, luego del tratamiento con proteinasa K.	92
Fig. 3 Efecto de la presencia de lectinas en la adhesión de <i>B. pertussis</i> a células A549.	93
Fig. 4 El incremento de adhesión a células A549 observado en <i>B. pertussis</i> cultivada en limitación de hierro involucra interacciones de tipo carbohidratos.	94
Fig. 5 La limitación en hierro incrementa la actividad de unión a mucina de <i>B. pertussis</i> .	95
Fig. 6 La adhesión de <i>B. pertussis</i> a células A549 es inhibida por ácido siálico.	96
Fig. 7 Análisis por Western blot de fracción enriquecida en proteínas de membrana externa	

CAPITULO 5

Fig. 1 Electroforesis bidimensional (2-DE) de proteínas totales de <i>B. pertussis</i> . Comparación de equipos para IEF.	115
Fig. 2 Electroforesis bidimensional (2-DE) de proteínas totales de <i>B. pertussis</i> . Comparación de protocolos de solubilización.	116
Fig. 3 Electroforesis bidimensional (2-DE) de proteínas de membrana externa (PME) de <i>B. pertussis</i> . Comparación de buffer de solubilización.	117
Fig. 4 Electroforesis bidimensional (2-DE) de proteínas totales de <i>B. pertussis</i> . Comparación de métodos de carga de la muestra en el IPG.	118
Fig. 5 Electroforesis bidimensional (2-DE) de proteínas de membrana externa (PME) de <i>B. pertussis</i> . Comparación de protocolos de IEF.	119
Fig. 6 Geles 2-DE representativos de proteínas totales lisadas de <i>B. pertussis</i> cultivadas en medio con exceso (SS) y libre de hierro (SS-Fe).	120
Fig. 7 Scatter plots representativos de la correlación entre cada spot de un gel 2-DE de proteínas totales de <i>B. pertussis</i> y su respectivo spot en el gel promedio de una clase.	121
Fig. 8 Proteínas con expresión diferencial en <i>B. pertussis</i> .	121
Fig. 9 Espectros representativos correspondientes a la identificación mediante MALDI-ToF de la proteína PpiB y SodA de <i>B. pertussis</i> .	123
Fig. 10 Alineamiento de las secuencias (AA) de las proteínas PpiB de <i>B. pertussis</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Yersinia pestis</i> .	125
Fig. 11A Comparación del locus <i>afuABC</i> de <i>B. pertussis</i> con el locus <i>hitABC</i> de <i>H. influenzae</i> y <i>fbpABC</i> de <i>N. meningitidis</i> .	127
Fig. 11B Probable sitio de unión de la proteína Fur en el gen <i>afuA</i> de <i>B. pertussis</i> .	127
Fig. 12 Probable sitio de unión de la proteína Fur en el gen <i>irp1-2</i> de <i>B. pertussis</i> .	127
Fig. 13 Esquema ilustrativo de la probable doble funcionalidad de AcnB en función de su homología con AcnB de <i>E. coli</i> .	128
Fig. 14 Geles 2-DE representativos de la fracción enriquecida en PME de <i>B. pertussis</i> cultivada en medio con exceso (SS) y libre de hierro (SS-Fe).	130
Fig. 15 Scatter plots representativos de la correlación entre cada spot de un gel 2-DE de fracción enriquecida en PME de <i>B. pertussis</i> y su respectivo spot en el gel promedio de una clase.	131
Fig. 16 Proteínas con expresión diferencial en fracción enriquecida en PME de <i>B. pertussis</i> .	132
Fig. 17 Espectros representativos correspondientes a la identificación mediante MALDI-ToF MS de la proteína IRP1-5 y MALDI-ToF MS/MS de la proteína IRP1-16 de <i>B. pertussis</i> .	133
Fig. 18 Esquema de las rutas metabólicas en las cuales ArgD de <i>B. pertussis</i> posiblemente participa.	134
Fig. 19 Dot blot de proteínas de fracción enriquecida en PME de <i>B. pertussis</i> con expresión diferencial en limitación de hierro.	137
Fig. 20 Dot blot representativo de anticuerpos generados en ratón contra las proteínas IRP1-3 y AfuA de <i>B. pertussis</i> .	138
Fig. 21 Aglutinación de <i>B. pertussis</i> en presencia de anticuerpos anti-IRP1-3 y AfuA.	140
Fig. 22 Oponización de <i>B. pertussis</i> en presencia de anticuerpos anti-IRP1-3 y AfuA.	140

ÍNDICE DE TABLAS

CAPITULO 1

Tabla 1. Autotransportadores de <i>B. pertussis</i> .	12
Tabla 2. Receptores de <i>B. pertussis</i> dependientes de TonB involucrados en la captura de hierro	17
Tabla 3. Actividad inmunomoduladora de los factores de virulencia de <i>B. pertussis</i> .	22

CAPITULO 2

Tabla 1. Cepas de <i>B. pertussis</i>	41
Tabla 2. Especificidad de anticuerpos de sueros de individuos vacunados contra <i>B. pertussis</i> , su efecto en la adhesión bacteriana.	49
Tabla 3. Invasión de diferentes cepas de <i>B. pertussis</i> a células epiteliales respiratorias A549.	52

CAPITULO 3

Tabla 1. Cepas de <i>B. pertussis</i>	68
---------------------------------------	----

CAPITULO 4

Tabla 1. Efecto de suero de individuos infectados o vacunados en la adhesión de <i>B. pertussis</i> cultivada en diferentes condiciones de disponibilidad de hierro a células epiteliales A549.	98
---	----

CAPITULO 5

Tabla 1. Proteínas totales de <i>B. pertussis</i> identificadas por MALDI-ToF MS.	122
Tabla 2. PME de <i>B. pertussis</i> identificadas por MALDI-ToF MS.	132

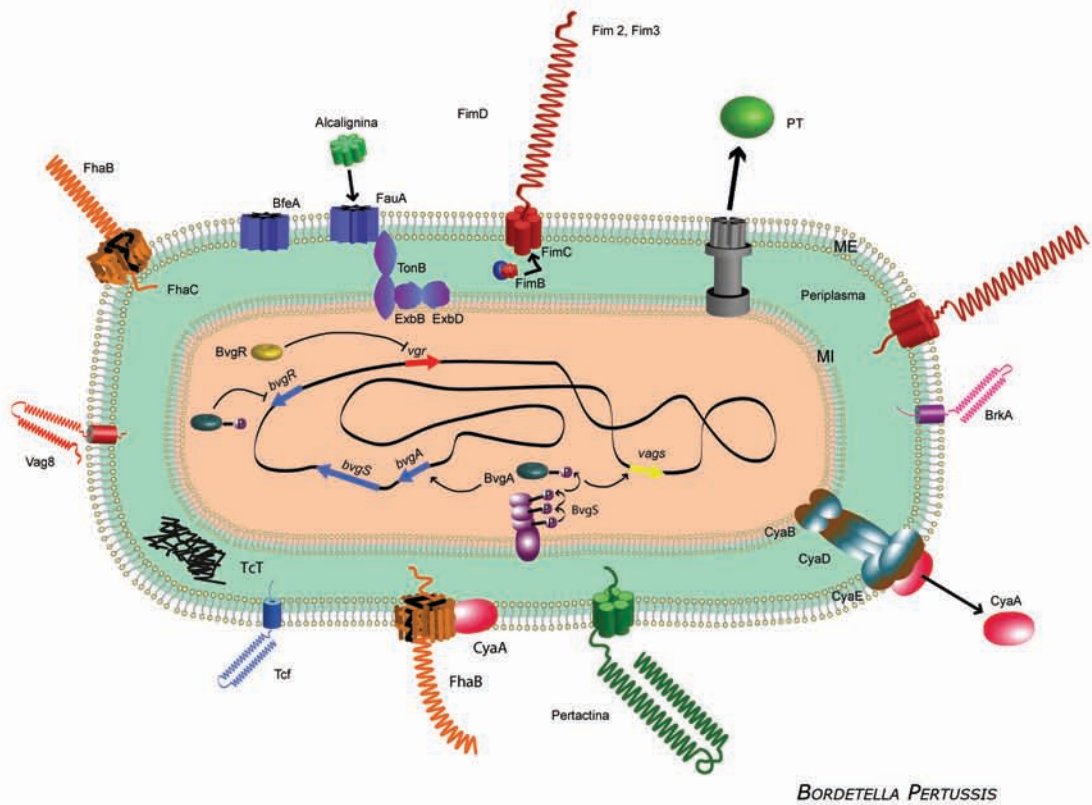
LISTA DE ABREVIATURAS

ABGs	Agar Bordet-Gengou sangre
AC	actividad adenilato ciclasa de ACT
ACT	toxina adenilato ciclasa
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-Benzenesulfonyl Fluoride
AMPc	AMP ciclico
BrkA	factor de resistencia a complemento
BSA	albúmina bovina
BtL	<i>Bryotamnium triquetrum</i> lectina
Bvg	sistema de dos componentes (BvgA, BvgS) de <i>Bordetella</i>
Bvg-	fase avirulenta
Bvg+	fase virulenta
BvgA	activador transcripcional de los genes de virulencia de <i>Bordetella</i>
Bvgi	fase intermedia
BvgR	represor de los genes de virulencia de <i>Bordetella</i>
BvgS	sensor de los genes de virulencia de <i>Bordetella</i>
CID	collision-induced dissociation
CR3	receptor de complemento 3
DC	células dendríticas
DE	desviación estándar
DMEM	medio simple modificado de Dulbecco
DNT	toxina dermonecrótica
DTT	ditiotreitól
FcR	receptor Fc
FHA	hemaglutinina filamentosa
Fim	fimbria
FITC	isotiocianato de fluoresceína
Fur	regulador transcripcional de los genes involucrados en la captura de hierro
GFP	proteína de fluorescencia verde
Hly	actividad hemolisina de ACT
IPG	immobilized pH gradient
LF	lactoferrina
LPS	lipopolisacárido
LsL	<i>Lonchocarpus sericeus</i> lectina
mAc	anticuerpo monoclonal
MALDI	Espectrometría de masa por desorción/ionización mediante láser asistida por matriz
ME	microscopio electrónico
MgSO ₄	sulfato de magnesio
MO	macrófagos
NK	células natural killer
pAc	anticuerpo policlonal
PE	ficoeritrina
Pen/Strep	penicilina/streptomina
pI	punto isoelectrico
PME	proteína de membrana externa
PMN	leucocitos polimorfonucleares
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
Prn	pertactina

PT	toxina pertussis
PVDF	membranas de poli-fluoruro de vinilideno
RGD	arginina-glicina-ácido aspártico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
SS	Stainer-Scholte medio liquido
SS-Fe	Stainer-Scholte medio liquido sin hierro
TcfA	factor de colonización traqueal
TCT	citotoxina tranqueal
TF	transferrina
TFA	trifluoroacético
TLR4	toll like receptor-4
UFC	unidades formadoras de colonias
<i>vag</i>	genes activados en virulencia
<i>vrg</i>	genes reprimidos en virulencia

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN.	4
1.1 TOS CONVULSA.	4
1.2 EPIDEMIOLOGÍA.	5
1.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS.	6
1.4 <i>B. PERTUSSIS</i> : FACTORES Y FASES DE VIRULENCIA.	7
1.4.1. FACTORES DE VIRULENCIA REGULADOS POR EL SISTEMA BVG.	10
1.4.1.1. Hemaglutinina Filamentosa (FHA).	10
1.4.1.2. Fimbrias (Fim).	11
1.4.1.3. Pertactina (Prn) y otros Autotransportadores.	11
1.4.1.4. Toxina Adenilato Ciclasa (ACT).	12
1.4.1.5. Toxina Dermonecrótica (DNT).	13
1.4.1.6. Toxina Pertussis (PT).	13
1.4.2. FACTORES DE VIRULENCIA NO REGULADOS POR EL SISTEMA BVG.	13
1.4.2.1. Citotoxina Tranqueal (TCT).	13
1.4.2.2. Lipopolisacarido (LPS).	14
1.4.2.3. Sistemas de Captura de Hierro.	14
1.5 PATOGÉNESIS E INMUNIDAD.	19
1.6 VACUNACIÓN.	23
1.7 OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.	24
1.8 REFERENCIAS.	26

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 TOS CONVULSA.

La tos convulsa es una enfermedad respiratoria severa, cuyo agente causal es el cocobacilo Gram-negativo *Bordetella pertussis*. Esta bacteria es un patógeno estrictamente humano del cual no se conocen reservorios animales o ambientales. La infección transcurre exclusivamente en el tracto respiratorio y es sumamente contagiosa. Las ocho especies reconocidas del género *Bordetella* son β -protobacterias de la familia *Alcaligenaceae*, de las cuales solo tres de ellas (*B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*) causan infecciones del tracto respiratorio en mamíferos [31, 114].

La primera epidemia registrada ocurrió en París (Francia) en el año 1578 [25]. En el año 1679, Sydenham denominó “pertussis” (*per*, intensa + *tussis*, tos) a esta enfermedad respiratoria que afectaba a lactantes y niños provocando la muerte en muchos casos. Bordet y Gengou realizaron el primer aislamiento de *B. pertussis* a partir de esputo de pacientes en el año 1906 [13]. Entre 1914 y 1923, Hess, Luttinger y Madsen realizaron los primeros ensayos de vacunación anti-pertussis [101]. Las vacunas celulares de uso actual se desarrollaron en la década de 1940-1950. Finalmente, a finales del siglo pasado y debido a los problemas de reactogenicidad asociados al uso de la vacuna celular se desarrollaron vacunas de segunda generación o acelulares compuestas por antígenos purificados.

Si bien la incidencia de esta enfermedad disminuyó en forma drástica a partir de la introducción de la vacuna celular en la década de 1950, continúa siendo un problema de salud pública mundial. Estudios recientes indican que ocurren aproximadamente 48,5 millones de casos de tos convulsa por año en todo el mundo, con un número de casos fatales cercano a 295.000 [36]. La incidencia creciente año tras año en las últimas décadas ha llevado a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a declarar reemergente esta enfermedad. Entre las causas probables de la reemergencia de la tos convulsa puede citarse la insuficiente protección contra la colonización que brindan las vacunas en uso, lo cual habría derivado en la aparición de cepas con variantes polimórficas en antígenos vacunales, es decir, inmunoselección dirigida por vacunación. La reemergencia de esta enfermedad a pesar de las altas tasas de vacunación puso de manifiesto la necesidad de esclarecer aspectos básicos del proceso infeccioso y patogenicidad de *B. pertussis* que permitan el diseño racional de nuevas vacunas y mejores estrategias de prevención con el fin de controlar adecuadamente la circulación de este patógeno y lograr, eventualmente, la erradicación definitiva de la tos convulsa.

1.2 EPIDEMIOLOGÍA.

La tos convulsa es una enfermedad de incidencia mundial, independientemente del clima y la latitud. Es una enfermedad endémica, con picos de aparición cada dos a cinco años. *B. pertussis* se transmite de una persona a otra por medio de las microgotas diseminadas en aerosoles por la tos o el estornudo, o por contacto directo con las secreciones de las vías respiratorias de las personas infectadas. Es una enfermedad muy contagiosa, con tasas de ataque secundario entre los contactos familiares susceptibles de hasta 90 %, y entre 50 % y 80 % en ámbitos escolares.

Aunque la vacunación disminuyó la incidencia de la tos convulsa no ha modificado su periodicidad, lo cual sugiere que las vacunas de uso actual controlan la enfermedad, esto es, evitan la sintomatología asociada a la fase tóxica, pero no logran disminuir adecuadamente la circulación del microorganismo en la población [55].

Desde las últimas dos décadas, existe un lento pero permanente resurgimiento de esta enfermedad [40]. Aún en países con programas de vacunación extensos y elevada cobertura, ha ocurrido un cambio en la epidemiología en lo que se refiere al número y rango etario de aparición de casos, con un importante incremento en la proporción de casos reportados en adolescentes y adultos. Estudios recientes indican que los adolescentes y adultos infectados constituyen un reservorio importante y fuente de transmisión para los lactantes y niños parcialmente inmunizados [39, 41, 115].

El cambio epidemiológico es probablemente multifactorial: inmunidad deficiente contra la colonización, inmunoselección de cepas más virulentas dirigida por vacunación y esquemas de vacunación inadecuados, entre otros [115, 186]. Un factor particularmente importante es que la inmunidad adquirida por vacunación o infección confiere protección solo durante un corto plazo (*waning immunity*). En el caso de la vacuna celular, la inmunidad comienza a declinar luego de 3 a 5 años, con ausencia de protección demostrable luego de 10 a 12 años [71]. La duración de la protección con la vacuna acelular no ha sido establecida aún, pero aparentemente la inmunidad declinaría luego de 4 a 5 años [71, 186].

Esta tendencia epidemiológica mundial también se registra en Argentina (**Fig. 1**). A pesar de la elevada cobertura de vacunación se detectó un aumento del 46 % en el número de casos totales en el 2003 respecto al 2002, registrándose un incremento del 115 % en menores de 1 año y del 64 % en niños de 2 a 4 años. Esta tendencia continuó en los años subsiguientes. Un estudio reciente demostró que, de manera similar a lo observado en otros países, las cepas circulantes en la población presentan variaciones polimórficas respecto a la cepa vacunal en regiones inmunodominantes de los principales antígenos presentes en las vacunas [56]. Mas aún, las variantes alélicas que prevalecen coinciden con aquellas que se detectan en todo el mundo, lo cual refuerza la

hipótesis de que la circulación permanente de este patógeno en la población permitió la inmunoselección de cepas resistentes dirigida por vacunación.

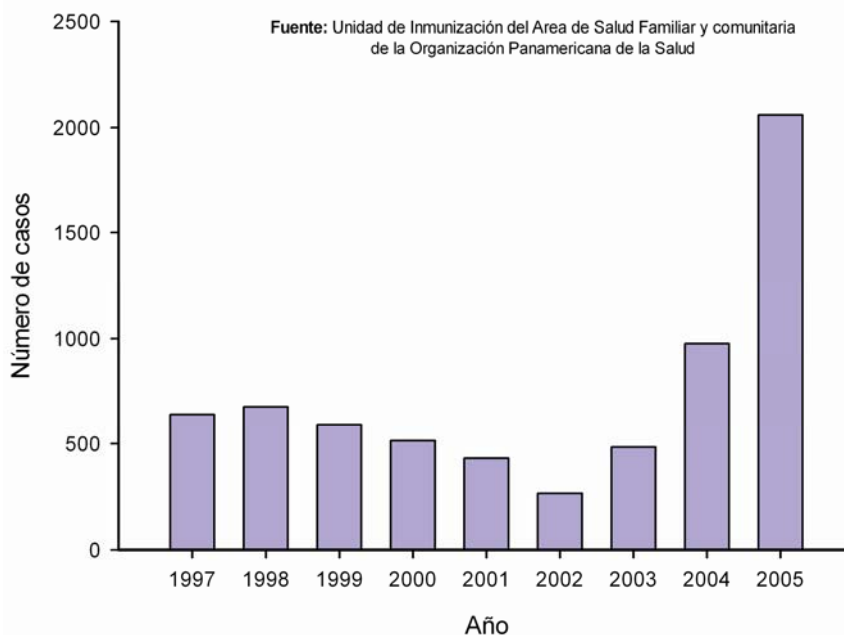


Fig. 1 Número de casos notificados de tos convulsa en Argentina, 1997-2005.

1.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

Luego de un período de incubación de 7 a 10 días, pueden definirse tres estadios clínicos o fases durante el curso de la enfermedad: catarral, paroxística, y de convalecencia [31].

Durante la fase catarral se presenta catarro, lagrimeo y tos suave. La tasa de contagio es muy elevada durante esta fase y en las dos primeras semanas después de la aparición de la tos. Superado este periodo (7 a 14 días), la tos empeora en frecuencia y magnitud. La fase paroxística se caracteriza por ataques de tos repetidos con múltiples expectoraciones violentas durante una exhalación simple (evento paroxístico). Al final del paroxismo, ocurre un esfuerzo de inspiración intenso durante el cual sobreviene el clásico graznido que dio nombre a esta enfermedad. En conjunción con un paroxismo, se observa también cianosis, salivación, lagrimeo y vómitos.

Entre las complicaciones comunes de esta enfermedad se incluyen: neumonía, otitis media, convulsiones, y encefalopatías. La neumonía puede ser un evento primario en respuesta a la infección por *B. pertussis* o puede resultar de una infección secundaria con otros patógenos. Las convulsiones y encefalopatía se deben probablemente a la hipoxia cerebral asociada con los paroxismos severos.

La fase paroxística puede durar entre 2 y 8 semanas. La transición a la fase de convalecencia es gradual y se asocia con la disminución en frecuencia y severidad de los eventos paroxísticos. La convalecencia usualmente perdura 1 a 2 semanas.

En infecciones por contacto dentro de grupos familiares, los casos asintomáticos son comunes y se presentan como una enfermedad respiratoria leve (catarro, lagrimeo, estornudos, conjuntivitis, irritación de la garganta, o tos de más de 21 días de duración) [105, 106]. En general, las infecciones inaparentes o afecciones respiratorias leves ocurren en niños previamente vacunados o en adultos [42, 77, 78]. El 21 % de los casos de tos persistente sin causa aparente se confirman finalmente como tos convulsa.

La mayoría de los casos de muerte por infección con *B. pertussis* ocurren en infantes, especialmente durante el primer año de vida. La fuente de infección para infantes son frecuentemente miembros del grupo familiar, tanto adolescentes como adultos [6, 12, 36, 46]. Las infecciones neonatales son particularmente severas, con un riesgo de muerte cercano al 3 % [11, 43, 88, 117]. En estos casos, el síntoma inicial suele ser apnea. Las convulsiones debidas a la hipoxia resultante de la apnea son comunes. En infantes, la severidad de la enfermedad y el riesgo de muerte muestran cierta correlación con la manifestación de leucocitosis. La tos convulsa causa linfocitosis aguda con recuentos de linfocitos > 20.000 células ml^{-1} [11, 125], particularidad que la caracteriza.

1.4 *B. PERTUSSIS*: FACTORES Y FASES DE VIRULENCIA.

B. pertussis posee una amplia variedad de factores de virulencia que están asociados con su habilidad para infectar al hospedador. La expresión de la mayoría de estos factores de virulencia se altera o modula en respuesta a cambios del medio ambiente. Esta *modulación fenotípica* o *variación de fase* depende del locus *bvgAS* (*bordetella virulence genes*). **BvgA**, un regulador transcripcional, y **BvgS**, un sensor híbrido anclado a la membrana interna, conforman un sistema de transducción de señales de dos componentes. La activación de **BvgAS** implica un mecanismo de fosfo-transferencia de cuatro pasos (His-Asp-His-Asp) (**Fig. 2A**) [30, 32]. *In vitro*, BvgAS se activa cuando la bacteria crece a 37 °C en un medio de cultivo *standard* y se inactiva a temperaturas de cultivo menores a 26 °C o en presencia de concentraciones milimolares de MgSO_4 o ácido nicotínico. Las señales *in vivo* involucradas en la regulación de BvgAS aún no han sido esclarecidas.

Aunque originalmente se identificó como un regulador positivo de la transcripción de los genes de virulencia [177], estudios recientes demostraron que BvgAS también controla la expresión de cientos de genes diferentes cuyos productos participan en una amplia variedad de actividades celulares incluyendo sistemas de transporte y expresión de toxinas y adhesinas, metabolismo, y regulación transcripcional [89]. Así, en vez de funcionar como un mecanismo de tipo ON/OFF, BvgAS funciona como un “reóstato” capaz de controlar la expresión de distintas fases fenotípicas en respuesta a diferencias sutiles en las condiciones del medio ambiente [29, 32].

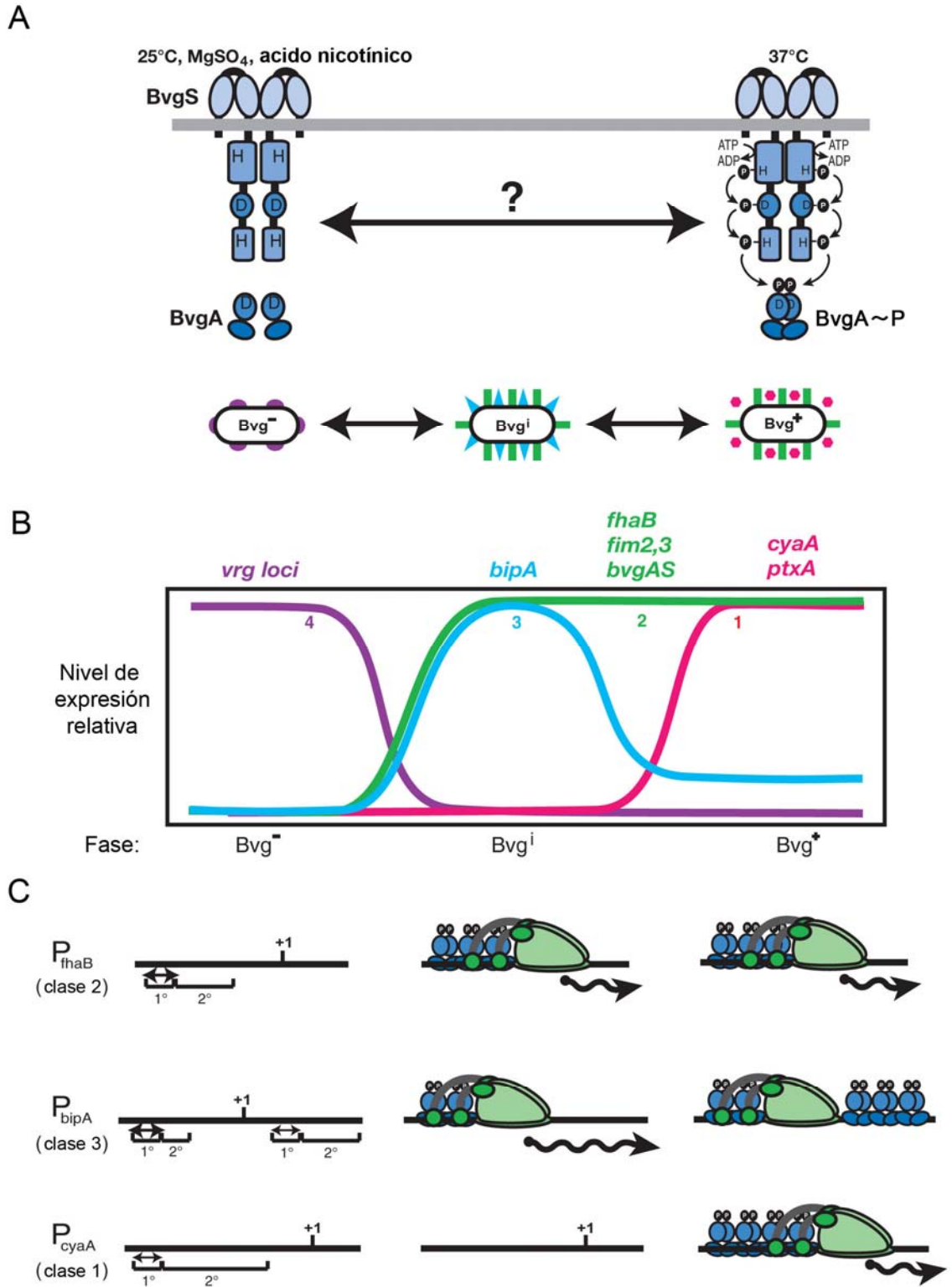


Fig. 2 (A) Fosforilación de BvgAS. BvgS posee dos dominios de unión a proteína de localización periplásmica que participan en el reconocimiento de la señal. Cuando se activa (37 °C), BvgS se autofosforila en la posición His729 del dominio autoquinasa. Este grupo fosfato es transferido a la posición Asp1023 en el dominio receptor y luego pasa a la posición His1172 en el extremo COOH-terminal del dominio de fosfotransferencia. Finalmente, el grupo fosfato pasa a la posición Asp54 de BvgA. Cuando BvgS se inactiva (25 °C, MgSO₄, ácido nicotínico), la fosforilación no ocurre. Se desconoce como ocurre la fosforilación en la fase Bvgⁱ (?). **(B) Representación de las fases Bvg⁺, Bvgⁱ y Bvg⁻.** Curvas teóricas indicando los niveles de expresión relativos de los genes clase 1, 2, 3 y 4 en cada una de las fases. **(C) Representación de los promotores de clase 1, 2 y 3.** Se indica la posición relativa de los sitios de unión de BvgA primarios (1°) y secundarios (2°). Los sitios de unión 1° de alta afinidad presentes en los promotores de los genes *fhaB* y *bipA* se indican con flechas anchas, mientras que los sitios de unión 1° de baja afinidad presentes en los promotores

de los genes *bipA* y *cyaA* se indican con flechas angostas. La unión de BvgA-P y ARN polimerasa se representa mediante figuras azules y verdes, respectivamente. (Fuente: Jones, A. M. *et al.* (2006) Molecular Microbiology).

La caracterización *in vitro* de varios promotores regulados por Bvg indica que los miembros de las diferentes clases de genes pueden ser diferencialmente regulados según la localización y afinidad de los sitios de unión de BvgA en sus promotores (**Fig. 2**) [16-18]. En general, los promotores de genes clase 2 y 3 poseen sitios de unión de BvgA de alta afinidad localizados próximos al extremo 5' y al sitio de unión de ARN polimerasa. Estos genes pueden activarse por concentraciones relativamente bajas de BvgA~fosfato (**BvgA~P**). En contraste, los promotores de genes clase 1 contienen sitios de unión de BvgA de baja afinidad localizados relativamente lejos del sitio de inicio de la transcripción y la activación de estos genes requiere concentraciones mucho más elevadas de BvgA~P. En conjunto, la evidencia experimental *in vitro* sugiere que BvgAS controla la expresión de las distintas fases de virulencia regulando la concentración intracelular de BvgA~P [181].

Al menos tres fases fenotípicas diferentes reguladas por el sistema Bvg han sido caracterizadas [30, 32]. Cada una se define por un máximo o mínimo de expresión de los genes de cuatro clases diferentes (**Fig. 2**). La fase *avirulenta* o **Bvg⁻** se caracteriza por la ausencia de expresión de los genes *vag* (*virulence activated genes*) y la expresión de los genes *vrg* (*virulence repressed genes*) o de clase 4. La represión de los genes de clase 4 (*vrg*) involucra una proteína represora denominada **BvgR**. El gen *bvgR* se localiza *downstream* del locus *bvgAS* y su expresión es activada por BvgA. La fase intermedia o **Bvgⁱ** se caracteriza por la expresión de los genes clase 2, tales como aquellos que codifican algunas adhesinas (hemaglutinina filamentosa, *fhaB* y fimbrias, *fim*) y el mismo *bvgAS*; genes de clase 3, de los cuales solo uno (*bipA*) ha sido identificado hasta ahora; y la ausencia de expresión de los genes clase 1 y clase 4. La fase virulenta o **Bvg⁺** se caracteriza por la expresión de los genes clase 1, como aquellos que codifican toxinas (adenilato ciclasa, *cyaA* y toxina pertussis, *ptxA*); genes clase 2; y la ausencia de expresión de los genes clase 3 y clase 4.

Existe evidencia que sugiere que factores ambientales durante la transmisión persona a persona determinan la modulación de *B. pertussis* de manera tal que al ingresar al nuevo hospedador la bacteria se encontraría en fase Bvg⁻ o Bvgⁱ [173]. Así, durante los primeros estadios de colonización este patógeno podría no expresar las proteínas codificadas por los genes *vag* (bacteria en fase Bvg⁻). Más tarde, la expresión de adhesinas (Bvgⁱ), inducidas por un cambio en las condiciones ambientales, favorecería la interacción con las células del epitelio respiratorio. Superada esta etapa, la expresión de toxinas propias de la fase Bvg⁺ resultaría en la alteración de los mecanismos de defensa del hospedador. La expresión de toxinas se relaciona con la fase aguda de la infección y la sintomatología típica de la enfermedad. La modulación podría ser

relevante durante la infección favoreciendo la sobrevivencia dentro del hospedador en nichos aún no determinados.

No todos los factores de virulencia son regulados por el locus Bvg. Para cada una de las posibles fases o fenotipos definidos previamente debe considerarse la expresión de otros factores de virulencia, algunos de ellos conocidos y otros desconocidos aún. Hasta hoy, no se sabe exactamente cual es la fase o fases predominantes en el fenotipo *in vivo* o fenotipo infectante.

1.4.1. FACTORES DE VIRULENCIA REGULADOS POR EL SISTEMA BVG.

1.4.1.1. Hemaglutinina Filamentosa (**FHA**).

FHA es una proteína fibrilar de 2-4 nm de diámetro y 100 nm de longitud que puede estar asociada a la superficie o ser secretada al medio extracelular [116]. El gen *fhaB*, que codifica FHA, pertenece al grupo de genes clase 2 y se expresa tanto en fase Bvg⁺ como Bvgⁱ [17, 153]. FHA es sintetizada como un precursor de 367 kDa, **FhaB**, el cual sufre varias modificaciones hasta generar la proteína madura FHA de ~232 kDa. Esta proteína es exportada a través de la membrana citoplasmática por un sistema dependiente de péptido señal (*Sec signal peptide-dependent pathway*) [67, 94]. Su transporte y secreción a través de la membrana externa requiere una proteína accesoria, **FhaC**. Ambas proteínas conforman un sistema de secreción de dos componentes (*two-partner secretion (TPS) system*) [87]. FHA puede ser liberada al medio extracelular. La liberación de FHA es dependiente de su maduración y clivaje mediado por la proteasa SphB1 [33].

Estudios *in vitro* empleando diferentes líneas celulares de mamíferos sugieren que FHA contiene al menos 3 dominios involucrados en la adhesión de *B. pertussis* a las células del hospedador. El triplete Arg-Gly-Asp (RGD) promueve la unión a integrinas presentes en leucocitos (LRI, $\alpha_v\beta_3$ y IAP, CD47), y al receptor CR3 (CD11b/CD18, $\alpha_M\beta_2$) el cual se expresa en macrófagos, leucocitos polimorfonucleares (PMNs) y otros tipos celulares [90, 147, 156]. Específicamente, el dominio RGD de FHA participa en la unión con la integrina VLA-5 (very late antigen 5, $\alpha_5\beta_1$) de células epiteliales bronquiales [91]. La interacción entre VLA-5 y RGD induce la activación de NF- κ B, lo cual provoca un incremento en la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 (*epithelial intercelular adhesión molecule 1*) [92, 93]. ICAM-1 participa en el reclutamiento de leucocitos y su activación en el sitio de infección. FHA también posee un dominio de interacción con carbohidratos (CRD), el cual media la adhesión a células epiteliales respiratorias ciliadas y macrófagos *in vitro* [144]. Además, FHA presenta actividad de unión tipo lectina con afinidad por heparina y otros carbohidratos sulfatados, involucrada en la adhesión a células epiteliales no ciliadas [123].

1.4.1.2. Fimbrias (**Fim**).

Las fimbrias son estructuras proteicas poliméricas de tipo filamentoso que se localizan en la superficie de *B. pertussis*. Existen dos serotipos de subunidad mayor de fimbria, **Fim2** y **Fim3**, que comparten una subunidad menor común denominada **FimD** [129]. El gen *fimD* forma parte del operón *fimBCD*, el locus funcional para la biosíntesis de fimbria [64, 180]. Varios estudios sugieren que Fim interviene en la adhesión al epitelio respiratorio a través de Fim2 y Fim 3, y a monocitos por medio de FimD [75, 76, 130]. Fim interacciona también con azúcares sulfatados que se encuentran comúnmente en el tracto respiratorio como heparina, condroitin y dextrano [63]. Estudios realizados por Hazenbos *et al.* [75, 76] sugieren que FimD interviene en la adhesión de *B. pertussis* no opsonizada a VLA-5 en la superficie de monocitos provocando un aumento de expresión de CR3, lo cual incrementa los sitios de interacción para FHA.

1.4.1.3. Pertactina (**Prn**) y otros Autotransportadores.

Estas proteínas pertenecen a la familia de proteínas asociadas a la superficie bacteriana o secretadas al medio extracelular que dirigen su propia exportación a través de la membrana externa (*autotransporter secretion system*) [84]. **Prn**, una proteína de 69 kDa, posee un dominio RGD así como regiones ricas en prolina y repeticiones de leucina, ambos dominios potencialmente involucrados en la adhesión de la bacteria al hospedador [37, 49]. **TcfA** (originalmente clasificado como un factor de colonización traqueal) [57], **BrkA** [53], **SphB1** [33] y **Vag8** [58], son algunos de los autotransportadores identificados en *Bordetella* que poseen en su secuencia uno o más dominios RGD potencialmente involucrados en la adhesión bacteriana. SphB1 es una lipoproteína con actividad serin-proteínasa tipo subtilisina que es esencial para el clivaje y maduración de FHA [33]. Como Prn y SphB1, BrkA, un autotransportador que posee una doble funcionalidad intrínseca (poro secretor y chaperona intramolecular) [137, 138], permanece asociado con la superficie bacteriana. Se ha postulado que BrkA proporciona a *B. pertussis* cierta resistencia contra la acción del complemento dependiente de anticuerpos [53]. A diferencia de los autotransportadores nombrados anteriormente, TcfA es procesada y secretada al medio extracelular como una proteína madura de 60 kDa a partir de un precursor asociado a la célula de 90 kDa [57].

La finalización del proyecto genoma de *B. pertussis* (Sanger Center, www.sanger.ac.uk/Projects/B_pertussis) permitió identificar 9 nuevos genes que codifican posibles autotransportadores, algunos de los cuales estarían regulados por el Bvg (**Tabla 1**). Algunos de ellos comparten similitud de secuencia con enzimas de tipo proteasas, mientras que otros están relacionados con proteínas de adhesión.

Tabla 1. Autotransportadores de *B. pertussis*.

Nombre	N° AA	RGD [■]	Bvg [▲]	Homología o Referencia
Prn	910	2	+	[50]
TcfA	672	1	+	[57]
BrkA	1010	2	+	[54]
Vag8	915	1	+	[58]
Phg	418	0	0	[3]
AidB	903	0	0	[3]
SphB1	931	0	+	[3]
SphB2	989	0	0	[3]
SphB3	1076	0	0	[3]
BatA	358	0	ND	Tcf
BatB	2300	2	ND	ShdA <i>S. typhimurium</i>
BatC	864	1	ND	ShdA <i>S. typhimurium</i>
BatD	908	0	ND	Prn
BatE	759	1	ND	Prn

N° AA, Número de aminoácidos. [■], Número de secuencias RGD. [▲], Regulación sistema Bvg; +, regulado por Bvg; 0, no regulado por Bvg; ND, no determinado.

1.4.1.4. Toxina Adenilato Ciclasa (**ACT**).

ACT es una proteína bifuncional con actividad adenilato ciclasa y hemolisina. Pertenece a la familia de citotoxinas formadoras de poros y dependientes de calcio denominadas toxinas RTX (*repeats-in-toxins*) [151, 178]. ACT es sintetizada como una pro-toxina monomérica de 1706 aminoácidos (AA) a partir del gen *cyaA*. El resto de los genes del operon *cyaABCDE* participan en la secreción y activación de ACT. Su actividad catalítica adenilato ciclasa se localiza dentro de los 400 AA del extremo amino, mientras que los 1300 AA restantes del extremo carboxilo poseen la actividad hemolítica y participan en la liberación del dominio catalítico en el citoplasma de células eucariotas [65, 85, 149, 150]. A diferencia de otras toxinas de su clase, la mayor parte de ACT permanece asociada a la superficie y solo una pequeña proporción se libera al medio externo. Estudios recientes indican que FHA juega un rol importante en la retención de ACT en la membrana celular [187]. La glicoproteína de superficie CD11b en la célula blanco sirve de receptor de la toxina madura [48, 70]. Una vez dentro de la célula blanco, ACT es activada por calmodulina [182] y cataliza la producción de AMPc en cantidades suprafisiológicas [27, 72, 73, 132]. Sorprendentemente, ACT anclada en la membrana bacteriana no es responsable de la intoxicación de las células del hospedador; estudios recientes demostraron que la intoxicación requiere el contacto entre la bacteria y la célula blanco y la secreción activa de ACT [66]. El incremento de AMPc interfiere con los mecanismos de transmisión de señales en células del sistema inmune y modula diferentes funciones efectoras, incluyendo la respuesta oxidativa, lo cual favorece la persistencia bacteriana [26]. *In vitro*, ACT induce apoptosis en macrófagos y disminuye la producción de TNF- α en monocitos y neutrófilos [99, 132, 140]. Se ha postulado que esta toxina funciona como un factor anti-inflamatorio y anti-fagocítico durante la infección inhibiendo las funciones de las células efectoras del sistema inmune.

1.4.1.5. Toxina Dermonecrotica (**DNT**).

DNT, una toxina de tipo A-B de 140 kDa, se compone de un dominio amino-terminal de unión al receptor y un dominio enzimático carboxilo-terminal [35, 188]. DNT causa la poliaminación y desaminación de GTPasas Rho intracelulares, que regulan varios procesos celulares incluyendo la reorganización del citoesqueleto y diferenciación celular entre otros [62]. Debido a la acción de DNT, las GTPasas permanecen activas constitutivamente, lo cual provoca la intoxicación celular. Aunque el receptor de DNT no ha sido identificado, se sabe que esta toxina es internalizada vía endocitosis y luego clivada por endoproteasas como furina, lo cual es indispensable para su actividad [113].

1.4.1.6. Toxina Pertussis (**PT**).

Esta toxina, exclusiva de *B. pertussis*, posee la estructura clásica tipo A-B de las exotoxinas bacterianas. Está compuesta por seis polipéptidos designados S1 a S5, codificados por los genes *ptxA* a *ptxE*, respectivamente [104, 135]. El polipéptido S1 constituye la subunidad A con actividad enzimática ADP ribosiltransferasa NAD-dependiente, mientras la subunidad B se compone de los polipéptidos S2, S3, S4 y S5 ensamblados en una proporción 1:1:2:1 [135, 164]. La secreción a través de la membrana externa requiere un aparato de transporte especializado compuesto por nueve proteínas denominadas **Ptl** (*pertussis toxin liberation*) [52, 174]. Una vez dentro de la célula, probablemente vía endocitosis mediada por receptores, la subunidad B se intercala con la membrana citoplasmática y une ATP, lo cual provoca la liberación de la subunidad activa S1 [96]. Esta subunidad inactiva a la proteína G_i mediante ADP-ribosilación, lo cual bloquea la inhibición de la adenilato ciclasa eucariota y la activación de los canales de K^+ [97, 163]. Los efectos biológicos atribuidos a la alteración de los patrones de señalización que esta toxina provoca se suman a la acción de ACT provocando la sensibilización a histamina, linfocitosis, aumento de la secreción de insulina en respuesta a señales reguladoras, hipoglucemia y efectos inmunológicos tanto supresores como estimuladores [133, 141]. Por ejemplo, PT inhibe la quimiotaxis, respuesta oxidativa y liberación de enzimas lisosomales en neutrófilos y macrófagos [24, 100].

1.4.2. FACTORES DE VIRULENCIA NO REGULADOS POR EL SISTEMA BVG.

1.4.2.1. Citotoxina Tranqueal (**TCT**).

TCT es un producto resultante de la degradación del peptidoglicano presente en la pared bacteriana y liberado durante el crecimiento de *B. pertussis* [107]. A diferencia de otras bacterias Gram-negativas, que reciclan el peptidoglicano por transporte al

citoplasma vía la proteína integral de membrana AmpG, *Bordetella spp.* libera este producto al medio externo debido a que carece de AmpG [28, 152]. TCT causa disfunción (ciliastosis) y muerte de células epiteliales ciliadas [179]. La destrucción de las células ciliadas estaría relacionado con el incremento en la producción de óxido nítrico (ON) [59]. Se ha postulado que, *in vivo*, TCT estimula la producción de IL-1 α en células secretoras de mucus no ciliadas, lo cual controla positivamente la expresión de la enzima ON sintetasa [59]. El óxido nítrico provoca la depleción del hierro intracelular lo cual deriva en la inactivación de enzimas que contienen hierro importantes para la respiración mitocondrial y la síntesis de DNA. Como resultado de esta intoxicación celular, la unión entre células epiteliales se ve comprometida y ocurre la extrusión de células ciliadas. TCT actúa sinérgicamente con LPS induciendo la producción de ON en el epitelio respiratorio [60].

1.4.2.2. Lipopolisacarido (LPS).

Como otras bacterias Gram-negativas, *B. pertussis* posee **LPS** en su membrana externa, una potente endotoxina bacteriana. La misma está constituida por una parte lipídica (lípidio A) anclada a la membrana y un núcleo oligosacárido. No posee antígeno O (cadena de polisacáridos), característico del LPS de la mayoría de las bacterias Gram-negativas. El locus *wlb*, compuesto por doce genes (*wlbA* a *wlbL*) es el encargado de su biosíntesis y ensamblado [145]. El LPS de *B. pertussis* es pirogénico, mitogénico e histaminosensibilizante, siendo el lípidio A de esta molécula la fracción endotóxica principal [4, 134, 175]. En combinación con otras toxinas activas, especialmente PT, LPS es responsable de la reactividad y efectos adyuvantes de la vacuna celular. En contacto con células epiteliales, macrófagos y otras células del sistema inmune induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IL-12 y IL-8) lo cual conduce a la toxicidad sistémica o “shock inducido por endotoxina” [175]. Por otra parte, el LPS protege a *B. pertussis* de los efectos de la proteína surfactante A (SP-A) presente en el epitelio respiratorio [157]. Presumiblemente, la particular conformación (ausencia de antígeno O) del LPS, impide a SP-A interactuar con esta molécula obstaculizando la eliminación de la bacteria del tracto respiratorio.

1.4.2.3. Sistemas de Captura de Hierro.

Una de las barreras contra microorganismos invasores que conforman el sistema de inmunidad innata del hospedador es la baja disponibilidad de hierro (Fe) libre. En mamíferos, el Fe intracelular se encuentra en la forma de hemoproteínas, mientras que el Fe extracelular se haya unido a glicoproteínas como transferrina (TF) en el suero y lactoferrina (LF) en otras secreciones. La presencia de estas proteínas quelantes determina que la concentración de Fe libre ($< 10^{-18}$ M) sea insuficiente para permitir el

desarrollo microbiano. Sin embargo, los microorganismos cuentan con mecanismos que les permiten superar la restricción de Fe impuesta por el hospedador [69, 102]. Entre estos se encuentran la producción y utilización de quelantes de Fe de bajo peso molecular, denominados sideróforos, la utilización de sideróforos producidos por otras bacterias patógenas (xenosideróforos) y la expresión de receptores de superficie específicos para proteínas que contienen Fe en su estructura, como por ejemplo transferrina, lactoferrina y hemoglobina [176]. Los sideróforos poseen una gran afinidad por Fe que les permite extraer este metal de las proteínas quelantes presentes en el hospedador.

B. pertussis produce alcalignina, un sideróforo tipo hidroxamato, pero también puede utilizar xenosideróforos. Así, los sideróforos producidos por bacterias comensales o colonizadoras temporarias de la cavidad nasofaríngea pueden proveer una fuente de hierro adicional para *B. pertussis*. A medida que progresa la infección, la extravasación de células inmunes, eritrocitos y suero a la superficie de la mucosa aumenta debido principalmente a la acción de las toxinas sobre el epitelio respiratorio. El suero y otros compuestos con grupos hemo, tales como hemoglobina y haptoglobina, liberados como consecuencia del daño y lisis de las células epiteliales proveen una fuente de Fe importante durante los estadios posteriores a la colonización.

Menzio *et al.* [122] demostraron que *B. pertussis* es capaz de utilizar lactoferrina y transferrina como fuentes de hierro. Estos investigadores identificaron posibles proteínas de unión a lactoferrina y transferrina empleando cromatografías de afinidad. Sin embargo, el reciente análisis de la secuencia del genoma de *B. pertussis* indica que este organismo carece de genes que codifiquen posibles receptores para lactoferrina y transferrina. Por lo tanto, la adquisición de hierro a partir de estas glicoproteínas probablemente requiera un sideróforo, como alcalignina, o un xenosideróforo presente en la mucosa del hospedador.

En *B. pertussis*, así como en otras bacterias Gram-negativas, la expresión de la mayoría de los genes que codifican sistemas de captura de Fe se reprime cuando la concentración intracelular de Fe aumenta [23]. El regulador transcripcional **Fur** (*Ferric uptake regulator*) que emplea Fe como co-represor cumple esta función [9]. Cuando la bacteria se encuentra en un entorno limitado en hierro, su reserva de Fe intracelular se agota, resultando en la de-represión de los genes para la adquisición de Fe. Existen sistemas de captura de Fe que requieren la regulación transcripcional positiva, en el cual la máxima expresión de sus genes sucede en presencia de la respectiva fuente de Fe [23].

B. pertussis utiliza al menos tres fuentes de hierro cuyos sistemas de expresión y regulación han sido caracterizados, ellas son: el sideróforo alcalignina, el xenosideróforo enterobactina, y el grupo hemo.

El sideróforo tipo hidroxamato **Alcalignina** [131] forma un complejo estable a pH neutro con iones ferricos en una relación molar 3:2 (Fe_2Alc_3). Los genes involucrados

en la biosíntesis y regulación de alcalignina se agrupan en el operon *alcABCDE* [142]. El gen *alcS*, localizado inmediatamente *downstream* del operon *alc*, codifica una permeasa que exporta monómeros de alcalignina fuera de la bacteria [22]. La expresión de *alcS* es independiente de la región que controla el operon *alc* y no reprimible por hierro [95]. Así, **AlcS** regula la acumulación intracelular de alcalignina que de otra forma resultaría tóxica para la bacteria. **FauA** es el receptor de membrana externa dependiente de **TonB** requerido para el ingreso de alcalignina ferrica [10, 20, 21]. El complejo **TonB/ExbB/ExbD**, referido como sistema TonB, interactúa con la mayoría de los receptores de membrana externa involucrados en la captura de hierro y provee la energía requerida para la transferencia de Fe^{+3} al periplasma [23, 128]. La expresión del operon *tonB-exbBD* de *B. pertussis* se activa también en condiciones de limitación en hierro [143]. El gen *fauA* se transcribe a partir de su propio promotor regulado por Fur y depende del regulador **AlcR** y de alcalignina como inductor para su máxima expresión (**Fig. 3**). AlcR es el activador transcripcional de los genes para la biosíntesis de alcalignina. El gen que codifica AlcR, *alcR*, también posee un promotor regulado por Fur. Cuando la represión mediada por la proteína Fur se libera en limitación de hierro, la expresión de *fauA* y del operon *alc* se activa por AlcR. La activación transcripcional mediada por AlcR requiere alcalignina como inductor formando así un circuito de control autógeno positivo que controla su propia síntesis y transporte.

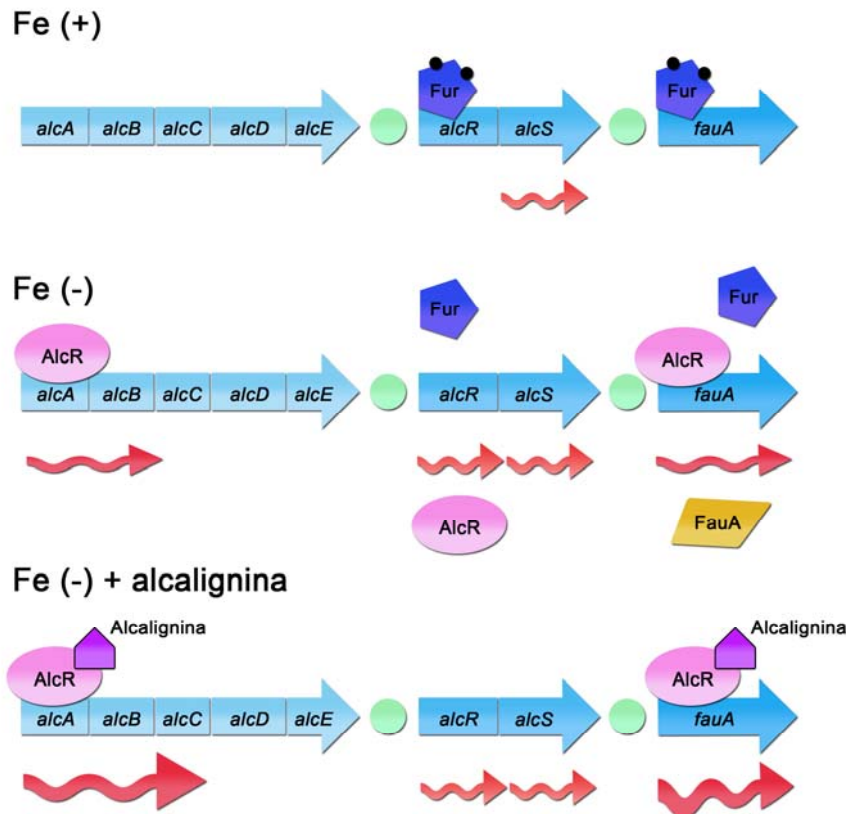


Fig. 3 Modelo del mecanismo molecular de la regulación transcripcional del operon *alcABCDE/alcRS/fauA* de *B. pertussis*. En presencia de hierro [Fe (+)] la proteína represora Fur impide la transcripción de los genes *alcR* y *fauA*. En ausencia de hierro [Fe (-)] se activa la transcripción de los genes *alcR* y *fauA*. La proteína reguladora AlcR induce la expresión basal del operón *alcABCDE* necesario para la biosíntesis de alcalignina. En ausencia de hierro y presencia de alcalignina [Fe (-) + alcalignina], la cual actúa como inductor, la transcripción del gen *fauA* y del operón *alcABCDE* alcanza el máximo nivel.

El análisis del genoma de *B. pertussis* revela la presencia de al menos 10 genes que codifican potenciales receptores de sideróforos exógenos (**Tabla 2**). Entre estos se incluye **BfeA**, el cual une enterobactina. La secuencia aminoacídica de BfeA exhibe fuerte homología con otros receptores de enterobactina, entre ellos, PfeA de *Pseudomonas aeruginosa*, Iron de *Salmonella enterica* y FepA de *Escherichia coli* [23]. La adquisición de un nutriente limitante sin el costo energético de la biosíntesis y secreción de un sideróforo representa una ventaja competitiva importante para *B. pertussis*. Inmediatamente downstream del gen *bfeA*, se localiza el gen *bfeB*. **BfeB** pertenece a la superfamilia de α/β hidrolasas, y posiblemente participa en el transporte de enterobactina a través de la membrana citoplasmática [23]. El gen *bfeR* codifica una proteína reguladora perteneciente a la superfamilia de reguladores transcripcionales dependientes de hierro tipo AraC/XylS, la cual incluye también a AlcR. El regulador **BfeR** es necesario para la transcripción en respuesta a enterobactina de *bfeB* [2].

Tabla 2. Receptores de *B. pertussis* dependientes de TonB involucrados en la captura de hierro.

Receptor	Locus*	Fuente de Fe, homología, Referencia
<i>Receptores caracterizados de especificidad conocida</i>		
FauA	BP2463	Alcalignina, ND, [20]
BfeA	BP2901	Enterobactina, ND, [9]
BhuR	BP0347	Hemo, ND, [170]
<i>Receptores de especificidad desconocida</i>		
BfrB	BP2016	ND, <i>Y. enterocolitica</i> receptor FcuA Q05202, [8]
BfrC	BP3663	ND, <i>Vibrio anguillarum</i> receptor FatA P11461, [8]
BfrD	BP0856	ND, <i>P. aeruginosa</i> Fiu Pa4514, [139]
BfrE	BP0857	ND, <i>P. aeruginosa</i> Fiu Pa4514
BfrF	BP0736	ND, <i>E. coli</i> FhuA NP_414692
BfrG	BP2922	ND, <i>E. coli</i> FhuA NP_414692
BfrH	BP1138	ND, <i>E. coli</i> FhuA, <i>Burkholderia cepacia</i> OrbA, AF013993
BfrI	BP1962	ND, <i>P. aeruginosa</i> FiuA AF051691; <i>Salmonella typhimurium</i> FhuA Y14025
HemC	BP0456	ND, <i>Haemophilus ducreyi</i> TdhA receptor hemo AAC35765

* Secuencia Genoma *B. pertussis* Wellcome Trust Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk>); BP, *Bordetella pertussis*; ND, No Determinada.

Los genes que codifican proteínas involucradas en el transporte y utilización de compuestos con grupos hemo se agrupan en el cluster *bhuRSTUV* (*Bordetella heme utilization*) [170-172]. Los genes *bhu* de *Bordetella* son similares a aquellos presentes en sistemas de captura de hemo de otros patógenos Gram (-) entre ellos, *P. aeruginosa*, *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica*, *Shigella dysenteriae* y *Vibrio cholerae*. **BhuR** es el receptor de membrana externa para moléculas de hemo (grupo hemo), que forman parte de la estructura de hemoproteínas como hemoglobina o mioglobina. La producción de este receptor en bacterias sometidas a limitación de hierro se incrementa en presencia de hemo. Las proteínas **BhuT**, una proteína de unión a hemo periplásmica, **BhuU**, una permeasa de membrana citoplasmática y **BhuV** o proteína de unión a ATP, participan en la internalización de hemo. La proteína **BhuS** se asemeja a la proteína

ShuS de *S. dysenteriae*, la cual presuntamente secuestra el hemo internalizado evitando la toxicidad por acumulación citoplasmática. La proteína **HurI** es un factor σ ECF y **HurR** es el factor anti- σ localizado en la membrana citoplasmática. Los genes *hurI* y *hurR* se localizan inmediatamente *upstream* del locus *bhuRSTUV*. La proteína Fur reprime el promotor de *hurI*. Así, cuando *Bordetella* se enfrenta a condiciones de limitación de hierro, la derepresión de Fur del promotor de *hurI* activa la transcripción de *hurIR* y de *bhuRSTUV* (Fig. 4). Esto permite la producción de niveles basales de la maquinaria de transporte de hemo, incluido el receptor BhuR requerido tanto para censar hemo como para su transporte de hemo al interior de la bacteria. En estas condiciones, el factor anti- σ HurR se encontraría unido a HurI manteniéndolo en un estado inactivo. Cuando el receptor de membrana externa BhuR une hemo, la señal se transmite a través del periplasma vía el contacto entre BhuR y HurR (Fig. 5). La interacción BhuR-HurR libera el factor HurI permitiendo su asociación con ARN polimerasa y la transcripción de *bhuR*. Así, los genes *bhu* son regulados positivamente por HurIR, BhuR y hemo.

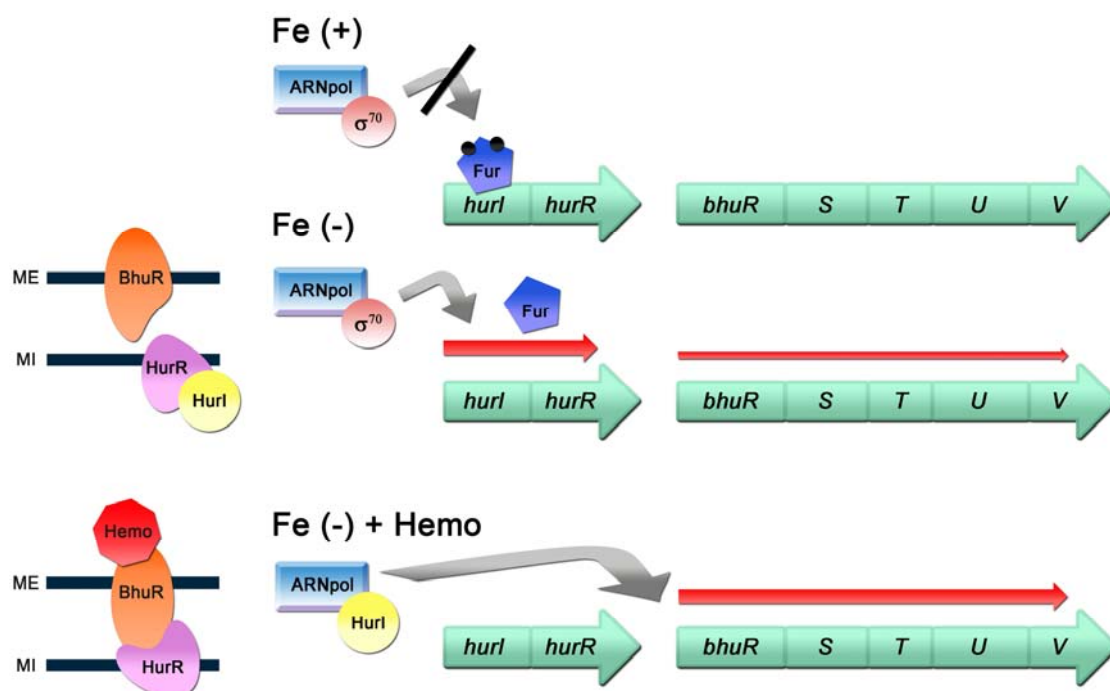


Fig. 4 Modelo del mecanismo molecular de la regulación transcripcional del operon *hurIR/bhuRSTUV* de *B. pertussis*. En presencia de hierro [Fe (+)] la proteína Fur impide la transcripción de los genes *hurIR*. La transcripción de los genes *hurIR* se activa en ausencia de hierro [Fe (-)]. En estas condiciones se detectan niveles basales de transcripción del operon *bhuRSTUV*, lo cual permite la producción de la maquinaria de transporte de grupo hemo incluido el receptor BhuR. En ausencia de hierro y presencia de grupo hemo, el receptor BhuR une hemo. La señal se transmite a la proteína citoplasmática HurR asociada al receptor BhuR en la membrana interna. Esto libera al factor sigma HurI, el cual se une a la ARN polimerasa y activa la transcripción del operón *bhuRSTUV* a nivel máximo.

La habilidad de *B. pertussis* para activar selectivamente la expresión de diferentes sistemas de captura de hierro contribuye a su capacidad de adaptarse y multiplicarse efectivamente en el dinámico medio ambiente del hospedador durante el curso de la infección. Cada una de las señales o inductores (Fe, sideróforos, hemo) es utilizada para integrar la información que procede de las condiciones de entorno del patógeno, de modo de priorizar la expresión de sistemas de captura de hierro más efectivos (**Fig. 5**). La expresión de estas proteínas es crítica para la supervivencia de *B. pertussis* y la colonización del hospedador.

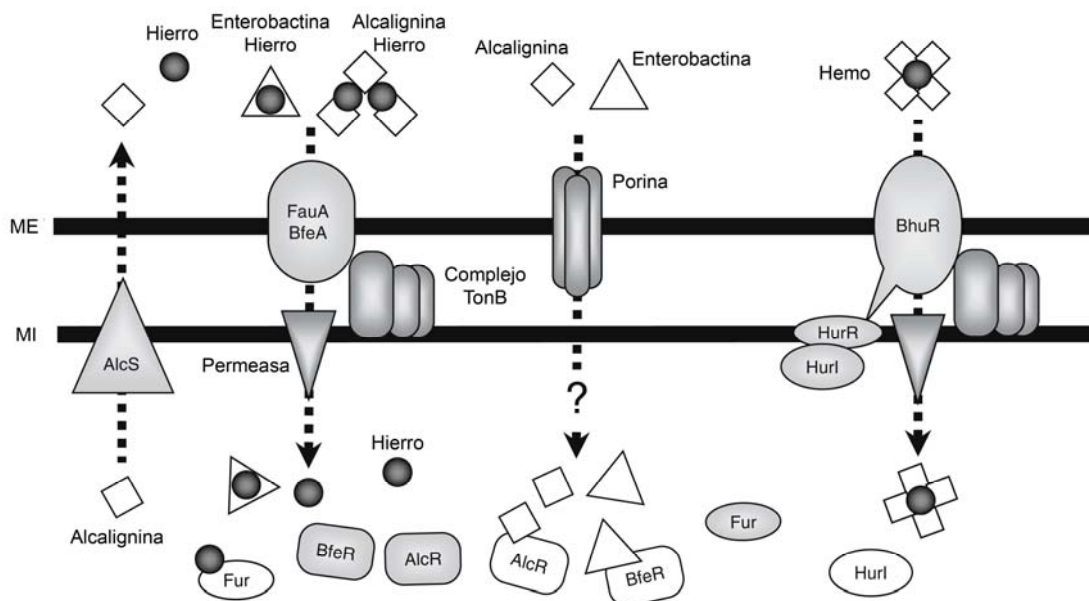


Fig. 5 Sistemas de Captura de Hierro de *B. pertussis*. La respuesta a las fluctuaciones en la disponibilidad de hierro se controla mediante un complejo sistema que involucra la proteína represora Fur, el regulador transcripcional positivo AlcR, el regulador transcripcional de los genes involucrados en la utilización de enterobactina BfeR, y los reguladores positivos de la expresión de los genes para la utilización de hemo HurlR. La producción de los reguladores positivos es reprimida por Fur, sujeta a la disponibilidad de su co-represor hierro, y la actividad de estos reguladores positivos es modulada por la presencia de sus inductores específicos. En el caso de los reguladores AlcR y BfeR, la señal inductora (deferrisideróforos) se percibe intracelularmente, mientras que la expresión del factor Sigma ECF Hurl se activa cuando el receptor extracelular de hemo BhuR une hemo. BfeR y AlcR responden a sus inductores, enterobactina y alcalignina respectivamente, los cuales son internalizados por un mecanismo desconocido e independiente de sus respectivos receptores de membrana TonB-dependientes BfeA y FauA. La exportación de alcalignina mediante la proteína AlcS es fundamental en el proceso de detección de esta molécula dado que modifica la concentración intracelular de este inductor. (Fuente: Brickman, T. J. *et al.* (2007) *Biometals*).

1.5 PATOGÉNESIS E INMUNIDAD.

La colonización del epitelio implica una compleja serie de eventos entre los que se incluye la adhesión, el daño tisular y la eventual invasión celular que finalmente podría conducir a la persistencia del microorganismo dentro del hospedador, aunque este último aspecto aún está en discusión. Estos eventos son modulados por la interacción de los factores de virulencia con los receptores celulares del hospedador, un fenómeno

multifactorial y dinámico donde las señales se transmiten desde el patógeno hacia el hospedador y viceversa.

En el caso de *B. pertussis*, la infección se inicia con la adhesión a las células epiteliales del tracto respiratorio superior. Varios factores característicos de la fase virulenta han sido implicados como mediadores de este evento inicial (FHA, Fim, PT, LPS, TcfA, BrkA, Vag8, y Prn) [31, 98, 133, 168]. La redundancia en proteínas con actividad tipo adhesina evidentemente contribuye al proceso de adhesión. Un evento primario durante la colonización es la inducción de ciliastosis la cual, junto con el daño al epitelio respiratorio y la acumulación de mucus, dificulta la eliminación del microorganismo. Se ha postulado que la liberación de FHA al medio extracelular, mediada por la proteasa sphB1, podría favorecer la dispersión de la bacteria desde las microcolonias iniciales a nuevos sitios en el tracto respiratorio [34].

Recientemente, varios grupos de investigación incluido el nuestro mostraron que *B. pertussis* puede invadir y sobrevivir dentro de células del hospedador, incluyendo macrófagos, neutrófilos y células epiteliales respiratorias [7, 51, 61, 74, 82, 91, 156]. Al menos dos de las toxinas de *B. pertussis*, ACT y PT, afectan profundamente el resultado de la interacción con este tipo de células [132, 133]. Específicamente, ACT provoca la intoxicación de neutrófilos catalizando la producción excesiva de AMPc e inhibe la activación de células inmunes. Se cree que PT disminuye el reclutamiento de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) al sitio de infección mediante la modulación de producción de citoquinas y quimioquinas en células epiteliales y macrófagos. Como consecuencia de los efectos de PT y ACT, *B. pertussis* podría evadir la inmunidad innata temprana durante la colonización. El daño tisular local a las células epiteliales ciliadas se adjudica a la citotoxina traqueal (TCT), la toxina dermonecrótica (DNT) y en menor medida a ACT [62, 108].

La invasión y sobrevivencia intracelular ha sido postulada como uno de los mecanismos de persistencia de *B. pertussis*. Otro mecanismo de persistencia propuesto es la formación de biofilm. Estudios recientes realizados por investigadores de nuestro Instituto, demuestran que *B. pertussis* es capaz de formar biofilm *in vitro* [14, 158]. El biofilm se define como una comunidad de microorganismos sésiles, células que están irreversiblemente adheridas a una superficie o unas con otras, embebida en una matriz de sustancia polimérica extracelular (EPS) [47]. El EPS que *B. pertussis* desarrolla durante su crecimiento en biofilm *in vitro* se compone principalmente de polisacáridos (con ácidos urónicos), LPS y proteínas [14]. En *B. pertussis*, como en otros patógenos tales como *Escherichia coli* [185], *Shyella dysenteriae* [146], *Staphylococcus epidermis* [159] y *Peudomonas aeruginosa* [121], la capacidad de desarrollar biofilm puede contribuir a la patogénesis y desempeñar un rol importante en la evasión de los mecanismos de inmunidad y en la persistencia a largo plazo dentro del hospedador. Así como ocurre con otros determinantes de virulencia en *B. pertussis*, el desarrollo de

biofilm está regulado por el sistema Bvg, al menos en condiciones *in vitro* [127]. Mishra *et al.* (2005) sugieren que el control mediado por Bvg en el desarrollo de biofilm opera en una etapa inmediata posterior a la adhesión inicial de la bacteria y que probablemente sea requerido para la producción de estructuras de superficie que permitan la interacción célula-célula, y la posterior formación de microcolonias. Estos investigadores también sugieren que el desarrollo de biofilm en un nicho particular, especialmente en la cavidad nasofaríngea o en un lapso específico durante la infección respiratoria, permitiría a *B. pertussis* escapar a las defensas del sistema inmune y persistir en el hospedador.

En cuanto al desarrollo de inmunidad en un hospedador no inmune pueden diferenciarse tres etapas: el reconocimiento de los componentes bacterianos por las células del sistema de inmunidad innata y adquirida, la producción de mediadores solubles, y el reclutamiento y activación de moléculas y células efectoras (**Fig. 6**).

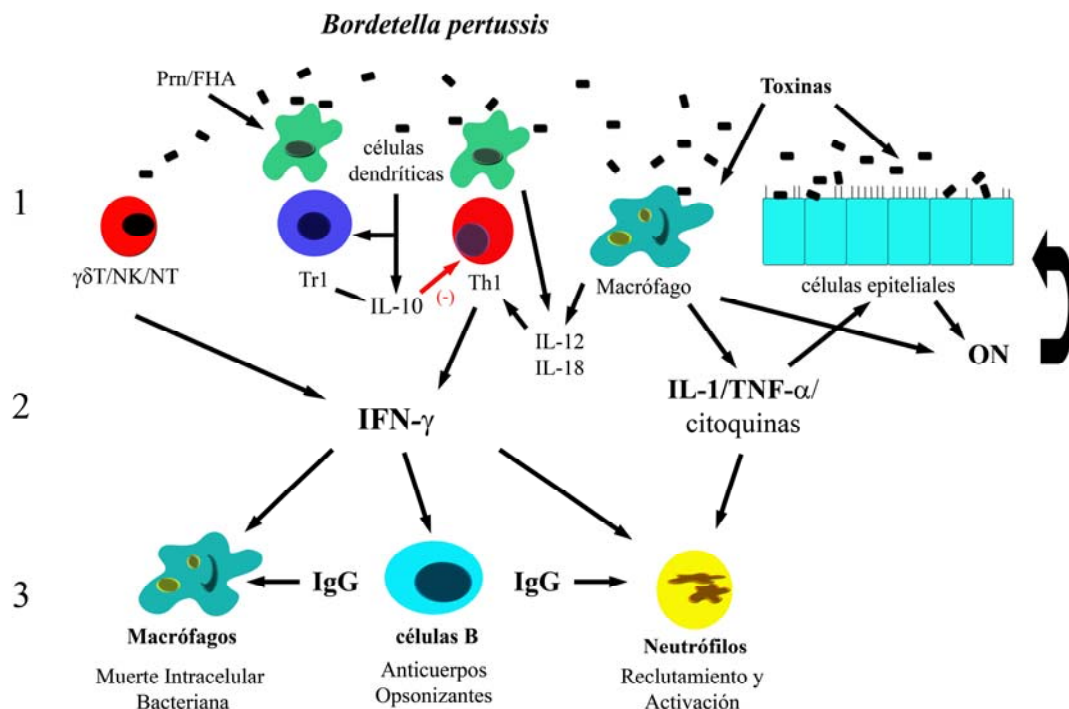


Fig. 6 Desarrollo de inmunidad contra *B. pertussis* en hospedadores no inmunes.

Cuando *B. pertussis* ingresa al tracto respiratorio se adhiere a células epiteliales ciliadas y es eventualmente reconocida y capturada por células del sistema de inmunidad innata, tales como macrófagos ($M\emptyset$), células dendríticas (DC), células $\gamma\delta$ -T, células *natural killer* (NK) o células T *naive* (NT) [126]. Las DC procesan y presentan los antígenos bacterianos a las células T. La producción de interleuquinas (IL-12 e IL-18) por DC, $M\emptyset$ y NT deriva en una respuesta de células T subtipo Th1. El interferón gamma (IFN- γ), secretado en la fase temprana de la infección por las células de inmunidad innata y más tarde por las células Th1, estimularía el reclutamiento y activación de macrófagos y

neutrófilos. Sin embargo, numerosos estudios indican que, como se mencionó anteriormente, varios de los factores de virulencia de *B. pertussis* modulan la respuesta inmune del hospedador favoreciendo la sobrevivencia de este patógeno (**Tabla 3**). Por ejemplo, durante los primeros estadios de la infección la respuesta Th1 local es suprimida debido a los efectos de la interleuquina-10 (IL-10) secretada por MØ y DC estimulados por FHA [15, 119]. El óxido nítrico (NO) y las citoquinas proinflamatorias, IL-1 β y TNF- α , inducidas por las toxinas bacterianas, especialmente LPS y TCT, contribuyen al reclutamiento de fagocitos profesionales, pero también median el daño local en pulmón y son responsables de muchos de los efectos sistémicos y neurológicos de esta infección [79, 118, 154, 183, 184].

Tabla 3. Actividad inmunomoduladora de los factores de virulencia de *B. pertussis*.

Factor de virulencia	Tipo celular	Efecto modulador	Referencia
PT	<i>células T</i>	induce producción de IL-2 e IFN- γ , aumenta la expresión de CD28, inhibe quimiotaxis	[103, 154, 160]
	<i>células NK</i>	inhibe quimiotaxis	[1]
	<i>células B</i>	reduce la vida media celular	[109]
	<i>macrófagos</i>	induce producción de IL-1 β y ON, inhibe quimiotaxis	[120, 154, 155, 166, 184]
	<i>neutrófilos</i>	inhibe quimiotaxis	[160]
LPS	<i>macrófagos</i>	induce expresión de IL-1 β , TNF- α , IL-6 IL-12 e IL-18	[110]
		induce producción de ON	[184]
TCT	<i>células epiteliales</i>	induce expresión de IL-1 y producción de ON	[80, 81]
	<i>neutrófilos</i>	inhibe quimiotaxis y metabolismo oxidativo	[167]
ACT	<i>monocitos</i>	induce apoptosis	[68]
	<i>macrófagos</i>	inhibe respuesta oxidativa y muerte intracelular	[112, 140]
	<i>neutrófilos</i>	inhibe producción de aniones superóxido	[136]
		induce producción de TNF- α	[136]
FHA	<i>macrófagos</i>	inhibe producción de IL-12, induce producción de IL-6 e IL-10	[119]
		inhibe procesamiento y presentación de antígeno	[15]
Prn	<i>macrófagos</i>	inhibe producción de IL-12 (junto con FHA)	[119]
Fim	<i>macrófagos</i>	induce producción de ON y expresión de CR3	[76, 184]

Fuente: Mattoo, S. & Cherry, J. D. (2005) Clin. Microbiol. Rev.

Estudios recientes señalan la importancia del receptor tipo Toll 4 (*Toll-like receptor*; TLR4) en la inducción de inmunidad innata contra *B. pertussis* [5, 86]. TLR4 reconoce LPS presente en bacterias Gram (-), incluida *B. pertussis* [86, 111]. Higgins *et al.* (2003), demostraron que la infección con *B. pertussis* es más severa en ratones deficientes en la expresión de TLR4 y que la señalización vía TLR4 induce la producción de IL-10 en DC en respuesta a la infección con *B. pertussis*, lo cual podría inhibir la respuesta inflamatoria y limitar la patología en el aparato respiratorio. Por otra

parte, los estudios realizados por otro grupo de investigación indican un patrón de respuesta dependiente de TLR4 diferencial entre *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* [111]. En la infección con *B. pertussis* los niveles de citoquinas proinflamatorias son menores, lo cual parece estar relacionado con la estructura del LPS de *B. pertussis* y/o la producción de PT [111]. Durante la adaptación de *B. pertussis* a hospedadores humanos, la modulación de la respuesta generada por TLR4 podría haber resultado benéfica para ambos, patógeno y hospedador, limitando los mecanismos de eliminación bacteriana y reduciendo la patología mediada por la inmunidad.

La presencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* cumple un rol fundamental en la protección contra esta infección [38, 162]. Anticuerpos contra determinados antígenos de *B. pertussis* pueden prevenir la adhesión a células epiteliales del tracto respiratorio (bloqueo de adhesinas), neutralizar toxinas bacterianas, o promover la opsonofagocitosis. Estudios realizados por nuestro grupo de investigación demuestran que la opsonización por anticuerpos específicos es crucial para inducir la actividad celular bactericida contra este patógeno [83, 148]. Un aspecto particularmente interesante de este estudio es que de los antígenos incluidos en las vacunas acelulares, Prn, uno de los antígenos que presenta variaciones en zonas inmunodominantes en las cepas circulantes respecto de la cepa vacunal [19], es el único que induce anticuerpos con actividad opsonofagocítica [83], lo cual parece apoyar la hipótesis de variación antigénica en las cepas circulantes dirigida por vacunación.

1.6 VACUNACIÓN.

En la era pre-vacunación, la tos convulsa fue una de las enfermedades infantiles más comunes; más de la mitad de los niños se infectaban antes de comenzar la etapa escolar. Más aún, la tos convulsa fue una de las principales causas de muerte infantil durante el siglo XIX. Con el uso generalizado de la vacuna celular, la cual fue introducida a mediados de 1950, el número de casos de tos convulsa disminuyó abruptamente. Sin embargo, la reactividad de la vacuna celular formulada a partir de bacterias en fase virulenta (Bvg^+) inactivadas por calor (cP), determinó el desarrollo de vacunas acelulares (aP) que se formularon a partir de antígenos purificados (factores de virulencia regulados por el Bvg) de *B. pertussis*.

Existen en la actualidad preparaciones de aP monovalentes (incluyen solo PT detoxificada; dPT), bivalentes (dPT y FHA), trivalentes (dPT, FHA y Prn), tetravalentes (dPT, FHA, Prn y Fim) y pentavalentes (dPT, FHA, Prn, Fim2/3). Dado que ninguna de las vacunas aP contiene LPS no es sorprendente que estas vacunas, en general, sean menos reactivas que la vacuna cP. Sin embargo, a excepción de algunas vacunas pentavalentes, las vacunas aP son menos efectivas que la vacuna cP.

En Argentina, así como en otros países en vías de desarrollo, se continúa empleando la vacuna celular que se administra conjuntamente con toxoide tetánico y toxoide diftérico (DTP). La eficacia de esta vacuna correlaciona directamente con el número de dosis administradas: aproximadamente 18 % para una única dosis, 48 % para dos dosis, 58 % para tres dosis, y 68 % con cuatro o más dosis. Algunos países, utilizan un esquema de vacunación que incluye a los adultos (cuarta y quinta dosis) administrando vacuna celular en las tres primeras dosis y vacuna acelular en las últimas dos. Se cree que la vacunación de adultos podría disminuir la circulación del microorganismo en la población pero aún no hay datos que confirmen esta hipótesis.

Uno de los efectos de la vacunación ha sido el cambio en el rango etario de la incidencia de casos reportados de tos convulsa: de niños entre 1 a 9 años en poblaciones no vacunadas a infantes, adolescentes y adultos en poblaciones con altas tasas de vacunación [41]. Como se dijo anteriormente, en la última década la situación ha empeorado: aún en países con alto índice de vacunación incluyendo el nuestro la incidencia de la tos convulsa aumentó alarmantemente [44, 45, 124, 169], lo cual ha llevado a que la OMS declare a esta enfermedad re-emergente. La permanente circulación de la bacteria en la población a pesar de las vacunas en uso sumado a la mencionada pérdida progresiva de inmunidad post-vacunación probablemente ha generado esta situación epidemiológica cada vez más grave.

1.7 OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.

La habilidad de un patógeno para interactuar con su hospedador determina en gran medida su persistencia o éxito evolutivo. Dado que ni la inmunización ni la infección natural proveen inmunidad a largo plazo contra *B. pertussis*, y que la vacunación no evita la circulación de este patógeno, resulta evidente que *B. pertussis* es extraordinariamente exitosa en cuanto a su capacidad de supervivencia en el ambiente hostil del hospedador. Los datos epidemiológicos ponen de manifiesto que las vacunas en uso deben ser optimizadas con el fin de controlar la circulación de este patógeno en la población. Para lograr esto es fundamental comprender los mecanismos de patogénesis, definir los factores de virulencia involucrados en la colonización y, en particular, identificar nuevos antígenos protectores, no incluidos aún en las formulaciones vacunales, que impliquen una mejora sustancial en la protección brindada por la vacunación.

Durante el transcurso de la infección *B. pertussis* interactúa fundamentalmente con dos tipos celulares, células del epitelio respiratorio y células del sistema inmune. El resultado de esta interacción depende del estado inmunológico del hospedador y de las características fenotípicas de la bacteria. *B. pertussis* es un patógeno complejo que puede alternar entre diferentes fases o fenotipos. La expresión de factores de virulencia

o antígenos potenciales propios de cada fase o fenotipo podría cambiar significativamente durante la infección en respuesta a diversas señales. La temperatura es una de las señales de entorno que podría actuar sobre el sistema regulador Bvg *in vivo*. Se ha postulado que durante la etapa de transmisión, la temperatura ambiente podría modular la bacteria de manera que la entrada al nuevo hospedador ocurriría en fase intermedia o avirulenta. Esto implicaría que, al menos inicialmente, el fenotipo infectante es diferente del fenotipo vacunal (fase virulenta o antígenos purificados propios de esta fase) y que una respuesta inmune dirigida fundamentalmente contra la fase virulenta podría ser deficiente contra el fenotipo infectante. La posterior evolución hacia una fase virulenta dependería de las condiciones de entorno *in vivo*. Otro factor que regula cambios fenotípicos importantes en microorganismos patógenos es la disponibilidad de hierro. En el caso de *B. pertussis*, la modulación de fase regulada por el sistema Bvg no responde a esta señal del entorno, aunque como excepción y según se ha demostrado recientemente, la expresión de PT aumenta en ausencia de hierro [165]. Los cambios fenotípicos inducidos por escasez de hierro deberán estar presentes en el *fenotipo infectante*, dado que la expresión de estos sistemas y proteínas involucrados en la captura de hierro resulta indispensable para la supervivencia del patógeno dentro del hospedador. *B. pertussis* es un patógeno estrictamente humano y la transmisión ocurre de persona a persona, de manera que las bacterias que ingresan al nuevo hospedador están adaptadas a esta limitación. Sin embargo, las vacunas celulares y los antígenos que componen las vacunas acelulares se generan a partir de bacterias cultivadas en exceso de hierro, por lo que la respuesta inmune inducida por vacunación no está dirigida contra inmunógenos expresados en respuesta a dicha situación de stress.

El trabajo que se presenta a continuación intenta avanzar en el estudio del fenotipo infectante de *B. pertussis*. En resumen, los estudios realizados para definir la relevancia de los factores de virulencia regulados por el sistema Bvg en la interacción patógeno-células epiteliales respiratorias del hospedador se presentan en el **Capítulo 2**. En el **Capítulo 3** se evaluó la interacción entre factores de virulencia con distinto patrón de expresión durante la modulación de fase y su importancia en la interacción patógeno-células epiteliales respiratorias. En el **Capítulo 4** se evaluó el rol de la adaptación fenotípica de *B. pertussis* a las condiciones fisiológicas de limitación de hierro en la interacción con células epiteliales respiratorias. En el **Capítulo 5** se aborda la caracterización del fenotipo inducido por limitación de hierro y su inmunogenicidad, mediante el análisis comparativo del proteoma de *B. pertussis* y el análisis serológico de las proteínas presentes exclusivamente en este fenotipo con el fin de seleccionar inmunógenos expresados *in vivo* con potencialidad para constituirse en componentes vacunales. En el **Capítulo 6** se resumen las conclusiones generales de este trabajo.

1.8 REFERENCIAS.

- [1] Allavena P., Bianchi G., Zhou D., van D.J., Jilek P., Sozzani S., et al. Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. *Eur J Immunol.* 1994. 24 (12): 3233-6.
- [2] Anderson M.T., Armstrong S.K. The BfeR regulator mediates enterobactin-inducible expression of Bordetella enterobactin utilization genes. *J Bacteriol.* 2004. 186 (21): 7302-11.
- [3] Antoine R., Alonso S., Raze D., Coutte L., Lesjean S., Willery E., et al. New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in Bordetella pertussis. *J Bacteriol.* 2000. 182 (20): 5902-5.
- [4] Ayme G., Caroff M., Chaby R., Haeffner-Cavaillon N., Le D.A., Moreau M., et al. Biological activities of fragments derived from Bordetella pertussis endotoxin: isolation of a nontoxic, Shwartzman-negative lipid A possessing high adjuvant properties. *Infect Immun.* 1980. 27 (3): 739-45.
- [5] Banus H.A., Vandebriel R.J., de R.H., Dormans J.A., Nagelkerke N.J., Mooi F.R., et al. Host genetics of Bordetella pertussis infection in mice: significance of Toll-like receptor 4 in genetic susceptibility and pathobiology. *Infect Immun.* 2006. 74 (5): 2596-605.
- [6] Baron S., Njamkepo E., Grimprel E., Begue P., Desenclos J.C., Drucker J., et al. Epidemiology of pertussis in French hospitals in 1993 and 1994: thirty years after a routine use of vaccination. *Pediatr Infect Dis J.* 1998. 17 (5): 412-8.
- [7] Bassinet L., Gueirard P., Maitre B., Housset B., Gounon P., Guiso N. Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by Bordetella pertussis. *Infect Immun.* 2000. 68 (4): 1934-41.
- [8] Beall B. Two iron-regulated putative ferric siderophore receptor genes in Bordetella bronchiseptica and Bordetella pertussis. *Res Microbiol.* 1998. 149 (3): 189-201.
- [9] Beall B.W., Sanden G.N. Cloning and initial characterization of the Bordetella pertussis fur gene. *Curr Microbiol.* 1995. 30 (4): 223-6.
- [10] Beaumont F.C., Kang H.Y., Brickman T.J., Armstrong S.K. Identification and characterization of alcR, a gene encoding an AraC-like regulator of alcaligin siderophore biosynthesis and transport in Bordetella pertussis and Bordetella bronchiseptica. *J Bacteriol.* 1998. 180 (4): 862-70.
- [11] Beiter A., Lewis K., Pineda E.F., Cherry J.D. Unrecognized maternal peripartum pertussis with subsequent fatal neonatal pertussis. *Obstet Gynecol.* 1993. 82 (4 Pt 2 Suppl): 691-3.
- [12] Bisgard K.M., Pascual F.B., Ehresmann K.R., Miller C.A., Cianfrini C., Jennings C.E., et al. Infant pertussis: who was the source? *Pediatr Infect Dis J.* 2004. 23 (11): 985-9.
- [13] Bordet J., Gengou O. Le microbe de la coqueluche. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 1906. 20: 48-68.
- [14] Bosch A., Serra D., Prieto C., Schmitt J., Naumann D., Yantorno O. Characterization of Bordetella pertussis growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006. 71 (5): 736-47.
- [15] Boschwitz J.S., Batanghari J.W., Kedem H., Relman D.A. Bordetella pertussis infection of human monocytes inhibits antigen-dependent CD4 T cell proliferation. *J Infect Dis.* 1997. 176 (3): 678-86.
- [16] Boucher P.E., Stibitz S. Synergistic binding of RNA polymerase and BvgA phosphate to the pertussis toxin promoter of Bordetella pertussis. *J Bacteriol.* 1995. 177 (22): 6486-91.
- [17] Boucher P.E., Yang M.S., Schmidt D.M., Stibitz S. Genetic and biochemical analyses of BvgA interaction with the secondary binding region of the fha promoter of Bordetella pertussis. *J Bacteriol.* 2001. 183 (2): 536-44.

- [18] Boucher P.E., Maris A.E., Yang M.S., Stibitz S. 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*. 2003. 11 (1): 163-73.
- [19] Boursaux-Eude C., Guiso N. Polymorphism of repeated regions of pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun*. 2000. 68 (8): 4815-7.
- [20] Brickman T.J., Armstrong S.K. Essential role of the iron-regulated outer membrane receptor FauA in alcaligin siderophore-mediated iron uptake in *Bordetella* species. *J Bacteriol*. 1999. 181 (19): 5958-66.
- [21] Brickman T.J., Kang H.Y., Armstrong S.K. Transcriptional activation of *Bordetella* alcaligin siderophore genes requires the AlcR regulator with alcaligin as inducer. *J Bacteriol*. 2001. 183 (2): 483-9.
- [22] Brickman T.J., Armstrong S.K. *Bordetella* AlcS transporter functions in alcaligin siderophore export and is central to inducer sensing in positive regulation of alcaligin system gene expression. *J Bacteriol*. 2005. 187 (11): 3650-61.
- [23] Brickman T.J., Anderson M.T., Armstrong S.K. *Bordetella* iron transport and virulence. *Biometals*. 2007. .
- [24] Carbonetti N.H., Artamonova G.V., Van R.N., Ayala V.I. Pertussis Toxin Targets Airway Macrophages to Promote *Bordetella pertussis* Infection of the Respiratory Tract. *Infect Immun*. 2007. .
- [25] Cone T.E.J. Whooping cough is first described as a disease sui generis by Baillou in 1640. *Pediatrics*. 1970. 46: 522.
- [26] Confer D.L., Eaton J.W. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science*. 1982. 217 (4563): 948-50.
- [27] Confer D.L., Slungaard A.S., Graf E., Panter S.S., Eaton J.W. *Bordetella* adenylate cyclase toxin: entry of bacterial adenylate cyclase into mammalian cells. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res*. 1984. 17:183-7.: 183-7.
- [28] Cookson B.T., Tyler A.N., Goldman W.E. Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Biochemistry*. 1989. 28 (4): 1744-9.
- [29] Cotter P.A., Miller J.F. 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*. 1997. 24 (4): 671-85.
- [30] Cotter P.A., DiRita V.J. Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu Rev Microbiol*. 2000. 54:519-65.: 519-65.
- [31] Cotter P.A., Miller J.F., Groisman E.A. *Bordetella* Principles of bacterial pathogenesis. London, United Kingdom.: Academic Press, Ltd., 2001: 619-74.
- [32] Cotter P.A., Jones A.M. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol*. 2003. 11 (8): 367-73.
- [33] Coutte L., Antoine R., Drobecq H., Loch C., Jacob-Dubuisson F. Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J*. 2001. 20 (18): 5040-8.
- [34] Coutte L., Alonso S., Reveneau N., Willery E., Quatannens B., Loch C., et al. Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen. *J Exp Med*. 2003. 197 (6): 735-42.
- [35] Cowell J.L., Hewlett E.L., Manclark C.R. Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 1979. 25 (3): 896-901.
- [36] Crowcroft N.S., Stein C., Duclos P., Birmingham M. How best to estimate the global burden of pertussis? *Lancet Infect Dis*. 2003. 3 (7): 413-8.

- [37] Charles I.G., Dougan G., Pickard D., Chatfield S., Smith M., Novotny P., et al. Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989. 86 (10): 3554-8.
- [38] Cherry J.D., Gornbein J., Heininger U., Stehr K. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine*. 1998. 16 (20): 1901-6.
- [39] Cherry J.D. Epidemiological, clinical, and laboratory aspects of pertussis in adults. *Clin Infect Dis*. 1999. 28 Suppl 2: S112-S7.
- [40] Cherry J.D. The science and fiction of the "resurgence" of pertussis. *Pediatrics*. 2003. 112 (2): 405-6.
- [41] Cherry J.D., Heininger U., Feigin R.D., Demmler G.J., Kaplan S. Pertussis and other *Bordetella* infections. Textbook of pediatric infectious diseases. Philadelphia, Pa.: The W. B. Saunders Co., 2004: 1588-608.
- [42] Cherry J.D., Grimprel E., Guiso N., Heininger U., Mertsola J. Defining pertussis epidemiology: clinical, microbiologic and serologic perspectives. *Pediatr Infect Dis J*. 2005. 24 (5 Suppl): S25-S34.
- [43] Christie C.D., Baltimore R.S. Pertussis in neonates. *Am J Dis Child*. 1989. 143 (10): 1199-202.
- [44] de Melker H.E., Schellekens J.F., Neppelenbroek S.E., Mooi F.R., Rumke H.C., Conyn-van Spaendonck M.A. Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of the Netherlands: observations on surveillance data. *Emerg Infect Dis*. 2000. 6 (4): 348-57.
- [45] De S.G., Boulianne N., Douville F.M., Duval B. Pertussis in Quebec: ongoing epidemic since the late 1980s. *Can Commun Dis Rep*. 1995. 21 (5): 45-8.
- [46] Deen J.L., Mink C.A., Cherry J.D., Christenson P.D., Pineda E.F., Lewis K., et al. Household contact study of *Bordetella pertussis* infections. *Clin Infect Dis*. 1995. 21 (5): 1211-9.
- [47] Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002. 15 (2): 167-93.
- [48] El-Azami-El-Idrissi M., Bauche C., Loucka J., Osicka R., Sebo P., Ladant D., et al. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J Biol Chem*. 2003. 278 (40): 38514-21.
- [49] Emsley P., McDermott G., Charles I.G., Fairweather N.F., Isaacs N.W. Crystallographic characterization of pertactin, a membrane-associated protein from *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol*. 1994. 235 (2): 772-3.
- [50] Emsley P., Charles I.G., Fairweather N.F., Isaacs N.W. Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature*. 1996. 381 (6577): 90-2.
- [51] Everest P., Li J., Douce G., Charles I., De Azavedo J., Chatfield S., et al. 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*. 1996. 142 (Pt 11): 3261-8.
- [52] Farizo K.M., Cafarella T.G., Burns D.L. 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*. 1996. 271 (49): 31643-9.
- [53] Fernandez R.C., Weiss A.A. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun*. 1994. 62 (11): 4727-38.
- [54] Fernandez R.C., Weiss A.A. Serum resistance in bvg-regulated mutants of *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol Lett*. 1998. 163 (1): 57-63.

- [55] Fine P.E., Clarkson J.A. The recurrence of whooping cough: possible implications for assessment of vaccine efficacy. *Lancet*. 1982. 20 (1): 666-9.
- [56] Fingerhann M., Fernandez J., Sisti F., Rodriguez M.E., Gatti B., Bottero D., et al. Differences of circulating *Bordetella pertussis* population in Argentina from the strain used in vaccine production. *Vaccine*. 2006. 24 (17): 3513-21.
- [57] Finn T.M., Stevens L.A. Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol Microbiol*. 1995. 16 (4): 625-34.
- [58] Finn T.M., Amsbaugh D.F. Vag8, a *Bordetella pertussis* *byg*-regulated protein. *Infect Immun*. 1998. 66 (8): 3985-9.
- [59] Flak T.A., Goldman W.E. Autotoxicity of nitric oxide in airway disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996. 154 (4 Pt 2): S202-S6.
- [60] Flak T.A., Goldman W.E. Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell Microbiol*. 1999. 1 (1): 51-60.
- [61] Friedman R.L., Nordensson K., Wilson L., Akporiaye E.T., Yocum D.E. Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun*. 1992. 60 (11): 4578-85.
- [62] Fukui A., Horiguchi Y. *Bordetella* dermonecrotic toxin exerting toxicity through activation of the small GTPase Rho. *J Biochem (Tokyo)*. 2004. 136 (4): 415-9.
- [63] Geuijen C.A., Willems R.J., Mooi F.R. The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars. *Infect Immun*. 1996. 64 (7): 2657-65.
- [64] Geuijen C.A., Willems R.J., Bongaerts M., Top J., Gielen H., Mooi F.R. Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. *Infect Immun*. 1997. 65 (10): 4222-8.
- [65] Glaser P., Sakamoto H., Bellalou J., Ullmann A., Danchin A. Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO J*. 1988. 7 (12): 3997-4004.
- [66] Gray M.C., Donato G.M., Jones F.R., Kim T., Hewlett E.L. Newly secreted adenylate cyclase toxin is responsible for intoxication of target cells by *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol*. 2004. 53 (6): 1709-19.
- [67] Guedin S., Willery E., Tommassen J., Fort E., Drobecq H., Locht C., et al. Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem*. 2000. 275 (39): 30202-10.
- [68] Gueirard P., Druilhe A., Pretolani M., Guiso N. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection in vivo. *Infect Immun*. 1998. 66 (4): 1718-25.
- [69] Guerinet M.L. Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol*. 1994. 48: 743-72.
- [70] Guermonprez P., Khelef N., Blouin E., Rieu P., Ricciardi-Castagnoli P., Guiso N., et al. The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med*. 2001. 193 (9): 1035-44.
- [71] Halperin S.A. The control of pertussis--2007 and beyond. *N Engl J Med*. 2007. 356 (2): 110-3.
- [72] Hanski E., Farfel Z. *Bordetella pertussis* invasive adenylate cyclase. Partial resolution and properties of its cellular penetration. *J Biol Chem*. 1985. 260 (9): 5526-32.
- [73] Hanski E. Invasive adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Trends Biochem Sci*. 1989. 14 (11): 459-63.

- [74] Hazenbos W.L., van den Berg B.M., van't Wout J.W., Mooi F.R., van F.R. Virulence factors determine attachment and ingestion of nonopsonized and opsonized Bordetella pertussis by human monocytes. *Infect Immun.* 1994. 62 (11): 4818-24.
- [75] Hazenbos W.L., Geuijen C.A., van den Berg B.M., Mooi F.R., van F.R. Bordetella pertussis fimbriae bind to human monocytes via the minor fimbrial subunit FimD. *J Infect Dis.* 1995. 171 (4): 924-9.
- [76] Hazenbos W.L., van den Berg B.M., Geuijen C.W., Mooi F.R., van F.R. 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 (8): 3972-8.
- [77] Heininger U., Cherry J.D., Eckhardt T., Lorenz C., Christenson P., Stehr K. Clinical and laboratory diagnosis of pertussis in the regions of a large vaccine efficacy trial in Germany. *Pediatr Infect Dis J.* 1993. 12 (6): 504-9.
- [78] Heininger U., Klich K., Stehr K., Cherry J.D. Clinical findings in Bordetella pertussis infections: results of a prospective multicenter surveillance study. *Pediatrics.* 1997. 100 (6): E10.
- [79] Heiss L.N., Flak T.A., Lancaster J.R., Jr., McDaniel M.L., Goldman W.E. Nitric oxide mediates Bordetella pertussis tracheal cytotoxin damage to the respiratory epithelium. *Infect Agents Dis.* 1993. 2 (4): 173-7.
- [80] Heiss L.N., Moser S.A., Unanue E.R., Goldman W.E. Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis. *Infect Immun.* 1993. 61 (8): 3123-8.
- [81] Heiss L.N., Lancaster J.R., Jr., Corbett J.A., Goldman W.E. Epithelial autotoxicity of nitric oxide: role in the respiratory cytopathology of pertussis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994. 91 (1): 267-70.
- [82] Hellwig S.M., Hazenbos W.L., van de Winkel J.G., Mooi F.R. Evidence for an intracellular niche for Bordetella pertussis in broncho-alveolar lavage cells of mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999. 26 (3-4): 203-7.
- [83] Hellwig S.M., Rodriguez M.E., Berbers G.A., van de Winkel J.G., Mooi F.R. Crucial role of antibodies to pertactin in Bordetella pertussis immunity. *J Infect Dis.* 2003. 188 (5): 738-42.
- [84] Henderson I.R., Nataro J.P. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun.* 2001. 69 (3): 1231-43.
- [85] Hewlett E.L., Gordon V.M., McCaffery J.D., Sutherland W.M., Gray M.C. Adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis. Identification and purification of the holotoxin molecule. *J Biol Chem.* 1989. 264 (32): 19379-84.
- [86] Higgins S.C., Lavelle E.C., McCann C., Keogh B., McNeela E., Byrne P., et al. Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to Bordetella pertussis by inhibiting inflammatory pathology. *J Immunol.* 2003. 171 (6): 3119-27.
- [87] Hodak H., Clantin B., Willery E., Villeret V., Loch C., Jacob-Dubuisson F. Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate. *Mol Microbiol.* 2006. 61 (2): 368-82.
- [88] Hoppe J.E. Neonatal pertussis. *Pediatr Infect Dis J.* 2000. 19 (3): 244-7.
- [89] Hot D., Antoine R., Renaud-Mongenie G., Caro V., Hennuy B., Levillain E., et al. Differential modulation of Bordetella pertussis virulence genes as evidenced by DNA microarray analysis. *Mol Genet Genomics.* 2003. 269 (4): 475-86.
- [90] Ishibashi Y., Claus S., Relman D.A. Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J Exp Med.* 1994. 180 (4): 1225-33.

- [91] Ishibashi Y., Relman D.A., Nishikawa A. Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and alpha5beta1 integrin. *Microb Pathog*. 2001. 30 (5): 279-88.
- [92] Ishibashi Y., Nishikawa A. *Bordetella pertussis* infection of human respiratory epithelial cells up-regulates intercellular adhesion molecule-1 expression: role of filamentous hemagglutinin and pertussis toxin. *Microb Pathog*. 2002. 33 (3): 115-25.
- [93] Ishibashi Y., Nishikawa A. Role of nuclear factor-kappa B in the regulation of intercellular adhesion molecule 1 after infection of human bronchial epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Microb Pathog*. 2003. 35 (4): 169-77.
- [94] Jacob-Dubuisson F., El-Hamel C., Saint N., Guedin S., Willery E., Molle G., et al. Channel formation by FhaC, the outer membrane protein involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem*. 1999. 274 (53): 37731-5.
- [95] Kang H.Y., Armstrong S.K. Transcriptional analysis of the *Bordetella alcaligin* siderophore biosynthesis operon. *J Bacteriol*. 1998. 180 (4): 855-61.
- [96] Kaslow H.R., Burns D.L. Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *FASEB J*. 1992. 6 (9): 2684-90.
- [97] Katada T., Tamura M., Ui M. The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein. *Arch Biochem Biophys*. 1983. 224 (1): 290-8.
- [98] Kerr J.R., Matthews R.C. *Bordetella pertussis* infection: pathogenesis, diagnosis, management, and the role of protective immunity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000. 19 (2): 77-88.
- [99] Khelef N., Zychlinsky A., Guiso N. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun*. 1993. 61 (10): 4064-71.
- [100] Kirimanjeswara G.S., Agosto L.M., Kennett M.J., Bjornstad O.N., Harvill E.T. Pertussis toxin inhibits neutrophil recruitment to delay antibody-mediated clearance of *Bordetella pertussis*. *J Clin Invest*. 2005. 115 (12): 3594-601.
- [101] Ledermann W.D. Breve historia de la *Bordetella pertussis*, una elusiva damisela. *Rev Chil Infect*. 2004. 23 (3): 241-6.
- [102] Litwin C.M., Calderwood S.B. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev*. 1993. 6 (2): 137-49.
- [103] Lobet Y., Feron C., Dequesne G., Simoen E., Hauser P., Locht C. Site-specific alterations in the B oligomer that affect receptor-binding activities and mitogenicity of pertussis toxin. *J Exp Med*. 1993. 177 (1): 79-87.
- [104] Locht C., Keith J.M. Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization. *Science*. 1986. 232 (4755): 1258-64.
- [105] Long S.S., Lischner H.W., Deforest A., Clark J.L. Serologic evidence of subclinical pertussis in immunized children. *Pediatr Infect Dis J*. 1990. 9 (10): 700-5.
- [106] Long S.S., Welkon C.J., Clark J.L. Widespread silent transmission of pertussis in families: antibody correlates of infection and symptomatology. *J Infect Dis*. 1990. 161 (3): 480-6.
- [107] Luker K.E., Collier J.L., Kolodziej E.W., Marshall G.R., Goldman W.E. *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin and other muramyl peptides: distinct structure-activity relationships for respiratory epithelial cytopathology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993. 90 (6): 2365-9.

- [108] Luker K.E., Tyler A.N., Marshall G.R., Goldman W.E. Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in pertussis. *Mol Microbiol.* 1995. 16 (4): 733-43.
- [109] Lyons A.B. Pertussis toxin pretreatment alters the in vivo cell division behaviour and survival of B lymphocytes after intravenous transfer. *Immunol Cell Biol.* 1997. 75 (1): 7-12.
- [110] Mahon B.P., Ryan M.S., Griffin F., Mills K.H. Interleukin-12 is produced by macrophages in response to live or killed *Bordetella pertussis* and enhances the efficacy of an acellular pertussis vaccine by promoting induction of Th1 cells. *Infect Immun.* 1996. 64 (12): 5295-301.
- [111] Mann P.B., Wolfe D., Latz E., Golenbock D., Preston A., Harvill E.T. Comparative toll-like receptor 4-mediated innate host defense to *Bordetella* infection. *Infect Immun.* 2005. 73 (12): 8144-52.
- [112] Masure H.R. The adenylate cyclase toxin contributes to the survival of *Bordetella pertussis* within human macrophages. *Microb Pathog.* 1993. 14 (4): 253-60.
- [113] Matsuzawa T., Fukui A., Kashimoto T., Nagao K., Oka K., Miyake M., et al. *Bordetella* dermonecrotic toxin undergoes proteolytic processing to be translocated from a dynamin-related endosome into the cytoplasm in an acidification-independent manner. *J Biol Chem.* 2004. 279 (4): 2866-72.
- [114] Mattoo S., Foreman-Wykert A.K., Cotter P.A., Miller J.F. Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis. *Front Biosci.* 2001. 6:E168-86.: E168-E86.
- [115] Mattoo S., Cherry J.D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev.* 2005. 18 (2): 326-82.
- [116] Mazar J., Cotter P.A. Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol Microbiol.* 2006. 62 (3): 641-54.
- [117] McGregor J., Ogle J.W., Curry-Kane G. Perinatal pertussis. *Obstet Gynecol.* 1986. 68 (4): 582-6.
- [118] McGuirk P., Mahon B.P., Griffin F., Mills K.H. Local cellular immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*: role of costimulatory molecules. *Biochem Soc Trans.* 1997. 25 (1): 124S.
- [119] McGuirk P., Mills K.H. 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.* 2000. 30 (2): 415-22.
- [120] Meade B.D., Kind P.D., Manclark C.R. Altered mononuclear phagocyte function in mice treated with the lymphocytosis promoting factor of *Bordetella pertussis*. *Dev Biol Stand.* 1985. 61:63-74.: 63-74.
- [121] Meluleni G.J., Grout M., Evans D.J., Pier G.B. Mucoic *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoic exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. *J Immunol.* 1995. 155 (4): 2029-38.
- [122] Menozzi F.D., Gantiez C., Loch C. Identification and purification of transferrin- and lactoferrin-binding proteins of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* 1991. 59 (11): 3982-8.
- [123] Menozzi F.D., Gantiez C., Loch C. Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin. *FEMS Microbiol Lett.* 1991. 62 (1): 59-64.
- [124] Menzies R., Wang H., McIntyre P. Has pertussis increased in NSW over the past decade? An evaluation using hospitalisation and mortality data versus notifications 1988-2002. *NSW Public Health Bull.* 2003. 14 (4-5): 71-6.

- [125] Mikelova L.K., Halperin S.A., Scheifele D., Smith B., Ford-Jones E., Vaudry W., et al. Predictors of death in infants hospitalized with pertussis: a case-control study of 16 pertussis deaths in Canada. *J Pediatr*. 2003. 143 (5): 576-81.
- [126] Mills K.H. Immunity to *Bordetella pertussis*. *Microbes Infect*. 2001. 3 (8): 655-77.
- [127] Mishra M., Parise G., Jackson K.D., Wozniak D.J., Deora R. The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*. *J Bacteriol*. 2005. 187 (4): 1474-84.
- [128] Moeck G.S., Coulton J.W. TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol Microbiol*. 1998. 28 (4): 675-81.
- [129] Mooi F.R., van der Heide H.G., ter Avest A.R., Welinder K.G., Livey I., van der Zeijst B.A., et al. Characterization of fimbrial subunits from *Bordetella* species. *Microb Pathog*. 1987. 2 (6): 473-84.
- [130] Mooi F.R., Jansen W.H., Brunings H., Gielen H., van der Heide H.G., Walvoort H.C., et al. Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. *Microb Pathog*. 1992. 12 (2): 127-35.
- [131] Moore C.H., Foster L.A., Gerbig D.G., Jr., Dyer D.W., Gibson B.W. Identification of alcaligin as the siderophore produced by *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *J Bacteriol*. 1995. 177 (4): 1116-8.
- [132] Mouallem M., Farfel Z., Hanski E. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: intoxication of host cells by bacterial invasion. *Infect Immun*. 1990. 58 (11): 3759-64.
- [133] Munoz J.J., Wardlaw A.C., Parton R. Action of pertussigen (pertussis toxin) on the host immune system in pathogenesis and immunity in pertussis. *Pathogenesis and Immunity in pertussis*. New York, N. Y.: John Wiley & Sons, Ltd., 1988: 173-92.
- [134] Nakase Y., Tateishi M., Sekiya K., Kasuga T. Chemical and biological properties of the purified O antigen of *Bordetella pertussis*. *Jpn J Microbiol*. 1970. 14 (1): 1-8.
- [135] Nicosia A., Perugini M., Franzini C., Casagli M.C., Borri M.G., Antoni G., et al. Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: operon structure and gene duplication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986. 83 (13): 4631-5.
- [136] Njamkepo E., Pinot F., Francois D., Guiso N., Polla B.S., Bachelet M. Adaptive responses of human monocytes infected by *bordetella pertussis*: the role of adenylate cyclase hemolysin. *J Cell Physiol*. 2000. 183 (1): 91-9.
- [137] Oliver D.C., Huang G., Fernandez R.C. Identification of secretion determinants of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter. *J Bacteriol*. 2003. 185 (2): 489-95.
- [138] Oliver D.C., Huang G., Nodel E., Pleasance S., Fernandez R.C. A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Mol Microbiol*. 2003. 47 (5): 1367-83.
- [139] Passerini de Rossi B.N., Friedman L.E., Belzoni C.B., Savino S., Arico B., Rappuoli R., et al. Vir90, a virulence-activated gene coding for a *Bordetella pertussis* iron-regulated outer membrane protein. *Res Microbiol*. 2003. 154 (6): 443-50.
- [140] Pearson R.D., Symes P., Conboy M., Weiss A.A., Hewlett E.L. Inhibition of monocyte oxidative responses by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J Immunol*. 1987. 139 (8): 2749-54.
- [141] Pittman M. The concept of pertussis as a toxin-mediated disease. *Pediatr Infect Dis*. 1984. 3 (5): 467-86.

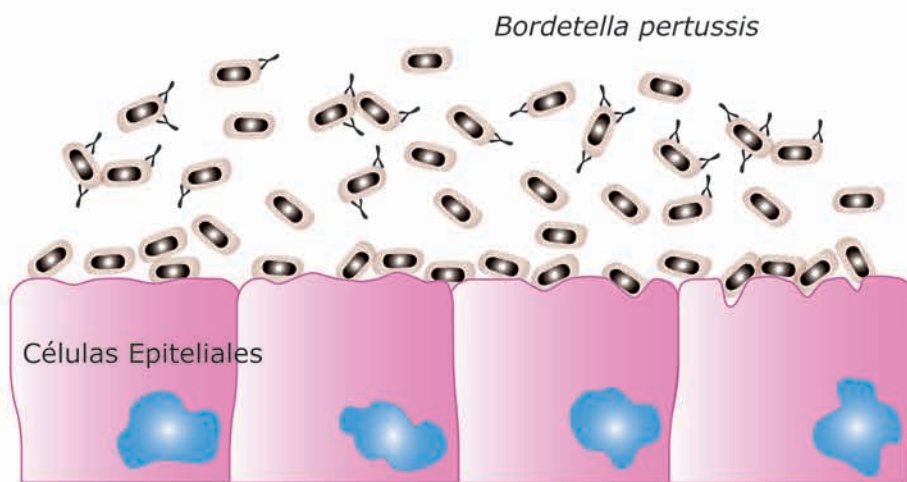
- [142] Pradel E., Guiso N., Locht C. Identification of AlcR, an AraC-type regulator of alcaligin siderophore synthesis in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1998. 180 (4): 871-80.
- [143] Pradel E., Guiso N., Menozzi F.D., Locht C. *Bordetella pertussis* TonB, a Bvg-independent virulence determinant. *Infect Immun.* 2000. 68 (4): 1919-27.
- [144] Prasad S.M., Yin Y., Rodzinski E., Tuomanen E.I., Masure H.R. Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1993. 61 (7): 2780-5.
- [145] Preston A., Thomas R., Maskell D.J. Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* wlb LPS biosynthesis locus. *Microb Pathog.* 2002. 33 (3): 91-5.
- [146] Qadri F., Haque A., Hossain A., Albert M.J. Production of slime polysaccharides by *Shigella dysenteriae* type 1. *Microbiol Immunol.* 1994. 38 (1): 11-8.
- [147] Relman D., Tuomanen E., Falkow S., Golenbock D.T., Saukkonen K., Wright S.D. Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell.* 1990. 61 (7): 1375-82.
- [148] Rodriguez M.E., Hellwig S.M., Hozbor D.F., Leusen J., van der Pol W.L., van de Winkel J.G. Fc receptor-mediated immunity against *Bordetella pertussis*. *J Immunol.* 2001. 167 (11): 6545-51.
- [149] Rogel A., Schultz J.E., Brownlie R.M., Coote J.G., Parton R., Hanski E. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: purification and characterization of the toxic form of the enzyme. *EMBO J.* 1989. 8 (9): 2755-60.
- [150] Rogel A., Meller R., Hanski E. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. The relationship between induction of cAMP and hemolysis. *J Biol Chem.* 1991. 266 (5): 3154-61.
- [151] Rose T., Sebo P., Bellalou J., Ladant D. Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem.* 1995. 270 (44): 26370-6.
- [152] Rosenthal R.S., Nogami W., Cookson B.T., Goldman W.E., Folkening W.J. Major fragment of soluble peptidoglycan released from growing *Bordetella pertussis* is tracheal cytotoxin. *Infect Immun.* 1987. 55 (9): 2117-20.
- [153] Roy C.R., Falkow S. Identification of *Bordetella pertussis* regulatory sequences required for transcriptional activation of the *fhaB* gene and autoregulation of the *bvgAS* operon. *J Bacteriol.* 1991. 173 (7): 2385-92.
- [154] Ryan M., McCarthy L., Rappuoli R., Mahon B.P., Mills K.H. Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. *Int Immunol.* 1998. 10 (5): 651-62.
- [155] Sakurai S., Kamachi K., Konda T., Miyajima N., Kohase M., Yamamoto S. Nitric oxide induction by pertussis toxin in mouse spleen cells via gamma interferon. *Infect Immun.* 1996. 64 (4): 1309-13.
- [156] Saukkonen K., Cabellos C., Burroughs M., Prasad S., Tuomanen E. Integrin-mediated localization of *Bordetella pertussis* within macrophages: role in pulmonary colonization. *J Exp Med.* 1991. 173 (5): 1143-9.
- [157] Schaeffer L.M., McCormack F.X., Wu H., Weiss A.A. *Bordetella pertussis* lipopolysaccharide resists the bactericidal effects of pulmonary surfactant protein A. *J Immunol.* 2004. 173 (3): 1959-65.

- [158] Serra D., Bosch A., Russo D.M., Rodriguez M.E., Zorreguieta A., Schmitt J., et al. Continuous nondestructive monitoring of *Bordetella pertussis* biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy and other corroborative techniques. *Anal Bioanal Chem.* 2007. 387 (5): 1759-67.
- [159] Shiau A.L., Wu C.L. The inhibitory effect of *Staphylococcus epidermidis* slime on the phagocytosis of murine peritoneal macrophages is interferon-independent. *Microbiol Immunol.* 1998. 42 (1): 33-40.
- [160] Spangrude G.J., Sacchi F., Hill H.R., Van Epps D.E., Daynes R.A. Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. *J Immunol.* 1985. 135 (6): 4135-43.
- [161] Steed L.L., Setareh M., Friedman R.L. Intracellular survival of virulent *Bordetella pertussis* in human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol.* 1991. 50 (4): 321-30.
- [162] Storsaeter J., Hallander H.O., Gustafsson L., Olin P. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine.* 1998. 16 (20): 1907-16.
- [163] Tamura M., Nogimori K., Murai S., Yajima M., Ito K., Katada T., et al. Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry.* 1982. 21 (22): 5516-22.
- [164] Tamura M., Nogimori K., Yajima M., Ase K., Ui M. A role of the B-oligomer moiety of islet-activating protein, pertussis toxin, in development of the biological effects on intact cells. *J Biol Chem.* 1983. 258 (11): 6756-61.
- [165] Thalen M., Venema M., van d.I., Berwald L., Beuvery C., Martens D., et al. Effect of relevant culture parameters on Pertussis Toxin expression by *Bordetella pertussis*. *Biologicals.* 2006. 34 (3): 213-20.
- [166] Torre D., Ferrario G., Bonetta G., Perversi L., Speranza F. In vitro and in vivo induction of nitric oxide by murine macrophages stimulated with *Bordetella pertussis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1996. 13 (2): 95-9.
- [167] Torre D., Speranza F., Pugliese A., Fassina G., Osculati A., Perversi L., et al. Regulation of inflammatory responses to *Bordetella pertussis* by N(G)-monomethyl-L-arginine in mice intranasally infected. *Mediators Inflamm.* 1999. 8 (1): 25-9.
- [168] Tuomanen E., Weiss A. Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory-epithelial cells. *J Infect Dis.* 1985. 152 (1): 118-25.
- [169] van Amersfoort S.C., Schouls L.M., van der Heide H.G., Advani A., Hallander H.O., Bondeson K., et al. Analysis of *Bordetella pertussis* populations in European countries with different vaccination policies. *J Clin Microbiol.* 2005. 43 (6): 2837-43.
- [170] Vanderpool C.K., Armstrong S.K. The *Bordetella* *bhu* locus is required for heme iron utilization. *J Bacteriol.* 2001. 183 (14): 4278-87.
- [171] Vanderpool C.K., Armstrong S.K. Heme-responsive transcriptional activation of *Bordetella* *bhu* genes. *J Bacteriol.* 2003. 185 (3): 909-17.
- [172] Vanderpool C.K., Armstrong S.K. Integration of environmental signals controls expression of *Bordetella* heme utilization genes. *J Bacteriol.* 2004. 186 (4): 938-48.
- [173] Vergara-Irigaray N., Chavarri-Martinez A., Rodriguez-Cuesta J., Miller J.F., Cotter P.A., Martinez d.T. Evaluation of the role of the *Bvg* intermediate phase in *Bordetella pertussis* during experimental respiratory infection. *Infect Immun.* 2005. 73 (2): 748-60.
- [174] Verma A., Burns D.L. Requirements for Assembly of PtlH with the Pertussis Toxin Transporter Apparatus of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 2007. 75 (5): 2297-306.

- [175] Watanabe M., Takimoto H., Kumazawa Y., Amano K. Biological properties of lipopolysaccharides from *Bordetella* species. *J Gen Microbiol.* 1990. 136 (3): 489-93.
- [176] Weinberg E.D., Roth J.A., Bolin C.A., Brogden K.A., Minion F.C., Wannemuehler M.J. Acquisition of iron and other nutrients in vivo. Virulence mechanisms of bacterial pathogens. Washington, D. C.: American Society for Microbiology., 1995: 81-95.
- [177] Weiss A.A., Falkow S. Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1984. 43 (1): 263-9.
- [178] Welch R.A. Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol.* 1991. 5 (3): 521-8.
- [179] Wilson R., Read R., Thomas M., Rutman A., Harrison K., Lund V., et al. Effects of *Bordetella pertussis* infection on human respiratory epithelium in vivo and in vitro. *Infect Immun.* 1991. 59 (1): 337-45.
- [180] Willems R.J., Geuijen C., van der Heide H.G., Renauld G., Bertin P., van den Akker W.M., et al. Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* fim/fha gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA. *Mol Microbiol.* 1994. 11 (2): 337-47.
- [181] Williams C.L., Boucher P.E., Stibitz S., Cotter P.A. BvgA functions as both an activator and a repressor to control Bvg phase expression of bipA in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 2005. 56 (1): 175-88.
- [182] Wolff J., Cook G.H., Goldhammer A.R., Berkowitz S.A. Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980. 77 (7): 3841-4.
- [183] Xing D.K., Canthaboo C., Corbel M.J. Nitric oxide induction in murine macrophages and spleen cells by whole-cell *Bordetella pertussis* vaccine. *Vaccine.* 1998. 16 (1): 16-23.
- [184] Xing D.K., Canthaboo C., Corbel M.J. Effect of pertussis toxin on the induction of nitric oxide synthesis in murine macrophages and on protection in vivo. *Vaccine.* 2000. 18 (20): 2110-9.
- [185] Yasuda H., Ajiki Y., Aoyama J., Yokota T. Interaction between human polymorphonuclear leucocytes and bacteria released from in-vitro bacterial biofilm models. *J Med Microbiol.* 1994. 41 (5): 359-67.
- [186] Yeh S.H., Mink C.M. Shift in the epidemiology of pertussis infection: an indication for pertussis vaccine boosters for adults? *Drugs.* 2006. 66 (6): 731-41.
- [187] Zaretsky F.R., Gray M.C., Hewlett E.L. Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of *Bordetella pertussis*: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction. *Mol Microbiol.* 2002. 45 (6): 1589-98.
- [188] Zhang Y.L., Sekura R.D. Purification and characterization of the heat-labile toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1991. 59 (10): 3754-9.

CAPITULO 2

*FACTORES DE VIRULENCIA REGULADOS POR EL SISTEMA BVG.
SU IMPORTANCIA EN LA COLONIZACIÓN DEL EPITELIO RESPIRATORIO.*



2. FACTORES DE VIRULENCIA REGULADOS POR EL SISTEMA Bvg. SU PARTICIPACIÓN EN LA COLONIZACIÓN DEL EPITELIO RESPIRATORIO.	40
<hr/>	
2.1 INTRODUCCIÓN.	40
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.	41
2.2.1. CEPAS BACTERIANAS.	41
2.2.2. SUEROS Y ANTICUERPOS.	41
2.2.3. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO DE <i>B. PERTUSSIS</i> .	42
2.2.4. CONDICIONES DE CULTIVO DE LÍNEA CELULAR A549.	42
2.2.5. ENSAYO DE AGLUTINACIÓN.	43
2.2.6. ENSAYO DE ADHESIÓN.	43
2.2.7. DETERMINACIÓN DE INVASIÓN Y SOBREVIDA.	43
2.2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	44
2.3 RESULTADOS.	46
2.3.1. ADHESIÓN DE <i>B. PERTUSSIS</i> A CÉLULAS EPITELIO-ALVEOLARES.	46
2.3.1.1. Factores de virulencia regulados por Bvg involucrados en la adhesión a células epiteliales.	46
2.3.1.2. Especificidad de los anticuerpos que bloquean la adhesión bacteriana a células epiteliales.	47
2.3.2. INVASIÓN Y PERSISTENCIA DE <i>B. PERTUSSIS</i> EN CÉLULAS EPITELIO-ALVEOLARES.	51
2.4 DISCUSIÓN.	54
2.5 CONCLUSIONES.	58
2.6 REFERENCIAS.	60

2. FACTORES DE VIRULENCIA REGULADOS POR EL SISTEMA Bvg. SU PARTICIPACIÓN EN LA COLONIZACIÓN DEL EPITELIO RESPIRATORIO.

2.1 INTRODUCCIÓN.

La adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales del tracto respiratorio del hospedador es un evento crucial para la colonización. *B. pertussis* presenta una estructura antigénica fundamentalmente proteica y posee un gran número de factores de virulencia a través de los cuales interacciona con el hospedador durante el ciclo infeccioso. La expresión de la mayoría de estos factores esta regulada por el locus BvgAS [5]. La regulación precisa y temporal de los factores de virulencia parecería ser un factor determinante durante la colonización del epitelio respiratorio. La identificación de los factores involucrados en la adhesión al epitelio es importante para la determinación de los factores que deben ser bloqueados a este nivel, no solo porque la adhesión es el paso inicial de la colonización sino porque se ha postulado que *B. pertussis* es capaz de invadir y sobrevivir dentro de células epiteliales favoreciendo la inmunoevasión y persistencia de este patógeno.

La contribución relativa de la inmunidad humoral y celular en la protección contra *B. pertussis* se encuentra aún en discusión. Sin embargo, la eliminación bacteriana del tracto respiratorio requiere la acción conjunta de ambos sistemas. Estudios clínicos indican que la presencia de anticuerpos contra ciertos factores de virulencia de *B. pertussis* correlaciona con la protección [7, 32]. Los anticuerpos pueden prevenir la adhesión a células epiteliales del tracto respiratorio (bloqueo de adhesinas), neutralizar toxinas bacterianas, fijar complemento o promover la opsonofagocitosis. Resultados previos de nuestro grupo demostraron que la inducción de actividad celular bactericida en células inmunes requiere la presencia de anticuerpos específicos contra *B. pertussis* [27]. Particularmente, los anticuerpos anti-Prn cumplen un rol clave en promover la captura y fagocitosis bacteriana [14]. Sin embargo, la especificidad de los anticuerpos capaces de prevenir la adhesión continúa siendo un aspecto en discusión. Tuomanen *et al.* [34], demostraron que existe actividad antiadherente en suero de individuos infectados con *B. pertussis*, pero no determinaron la especificidad de estos anticuerpos.

En este capítulo se presentan los estudios realizados para determinar los factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS que intervienen en la adhesión, invasión y sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en células epiteliales del tracto respiratorio y la especificidad de los anticuerpos capaces de bloquear esta interacción. Dado que *B. pertussis* es un patógeno estrictamente humano se utilizaron células epiteliales respiratorias humanas (neumocitos tipo II) como modelo de infección.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

2.2.1. CEPAS BACTERIANAS.

Las cepas utilizadas en este estudio se detallan en la **Tabla 1**. Los stocks bacterianos se conservaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio Stainer-Scholte suplementado con 15 % de glicerol como agente crioprotector. En este capítulo, las cepas de *B. pertussis* (salvaje y mutantes) se ensayaron en fase virulenta a menos que se especifique lo contrario.

Tabla 1. Cepas de *B. pertussis*.

Cepa	Descripción	Cita
Bp Tohama	Cepa salvaje	[28]
Bp 537	Tohama, Bvg (-) avirulenta	[25]
Bp RA	Tohama, PT (-)	[2]
Bp B52	Tohama, Fim (-)	[20]
Bp GR4	Tohama, FHA (-)	[39]
Bp BBC42	Tohama, Prn (-)	[26]
Bp 3183	Tohama, ACT (-)	[38]

2.2.2. SUEROS Y ANTICUERPOS.

Se utilizaron 24 sueros provenientes de un ensayo clínico de evaluación de eficacia de vacunas contra *B. pertussis* [4]. El título de anticuerpos contra PT, FHA, Prn y Fim de estos sueros se determinó por ELISA según Meade *et al.* [22]. La depleción de anticuerpos anti-Fim o anti-Prn se llevó a cabo según describen Hellwig *et al.* [14]. La pureza de los antígenos Fim2, Fim3 y Prn usados para la depleción se confirmó por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e inmunoblot. La incubación del suero con las diferentes proteínas (Fim2 y Fim3 o Prn) sustrajo selectivamente los anticuerpos específicos para los respectivos antígenos. El título de anticuerpos con otra especificidad (FHA, PT y Prn o Fim) permaneció invariable antes y después del procedimiento de depleción, según se determinó por ELISA.

Se realizó el siguiente procedimiento para la obtención de suero anti-Fim de conejo. Conejos libre de patógenos se inmunizaron subcutáneamente con 500 μg de Fim2-Fim3 purificada (*Netherlands Vaccine Institute, Bilthoven, The Netherlands*) formulada con adyuvante de Freund. En la semana 3 y semana 6 se realizaron inmunizaciones de refuerzo. Finalmente, se colectó el suero transcurridas 7 semanas de la inmunización primaria.

Los anticuerpos monoclonales (mAc) dirigidos contra epitopes específicos de *B. pertussis* utilizados en este estudio han sido descritos por Poolman *et al.* [24] y fueron provistos por el *National Institute of Public Health and the Environment, The Netherlands*. Los mismos se detallan a continuación. Anticuerpos monoclonales: anti-FHA (mAc 37F3, isotipo IgG1, 1 mg ml^{-1}), anti-Prn (mAc 13E 11, isotipo IgG, 1 mg

ml⁻¹), anti-Fim 2 (mAc 118E10, isotipo IgG1, 1 mg ml⁻¹) y anti-Fim 3 (mAc 48B5, isotipo IgG1, 1 mg ml⁻¹). El Anticuerpo monoclonal específico contra la toxina adenilato ciclasa de *B. pertussis* (mAc 2A12, isotipo IgG2a, 1 mg ml⁻¹) fue provisto por el Dr. Hewlett, Universidad de Virginia, USA.

2.2.3. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO DE *B. PERTUSSIS*.

Para el cultivo de *B. pertussis* en medio líquido se utilizó el medio de base Stainer-Scholte (SS) [30], cuya composición se detalla a continuación.

Componentes esterilizados por calor: Glutamato monosódico (10.70 g l⁻¹), L-Prolina (0.24 g l⁻¹), KH₂PO₄ (0.50 g l⁻¹), KCl (0.20 g l⁻¹), MgCl₂·6H₂O (0.10 g l⁻¹), CaCl₂ (solución al 1%, 2 ml), Tris-HCl (1.52 g l⁻¹), NaCl (2.50 g l⁻¹).

Componentes esterilizados por filtración a través de una membrana de 0.22 µm: SO₄Fe·4H₂O (10 mg l⁻¹), L-Cistina (40 mg l⁻¹), HCl (0.1 ml l⁻¹), ácido ascórbico (20 mg l⁻¹), ácido nicotínico (4mg l⁻¹), L-glutatió reducido (100 mg l⁻¹).

Las diferentes cepas de *B. pertussis* fueron cultivadas en placas de Agar Bordet-Gengou (DIFCO Laboratories, USA) suplementado con 15 % de sangre desfibrinada de carnero (ABGs) durante 72 hs a 37 °C, al cabo de lo cual se repicaron en una nueva placa ABGs y se cultivaron a 37 °C durante 24 hs. Las cepas mutantes se cultivaron en las condiciones de restricción recomendadas para lo cual el ABGs fue suplementado con el/los antibióticos adecuados (kanamicina, 25 µg ml⁻¹; estreptomina, 50 µg ml⁻¹). Se utilizó la expresión de ACT (primer antígeno cuya expresión se inhibe en el cambio a fase avirulenta) a través del análisis de la presencia de halo de hemólisis en ABGs, como marcador de virulencia.

Los cultivos en medio líquido se iniciaron a partir de un cultivo en medio sólido del cual se extrajo un inóculo para sembrar 20 ml de medio SS en un erlemeyer de 100 ml con una densidad óptica (DO) inicial de 0.2 (A_{650nm}). Los cultivos se incubaron en un agitador orbital (160 r.p.m.) a 37 °C durante 30 hs (final de fase exponencial). El crecimiento del cultivo se controló midiendo la DO con un espectrofotómetro visible Pye Unicam SP6-250.

2.2.4. CONDICIONES DE CULTIVO DE LÍNEA CELULAR A549.

Como modelo de infección se utilizó la línea celular humana (neumocitos tipo II) A549 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) [19]. Las células A549 fueron cultivadas en botellas (Falcon 3002; Becton Dickinson, San Jose, CA) en medio simple modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL, Gran Island, NY) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Cansera, Rexdale, ON, Canada) inactivado por calor, 100 unidades ml⁻¹ de penicilina, y 100 mg ml⁻¹ de streptomina (Pen/Strep) (Bio Whittaker, Walkersville, MD) en estufas a 37 °C, con 5 % de CO₂ y 100 % de humedad.

Cuando el cultivo alcanzó un 80 % de confluencia, las células fueron removidas con tripsina (0.25 % v v⁻¹)-EDTA (0.1 % p v⁻¹) (KuraboCo., Ltd., Osaka, Japón) y cultivadas en placas de 24 pocillos. El estado del cultivo se testeó por observación microscópica y recuento de células viables por exclusión mediante tinción con *Trypan blue* en pocillos elegidos al azar.

2.2.5. ENSAYO DE AGLUTINACIÓN.

La actividad aglutinante de los anticuerpos fue cuantificada según Nagel *et al.* [23] empleando *B. pertussis* cepa Tohama como antígeno. Antisero pertussis de referencia (humano, *Food and Drug Administration*, FDA) fue utilizado como referencia y un suero control fue incluido en cada ensayo.

2.2.6. ENSAYO DE ADHESIÓN.

La adhesión bacteriana a células A549 se estudió según se detalla a continuación. Se cultivaron células A549 en placas de 24 pocillos en los cuales se colocó, previo al cultivo de células, un cubreobjeto circular de vidrio de 12 mm de diámetro. Se colocaron aproximadamente 5×10^3 células por pocillo y se cultivaron durante 18 hs en medio DMEM adicionado con SFB y Pen/Strep. El medio de cultivo con antibióticos fue removido mediante lavados con medio DMEM suplementado con SFB previo a la incubación con las diferentes cepas de *B. pertussis* (proporción: 100 bacterias por célula) en presencia o ausencia de suero (10 % v v⁻¹) o anticuerpos monoclonales (30 µg ml⁻¹). Luego de adicionar el inóculo bacteriano, las placas fueron centrifugadas 5 min a $300 \times g$ para facilitar el contacto entre bacterias y células. La adhesión de bacterias a células A549 se determinó luego de 2 horas de incubación a 37 °C, 5 % CO₂. No se detectaron cambios en el número de células A549 viables luego de este procedimiento. Finalizada la incubación, los cubreobjetos con las células y bacterias adheridas fueron lavados con PBS, fijados con paraformaldehído 4 % (5 min a 4 °C), teñidos con cristal violeta (5 min) y observados en microscopio óptico (1000 ×). El número de bacterias adheridas por célula se estimó por observación microscópica de 20 campos representativos seleccionados al azar. El recuento de bacterias adheridas por célula (Rb/c) se realizó utilizando el programa SigmaScan Pro Versión 5.0. El inóculo bacteriano inicial se determinó por recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en ABGs. El control de número de células se determinó por recuento de células en Cámara de Neubauer. Con estos datos, se estimó el número inicial de bacterias por célula (R_ib/c).

2.2.7. DETERMINACIÓN DE INVASIÓN Y SOBREVIDA.

La primera etapa de este experimento se desarrolló según lo descrito para el ensayo de adhesión. Luego de 5 hs de incubación a 37 °C las células se lavaron para remover las bacterias no adheridas ni internalizadas, y se incubaron durante 2 hs con 200 µl de medio DMEM suplementado con SFB y Polimixina B (200 µg ml⁻¹) para inactivar aquellas bacterias que aún permanecieran adheridas a la superficie celular. En los tiempos utilizados en este ensayo, este antibiótico no penetra la membrana de las células eucariotas y por lo tanto solo mata las bacterias extracelulares adheridas pero no aquellas internalizadas. Luego de la incubación, la Polimixina B fue removida por lavado con PBS y se agregó DMEM/SFB/Pen/Strep a cada pocillo. Para la determinación de la invasión y/o sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* se removieron las células de los pocillos con 50 µl de una solución Tripsina/EDTA y se suspendieron en PBS. Un volumen de esta suspensión fue utilizado para el recuento de bacterias viables en placas ABGs y otro volumen fue utilizado para realizar el recuento de células viables por exclusión con *Trypan blue* en Cámara de Neubauer. Los resultados se expresaron como: número de bacterias/ número de células en el mismo volumen. La invasión se calculó como el número de bacterias viables por célula a las 8 hs del contacto inicial bacteria/célula y después del tratamiento con Polimixina B. La persistencia se evaluó como número de bacterias/número de células viables a los 2, 4, 6 y 8 días del contacto inicial bacteria/célula.

Los controles realizados en este ensayo fueron: (a) *control de viabilidad celular*: pocillos con células y sin el agregado de bacterias pero sometidos a todos los tratamientos del ensayo fueron chequeados por observación y recuento de células viables durante todo el experimento, (b) *control de muerte bacteriana por Polimixina B en tubo*: 5×10^5 bacterias suspendidas en 100 µl de medio DMEM suplementado con SFB fueron incubadas con Polimixina B (200 µg ml⁻¹) en tubos de polipropileno durante 2 hs a 37 °C. Finalizado este tiempo, las bacterias se lavaron con PBS y se sembraron en ABGs para recuento de UFC. El tratamiento con Polimixina B resultó en una disminución de 99.98 % de las UFC obtenidas, indicando que éste antibiótico mata eficientemente a las bacterias en las condiciones de trabajo, (c) *control de muerte bacteriana en pocillos sin células*: 5×10^5 bacterias suspendidas en 100 µl de medio DMEM fueron adicionadas a pocillos sin células y sometidas a todos los tratamientos del ensayo. En estos controles se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en el control de muerte bacteriana en tubo, (d) *control de inóculo bacteriano*: el inóculo bacteriano se determinó por recuento de viables en ABGs.

2.2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación de los

valores obtenidos (medias) se utilizó el test de Menor Diferencia Significativa (LSD) con un grado de significación (α) de 0.05.

2.3 RESULTADOS.

2.3.1. ADHESIÓN DE *B. PERTUSSIS* A CÉLULAS EPITELIO-ALVEOLARES.

2.3.1.1. Factores de virulencia regulados por Bvg involucrados en la adhesión a células epiteliales.

B. pertussis se adhiere a las células del epitelio respiratorio durante la colonización. Para evaluar el rol de distintos factores de virulencia regulados por el sistema Bvg en esta interacción, se realizaron ensayos de adhesión utilizando la línea celular A549 (neumocitos tipo II, epitelio alveolar humano) y cepas mutantes de *B. pertussis* defectivas en la expresión de diferentes factores de virulencia (**Tabla 1**). La adhesión de las diferentes cepas se evaluó en células cultivadas sobre portaobjetos circulares de vidrio ubicados previamente en la base de cada pocillo de una placa para cultivo celular. Para determinar el número de bacterias por célula se contó, por observación microscópica, el número de bacterias por célula en al menos 20 campos tomados al azar que contuvieran entre 4 y 10 células (**Fig. 1**).

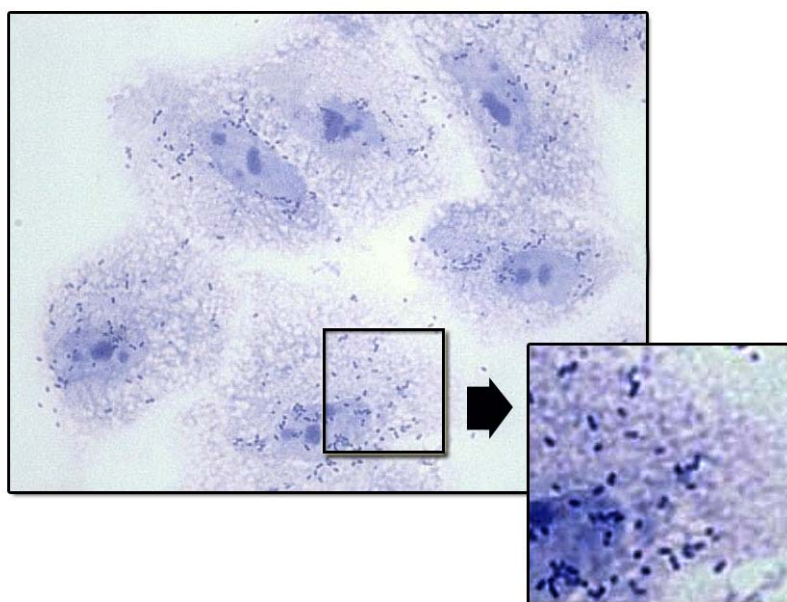


Fig. 1 Adhesión de *B. pertussis* a células epitelio-alveolares A549. Se muestra una imagen (1000 ×) representativa de bacterias adheridas a células A549. Las células y bacterias adheridas fueron teñidas con cristal violeta para su visualización.

Según se observa en la **Figura 2**, la ausencia de todos los factores de virulencia regulados por el sistema Bvg [Bvg (-)] determina una disminución significativa en la adhesión bacteriana a las células epitelio-alveolares A549. La ausencia de FHA determinó una disminución significativa en la adhesión similar a la observada en la cepa Bvg (-), lo cual indicaría que esta es la principal adhesina regulada por Bvg involucrada

en la interacción de *B. pertussis* con células epiteliales. Un resultado particularmente interesante fue el efecto de la ausencia de ACT en la adhesión bacteriana. En cepas defectivas en la expresión de ACT, un factor que no ha sido postulado con anterioridad como adhesina, se observó una disminución significativa en la adhesión aunque de menor magnitud en comparación con la cepa deficiente en la expresión de FHA. La ausencia de expresión de PT, Fim, o Prn no mostró ningún efecto sobre la adhesión.

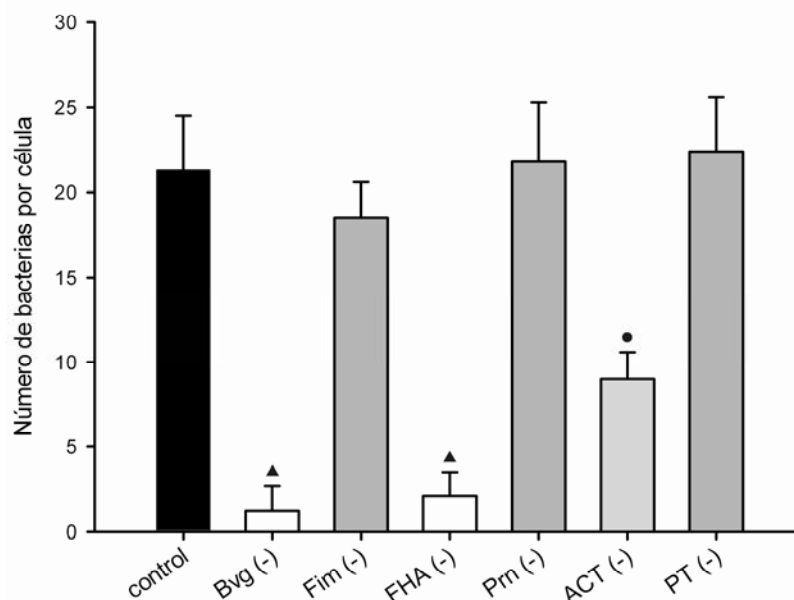


Fig. 2 Factores de virulencia involucrados en la adhesión de *B. pertussis* a células epitelio-alveolares. Células de la línea celular A549 cultivadas sobre un cubreobjeto circular fueron incubadas con bacterias (R_b /cel 100) durante 2 hs a 37 °C, 5 % CO_2 . Los cubreobjetos con las células y bacterias adheridas fueron removidos de los pocillos y lavados con PBS. Luego de fijación y tinción se realizó el recuento de bacterias adheridas por célula mediante observación microscópica (1000 x). Los resultados se analizaron mediante ANOVA ($\alpha < 0.05$). La adhesión de la cepa Bvg (-) y FHA (-) es significativamente diferente del control y de ACT (-) (\blacktriangle). A su vez, la adhesión de la cepa ACT (-) es diferente del control (\bullet).

2.3.1.2. Especificidad de los anticuerpos que bloquean la adhesión bacteriana a células epiteliales.

Para evaluar la especificidad de los anticuerpos capaces de inhibir la interacción de *B. pertussis* con las células epiteliales respiratorias se realizaron ensayos de adhesión en presencia de anticuerpos dirigidos contra los factores bacterianos previamente analizados. Se empleó un mismo inóculo de *B. pertussis* cepa salvaje para evaluar el efecto del agregado de anticuerpos de diferente especificidad con respecto al control (sin agregado de anticuerpos). Los anticuerpos se ensayaron en igual concentración final ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) con fines comparativos. Se observó una disminución significativa en la adhesión de la cepa salvaje a las células epiteliales en presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas Fim2 y Fim3 (**Fig. 3**). Este es un resultado particularmente sorprendente porque, a diferencia de la falta de expresión de FHA o ACT, la ausencia de Fim no mostró efecto alguno sobre la adhesión bacteriana (**Fig. 2**).

La presencia de anticuerpos anti-FHA también determinó una disminución significativa en la adhesión de *B. pertussis*, aunque de menor magnitud respecto a los anticuerpos dirigidos contra Fim. Por último, la presencia de anticuerpos anti-Prn, otra adhesina propuesta, o anti-ACT no modificó la adhesión bacteriana observándose valores similares a los obtenidos en ausencia de anticuerpos.

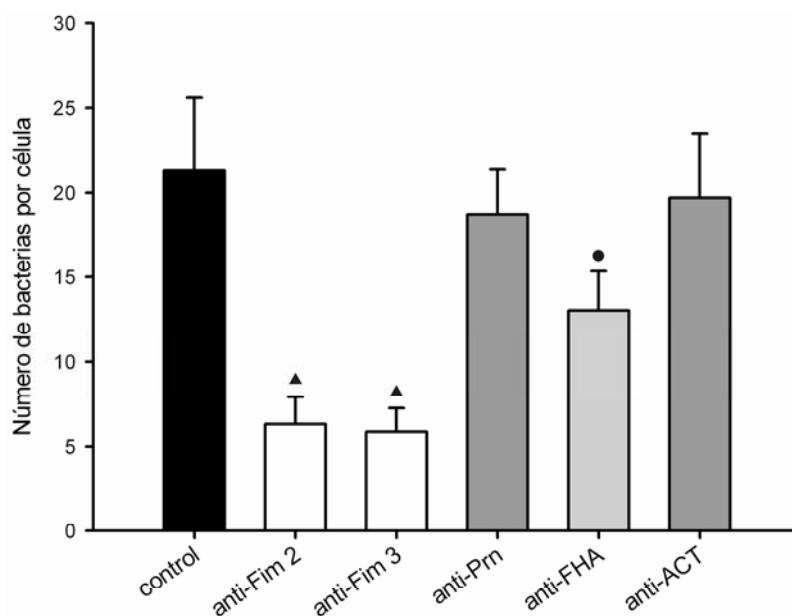


Fig. 3 Efecto de los anticuerpos monoclonales contra FHA, Prn, ACT y Fim (2 y 3) en la adhesión de *B. pertussis* a células epitelio-alveolares. Células A549 cultivadas sobre un cubreobjeto circular fueron incubadas con bacterias cepa Tohama (R_b/cel 100) en ausencia (control) y en presencia de anticuerpos monoclonales (30 µg ml⁻¹) dirigidos contra los distintos factores de virulencia en estudio durante 2 hs a 37 °C, 5 % CO₂. Los cubreobjetos con las células y bacterias adheridas fueron removidos de los pocillos y lavados con PBS. Luego de fijación y tinción se realizó el recuento de bacterias adheridas por célula mediante observación microscópica (1000 x). Los resultados se analizaron mediante ANOVA ($\alpha < 0.05$). La adhesión en presencia de anti-Fim2 y anti-Fim3 es significativamente diferente del control y de anti-FHA (▲). A su vez, la adhesión en presencia de anti-FHA es diferente del control (●).

Para confirmar estos resultados se comparó la adhesión en presencia de diferentes sueros de individuos vacunados contra *B. pertussis* con título de anticuerpos conocido contra cada uno de los factores de virulencia analizados. La presencia de suero contra *B. pertussis* disminuyó la adhesión bacteriana (**Tabla 2**). Este resultado coincide con los resultados presentados por Tuomanen *et al.* [34], en los cuales se emplearon células ciliadas traqueales humanas para evaluar la adhesión de *B. pertussis*. El análisis de regresión (n=24) sugiere que la disminución observada en nuestro estudio se debe a la presencia de anticuerpos contra la proteína Fim ($r = 0.84$, $P < 0.05$). El título de anticuerpos contra Prn, PT o FHA no mostró correlación con la disminución de adhesión bacteriana ($r = 0.125$, $P < 0.05$; $r = -0.058$, $P < 0.05$ y $r = -0.30$, $P < 0.05$, respectivamente). Para confirmar la correlación entre la presencia de anticuerpos anti-Fim y la disminución de adhesión bacteriana, dos sueros con diferente título de anticuerpos anti-Fim fueron sometidos a depleción de anticuerpos anti-Fim o anti-Prn (este último utilizado como control). Como se observó con anterioridad [14], el título de

anticuerpos contra los antígenos de *B. pertussis* (FHA, PT y Prn o Fim, respectivamente) no se ve afectado por este procedimiento según se determinó por ELISA (dato no mostrado). La depleción de anticuerpos contra Fim revirtió casi completamente la inhibición de la adhesión observada en presencia de anticuerpos anti-*B. pertussis*, mientras que la depleción de anticuerpos anti-Prn no mostró ningún efecto (**Fig. 4**).

Tabla 2. Especificidad de anticuerpos de sueros de individuos vacunados contra *B. pertussis*, su efecto en la adhesión bacteriana.

Suero	Factores de Virulencia ^{#, §}				Adhesión ^{¥, ‡} (bacterias por célula)
	PT	FHA	Prn	Fim	
1	16	607	828	96	10.9
2	68	222	349	64	8.8
3	170	1332	599	175	13.1
4	1065	2232	454	457	5.4
5	148	981	305	76	11.6
6	30	199	33	12	17.6
7	1411	430	156	212	6.7
8	24	48	518	45	14.1
9	81	66	26	43	17
10	109	2148	156	136	8.2
11	83	138	120	69	14
12	69	1293	154	23	17.7
13	342	279	339	157	14.7
14	8	107	78	57	16.3
15	496	109	517	158	8.8
16	98	232	56	94	10.1
17	1	45	56	1478	0.4
18	6	33	114	152	7.7
19	52	100	104	344	4.5
20	6	31	7	174	5.3
21	105	79	44	416	3.8
22	25	28	32	149	8.8
23	36	24	25	855	3.9
24	3	109	333	281	3.7

[#] El título de anticuerpos se expresó en unidades de ELISA ml⁻¹ calculado en relación al suero pertussis de referencia.

[§] Suero pre-inmune no mostró título detectable de anticuerpos contra *B. pertussis*.

[¥] Valor promedio de 3 experimentos independientes.

[‡] No se detectaron diferencias significativas en la adhesión bacteriana en presencia o ausencia de suero pre-inmune.

FHA ha sido previamente descrita como una de las principales adhesinas de *B. pertussis*. Los resultados obtenidos con nuestro modelo de estudio confirman esta observación. Sin embargo, los anticuerpos contra FHA resultaron menos efectivos en reducir la adhesión a las células A549 que los anticuerpos contra Fim (**Fig. 3**). En conjunto, estos resultados sugieren que los anticuerpos anti-Fim interfieren con la adhesión bacteriana por un mecanismo diferente al bloqueo específico de epitopes adhesivos de la proteína Fim. En concordancia con esta hipótesis, ensayos de adhesión empleando cepas deficientes en la expresión de FHA o Fim y en presencia o ausencia de suero inmune demostraron que, aunque el mutante deficiente en la expresión de Fim

adhiera igual que la cepa salvaje, la adhesión de éste mutante no es inhibida por la presencia de suero inmune contra *B. pertussis* el cual disminuye significativamente la adhesión de la cepa salvaje (Fig. 5). Más aún, la adhesión de la cepa deficiente en FHA también disminuyó en presencia de suero inmune.

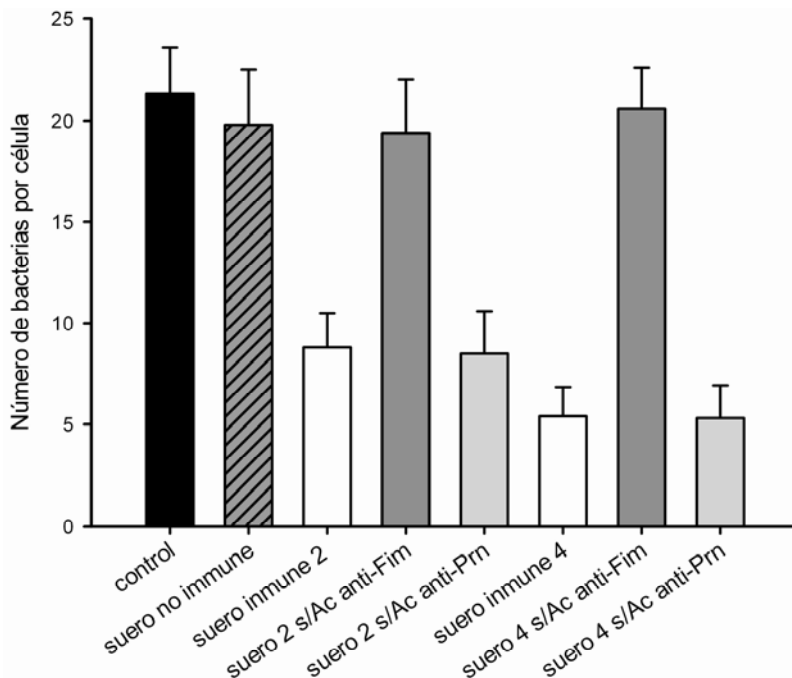


Fig. 4 Efecto de la presencia de suero inmune depletado de anticuerpos anti-Fim en la adhesión de *B. pertussis* a células epitelio-alveolares. Células A549 cultivadas sobre un cubreobjeto circular fueron incubadas con bacterias cepa Tohama (R,b/cel 100) en ausencia (control) o en presencia de suero no inmune, suero inmune o suero depletado de anticuerpos de diferente especificidad durante 2 hs a 37 °C, 5% de CO₂. Los cubreobjetos con las células y bacterias adheridas fueron removidos de los pocillos y lavados con PBS. Luego de fijación y tinción se realizó el recuento de bacterias adheridas por célula mediante observación microscópica (1000 x). Los resultados se analizaron mediante ANOVA ($\alpha < 0.05$).

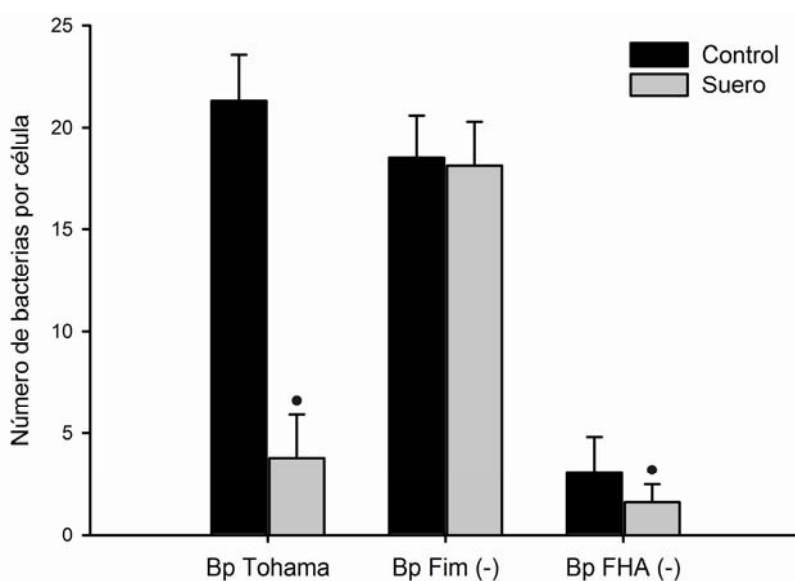


Fig. 5 Efecto de suero inmune contra *B. pertussis* en la adhesión a células epitelio-alveolares. Células A549 cultivadas sobre un cubreobjeto circular fueron incubadas con bacterias cepa Tohama (Bp cepa salvaje), cepa Bp 175 (Bp Fim-) o Bp GR4 (Bp FHA-) (R,b/cel 100) en ausencia (control) o en presencia de suero inmune durante 2 hs a 37

°C, 5 % de CO₂. Los cubreobjetos con las células y bacterias adheridas fueron removidos de los pocillos y lavados con PBS. Luego de fijación y tinción se realizó el recuento de bacterias adheridas por célula mediante observación microscópica (1000 x). Los resultados se analizaron mediante ANOVA [$\alpha < 0.05$ (●)].

Los anticuerpos anti-Fim han sido previamente descriptos como aglutininas [18]. La aglutinación bacteriana favorece la eliminación de las bacterias *in vivo*. La evaluación microscópica de *B. pertussis* incubada con suero inmune (con alto título de anticuerpos anti-Fim) o con suero policlonal de conejo anti-Fim demostró la capacidad de los anticuerpos anti-Fim de aglutinar bacterias (**Fig. 6**). La depleción de anticuerpos anti-Fim del suero inmune determinó la pérdida de actividad aglutinante y un incremento en el número de bacterias adheridas por célula a un nivel similar al observado en ausencia de suero (**Fig. 6**), confirmando un rol central de los anticuerpos anti-Fim en la inhibición de la adhesión de *B. pertussis* a células del epitelio respiratorio.

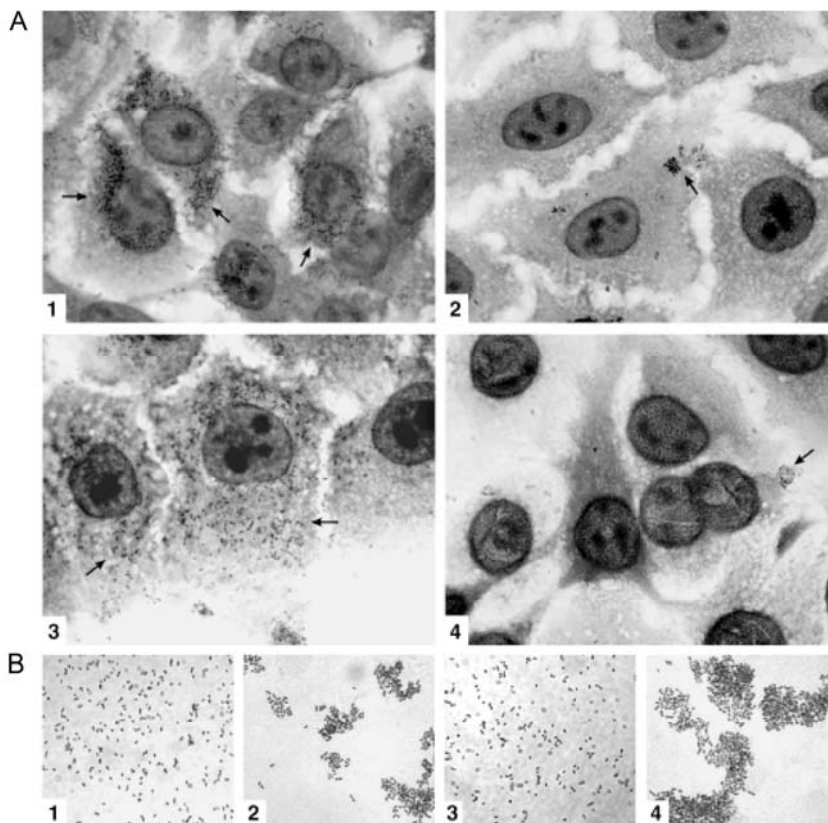


Fig. 6 Anticuerpos anti-Fim, efecto de la actividad aglutinante en la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales. (A) Bacterias se incubaron durante 2 hs a 37 °C con células A549 en ausencia (1), o presencia de suero inmune (2), suero inmune depletado de anticuerpos anti-Fim (3), o anticuerpos anti-Fim de conejo (4). Las bacterias pueden observarse en asociación con las células A459 (flechas). (B) Actividad aglutinante de anticuerpos anti-Fim. Las bacterias se incubaron durante 30 min a 37 °C con medio DMEM suplementado con 10 % de SFB (1), suero inmune (2), suero inmune depletado de anticuerpos anti-Fim (3), o suero policlonal anti-Fim de conejo (4).

2.3.2. INVASIÓN Y PERSISTENCIA DE *B. PERTUSSIS* EN CÉLULAS EPITELIO-ALVEOLARES.

Con el fin de determinar si la invasión a células epiteliales A549 depende alguno de los factores de virulencia regulados por el sistema Bvg, se determinó la capacidad de invasión de diferentes cepas mutantes de *B. pertussis*. Datos previos indican que *B. pertussis* comienza a invadir la célula eucariota aproximadamente 2 horas después del contacto inicial. En este ensayo, se mantuvo el contacto entre células y bacterias durante

5 hs luego de lo cual las bacterias no adheridas se removieron por lavado. Finalmente, se inactivaron las bacterias aún adheridas a la superficie celular (y no internalizadas) por incubación con Polimixina B durante 2 horas. De esta forma, por recuento de células y bacterias viables transcurridas 8 hs del contacto inicial bacteria/célula, fue posible determinar la tasa de invasión celular, es decir la relación bacterias intracelulares por célula.

Dado que existen diferencias en la capacidad de adhesión entre las cepas mutantes evaluadas (sección 2.3.1.1), para poder determinar el rol de cada factor de virulencia en la invasión celular se normalizó el ensayo. Para ello la capacidad de invasión de cada cepa (bacterias intracelulares por célula epitelial) se expresó como porcentaje del nivel de adhesión (bacterias adheridas por célula) de la respectiva cepa (**Tabla 3**). No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de invasión de las diferentes cepas evaluadas, sugiriendo que ninguno de los factores estudiados posee un rol significativo en la invasión de *B. pertussis* a células epiteliales alveolares.

Tabla 3. Invasión de diferentes cepas de *B. pertussis* a células epiteliales respiratorias A549. La primera etapa del ensayo de invasión y sobrevida se llevó a cabo como el ensayo de adhesión. Luego de 5 hs de incubación a 37 °C las células se lavaron para remover las bacterias no adheridas. Las bacterias aún adheridas a la superficie celular se inactivaron por incubación (2 hs, 37 °C) con Polimixina B (200 µg ml⁻¹). La invasión se determinó por recuento de bacterias viables por célula eucariota después de incubación con Polimixina B.

	Adhesión (N° b/c) §	Invasión (%) ‡
Bp Tohama	21.3 ± 8.3	3.38
Bp Bvg (-)	1.2 ± 3.5	6.67
Bp Fim (-)	18.5 ± 6.1	4.32
Bp PT (-)	23.4 ± 9.2	5.89
Bp Prn (-)	21.8 ± 7.5	4.59
Bp FHA (-)	2.1 ± 2.4	5.71
Bp ACT (-)	9 ± 0.4	3.63

§ Número de bacterias por célula.

‡ Valor calculado como porcentaje del correspondiente valor de adhesión.

Para analizar la sobrevida intracelular de cada cepa de *B. pertussis* se determinó el número de bacterias viables intracelulares a diferentes días desde el contacto inicial bacteria/célula. En la **Figura 7** se muestran los resultados expresados como porcentaje de disminución en el número de bacterias recuperadas respecto del correspondiente valor inicial de invasión. La cepa salvaje de *B. pertussis* persiste hasta el día 4 en células A549, durante este lapso conserva su virulencia. La ausencia de todos los factores de virulencia regulados por el sistema Bvg disminuye significativamente la sobrevida de *B. pertussis* dentro de la células, según se observa en la cinética de sobrevida intracelular

de la cepa avirulenta [Bvg (-)]. Sin embargo, la ausencia de Prn, FHA o Fim no modificó la sobrevivencia de *B. pertussis*. La ausencia de ACT tampoco mostró ningún efecto en la sobrevivencia de la bacteria a largo plazo. Sin embargo, la falta de esta toxina parece favorecer la sobrevivencia de la bacteria durante los primeros días post invasión inicial. Transcurridos 2 días luego de la invasión inicial, la tasa de sobrevivencia para el mutante defectivo en la expresión de ACT es cercana al 100 %, mientras que solo alcanza el 20 % en el resto de las cepas evaluadas. La tasa de sobrevivencia de este mutante a los 4 días post invasión inicial descendió a niveles similares observados en la cepa salvaje. Por otra parte, en ausencia de PT se observó una sobrevivencia bacteriana significativamente mayor a largo plazo. Se recuperaron bacterias viables defectivas en la expresión de PT transcurridos 8 días desde la invasión inicial (número de días que duró el ensayo). Durante los ensayos realizados no se detectó cambio de fase en las bacterias intracelulares recuperadas. Sin embargo, esto puede deberse a las condiciones de recuperación de las bacterias intracelulares; el cultivo en placas de ABGs a 37 °C favorece el fenotipo virulento.

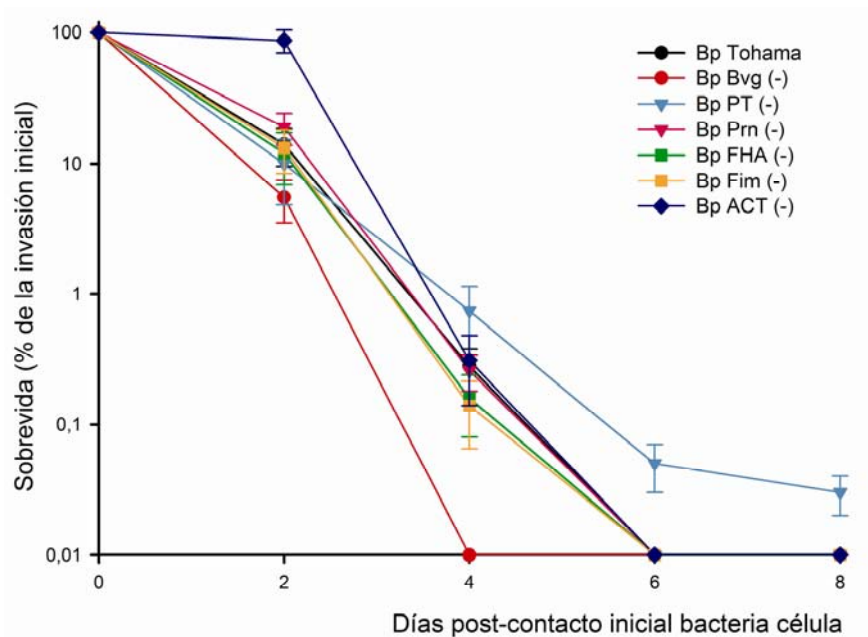


Fig. 7 Persistencia de diferentes cepas de *B. pertussis* en células epiteliales respiratorias. Luego de 5 hs de incubación a 37 °C las células se lavaron para remover las bacterias no adheridas. Las bacterias aún adheridas a la superficie celular se inactivaron por incubación (2 hs, 37 °C) con Polimixina B (200 µg ml⁻¹). La invasión se determinó por recuento de bacterias viables por célula eucariota después de incubación con Polimixina B y se fijó arbitrariamente como 100 % para cada mutante. La sobrevivencia bacteriana en localización intracelular se determinó por recuento de bacterias viables por célula a diferentes días post-contacto inicial bacteria/célula y se expresó como porcentaje del valor de invasión de cada cepa.

2.4 DISCUSIÓN.

La adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales del tracto respiratorio del hospedador es el punto de partida de la colonización, por lo que determinar que factores participan en esta interacción es relevante para identificar los mecanismos que deben ser bloqueados a este nivel. Uno de los principales problemas en el estudio de la patogénesis de *B. pertussis* es la falta de un modelo de infección animal. *B. pertussis* es un patógeno estrictamente humano por lo cual los resultados obtenidos con modelos animales son muy cuestionados. Los ensayos *in vitro* que emplean células de origen humano (ya sean de línea celular o no) son una alternativa para estudiar los mecanismos de infección de este patógeno.

En este trabajo se utilizó la línea celular de epitelio alveolar humano (pneumocitos tipo II) para estudiar los componentes bacterianos involucrados en la interacción bacteria-célula respiratoria, dado que es uno de los subtipos celulares con el que este patógeno interacciona y un modelo aceptado para evaluar la interacción de *B. pertussis* con células epiteliales respiratorias humanas [1, 6, 16, 29]. Se usaron dos estrategias para evaluar los factores bacterianos involucrados en la adhesión de *B. pertussis*: la ausencia del componente en estudio a través del uso de cepas mutantes de *B. pertussis* y el bloqueo del factor de virulencia a evaluar a través del uso de anticuerpos específicos dirigidos contra el mismo. El uso de mutantes permite analizar un factor en particular, evaluando su función de manera indirecta a través de la ausencia del mismo y en presencia del resto de los factores de virulencia. El uso de anticuerpos monoclonales permite evaluar en que grado la presencia de dichos anticuerpos específicos en el sitio de infección bloquea la adhesión del microorganismo.

Varios factores de virulencia de *B. pertussis* han sido sugeridos como potenciales adhesinas, tal es el caso de FHA, Prn, Fim (2 y 3) y PT. Sin embargo, los resultados de este estudio indican que solo la ausencia de FHA disminuye significativamente la adhesión a niveles comparables a los observados en cepas que no expresan ninguno de estos factores de virulencia (Bvg^-), sugiriendo un rol central de este antígeno en la colonización. Un resultado particularmente sorprendente es la disminución de la adhesión bacteriana observada en ausencia de ACT. Estudios recientes demostraron una asociación física entre FHA y ACT en la membrana externa de *B. pertussis* [41]. Es posible que ACT se comporte como adhesina o que su ausencia afecte la distribución de factores localizados en la membrana externa de *B. pertussis* involucrados directa o indirectamente en la adhesión bacteriana. Este fenómeno se estudia en el siguiente capítulo.

Recientemente se ha demostrado que anticuerpos específicos contra *B. pertussis* juegan un rol crucial en la inducción de las funciones efectoras bactericidas celulares y de neutralización de toxinas tanto *in vitro* como *in vivo* [13, 14, 27]. Sin embargo, el rol de

los anticuerpos, así como su especificidad, en la prevención de la adhesión a células respiratorias aún no ha sido esclarecido. Los ensayos realizados en este estudio demostraron que la presencia de anticuerpos específicos contra Fim 2, Fim 3 o FHA (este último en menor medida) afecta significativamente la adhesión a las células epiteliales. Ensayos de adhesión en presencia de sueros con anticuerpos de diferente especificidad confirmaron que la disminución de adhesión bacteriana se correlaciona con el título de anticuerpos anti-Fim. Sin embargo, solo la ausencia de expresión de FHA determinó una disminución significativa en la adhesión a células A549. Esto concuerda con varios estudios realizados con células A549 u otras líneas celulares los cuales indican a FHA como la principal adhesina de *B. pertussis* [1, 6, 25, 35]. En conjunto, los resultados obtenidos en este estudio indican que Fim no es una proteína crítica para la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales, pero constituye un blanco para la inhibición de la interacción bacteria-célula epitelial mediada por anticuerpos. En apoyo de esta hipótesis la presencia de suero inmune, capaz de bloquear la adhesión de la cepa salvaje en fase virulenta, no modificó la adhesión de la cepa virulenta pero deficiente en la expresión de Fim. La actividad aglutinante de los anticuerpos anti-Fim parece ser responsable de este efecto. Sueros inmunes depletados de anticuerpos contra Fim perdieron su capacidad aglutinante mientras que sueros capaces de aglutinar *B. pertussis* cepa salvaje (fase virulenta) no aglutinan la cepa deficiente en la expresión de Fim. La observación microscópica confirma que solo bajo condiciones de aglutinación ocurre una disminución significativa en el número de bacterias adheridas por célula. Más aún, estudios realizados empleando concentraciones no aglutinantes de anticuerpos anti-Fim, mostraron un efecto moderado de estos anticuerpos en la adhesión bacteriana [36]. Así, la capacidad de los anticuerpos contra Fim de reducir la adhesión bacteriana se relaciona principalmente con la inducción de aglutinación bacteriana. La aglutinación promueve la eliminación mecánica de las bacterias *in vivo* a través del movimiento ciliar y la tos. En resumen, estos resultados sugieren que los anticuerpos anti-Fim afectan la interacción de *B. pertussis* con las células epiteliales respiratorias, indicando un rol importante en la protección contra este patógeno. Los resultados de este estudio explican datos clínicos que demuestran que la incorporación de Fim en las vacunas acelulares aumenta significativamente la protección brindada por dichas vacunas y ponen en evidencia la importancia de la multivalencia en la formulación de vacunas. Tales vacunas no solo deben ser capaces de inducir un alto título de anticuerpos protectores contra la acción tóxica de este patógeno, sino también promover mecanismos de defensa del hospedador diferentes y a la vez sinérgicos.

B. pertussis ha sido considerada un patógeno exclusivamente extracelular, sin embargo existen numerosos estudios que demuestran que puede invadir y sobrevivir en monocitos, macrófagos y diferentes tipos de células epiteliales [3, 8, 10, 17, 31, 33]. Estudios *in vivo* [12, 40] han mostrado resultados similares por lo cual se ha postulado

que la invasión podría constituir un mecanismo de inmunoevasión y persistencia de *B. pertussis* en el hospedador. A pesar de su potencial importancia, el mecanismo por el cual *B. pertussis* invade células eucariotas así como los factores de que depende este proceso no han sido esclarecidos. La invasión bacteriana de células no fagocíticas es un proceso multifactorial con la participación conjunta de factores bacterianos y de los componentes de superficie de las células del hospedador [9, 15]. Los resultados de este trabajo parecen indicar que la entrada de *B. pertussis* en células alveolares humanas es independiente de la fase de virulencia de la bacteria y no depende de ningún factor regulado por el sistema Bvg y que esta invasión, al menos en nuestras condiciones de estudio, es un proceso básicamente dependiente de la célula eucariota. Estos resultados sugieren que la inhibición de la adhesión por anticuerpos capaces de bloquear la interacción bacteria-célula no solo determina una disminución de la colonización sino también una disminución de la entrada de *B. pertussis* al espacio intracelular y por lo tanto en su eventual persistencia en el hospedador.

A diferencia de lo observado en los ensayos de invasión, los resultados obtenidos en los ensayos de sobrevivencia intracelular parecen indicar que la regulación de la expresión de los factores de virulencia podría ser relevante en la sobrevivencia de *B. pertussis* en el interior de la célula eucariota. En particular, la expresión de PT resultaría perjudicial para la sobrevivencia de *B. pertussis* dentro de la célula epitelial. Dada la toxicidad de PT para las células eucariotas es posible que la permanencia de la bacteria dentro de la célula determine una disminución de la sobrevivencia de *B. pertussis* como efecto secundario. Este resultado explicaría en parte la mayor sobrevivencia intracelular de *B. Bronchiseptica* (que expresa los mismos factores de virulencia que *B. pertussis* excepto PT) respecto a *B. pertussis*. La existencia de una única monocapa de células eucariotas en los sistemas *in vitro* limita los alcances de esta observación.

La expresión de ACT parece estar involucrada en la marcada disminución de la viabilidad de *B. pertussis* observada a tiempos cortos post-invasión inicial. Aproximadamente el 80% de las bacterias que ingresan a la célula pierden viabilidad en los primeros dos días excepto aquellas defectivas en la expresión de ACT. Bassinet *et al.* [3] publicaron resultados similares utilizando el mismo mutante de *B. pertussis* y células epiteliales traqueales humanas (HTE). Estos autores sugieren que el aumento de AMPc intracelular es el responsable del efecto observado debido al daño que provoca en células eucariotas. En los ensayos realizados en este estudio, sin embargo, no se observaron cambios significativos en la viabilidad de las células que puedan explicar el fenómeno observado con el mutante deficiente en ACT. A pesar de los cambios significativos en el contenido de AMPc observado en una amplia variedad de tipos celulares, la toxicidad irreversible se relaciona con la expresión del receptor CD11b/CD18 (CR3) presente en células de origen linfocitario tales como neutrófilos y macrófagos [11]. Esta especificidad restringida coincide con los efectos de ACT

observados en las fases tempranas de la infección sobre macrófagos y neutrófilos. La mayor sobrevida observada en los mutantes defectivos en ACT y PT luego de la invasión tendría relevancia en el contexto del modelo de colonización propuesto por Vergara-Irigaray *et al.* [37]. Según este modelo, *B. pertussis* ingresaría al hospedador en fase avirulenta o intermedia las cuales se caracterizan por la ausencia de expresión de toxinas, entre ellas ACT y PT. Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos de sobrevida intracelular con los mutantes defectivos en la expresión de estas toxinas, es posible suponer que la invasión de células epiteliales en dichas fases favorezca la persistencia intracelular de *B. pertussis*. Los resultados publicados por Masure *et al.* [21] parecen apoyar esta posibilidad. Estos autores encontraron que *B. pertussis* modula la expresión de ACT disminuyendo drásticamente su producción durante la invasión de macrófagos humanos. Este estadio intracelular de *B. pertussis*, aunque probablemente transitorio, podría favorecer la evasión de la respuesta inmune del hospedador.

A diferencia de lo observado con ACT y PT, la expresión de otro/s factores regulados por el sistema Bvg es necesaria para la sobrevida bacteriana ya que bacterias en fase avirulenta mostraron una persistencia intracelular marcadamente disminuida. Entre los factores evaluados en este ensayo, sin embargo, no se identifica un factor en particular del cual dependa la sobrevida bacteriana solo es posible afirmar que Prn, Fim y FHA no tienen un rol relevante en dicha sobrevida. De acuerdo con los resultados obtenidos por Bassinet *et al.* [3], los resultados presentados en este capítulo indican que *B. pertussis* invade pero no se multiplica en células epiteliales. Sin embargo, no es posible saber si este resultado está limitado por nuestro sistema de estudio. De todas formas, *B. pertussis* podría utilizar la invasión a células epiteliales como un mecanismo de evasión del sistema inmune del hospedador o alternativamente como una vía para alcanzar otros tipos celulares.

2.5 CONCLUSIONES.

En este capítulo se empleó un modelo de colonización *in vitro* para estudiar el rol de ciertos factores de virulencia de *B. pertussis* en la adhesión, invasión, y sobrevivencia intracelular en células epitelio alveolares humanas. Mediante el empleo de cepas mutantes se pudo observar que la adhesión de *B. pertussis* es máxima en fase virulenta identificándose a FHA como la principal adhesina. La falta de expresión de la toxina ACT determina una disminución en el nivel de adhesión aunque de menor magnitud que la observada en ausencia de FHA o en fase avirulenta. La menor adhesión observada podría tratarse de un efecto secundario a la falta de expresión de ACT, dado que esta toxina se localiza en membrana externa asociada a FHA.

La presencia de anticuerpos dirigidos contra ciertos componentes bacterianos durante la interacción inicial bacteria-célula del hospedador modifica la capacidad de adhesión de *B. pertussis*. En particular, Fim 2, Fim 3 y en menor medida FHA, inducen anticuerpos que interfieren en la adhesión de *B. pertussis* a células del hospedador. La disminución de adhesión observada en presencia de anticuerpos contra Fim se relaciona principalmente con la capacidad de estos anticuerpos de inducir la aglutinación bacteriana. FHA y Fim, son dos antígenos de reconocida importancia y componentes de casi todas las formulaciones vacunales acelulares actuales, pero están presentes en bacterias en fase virulenta. Si este patógeno se transmite en fase avirulenta, como se postula, anticuerpos inducidos contra estas proteínas no bloquearían la adhesión.

La invasión de *B. pertussis* a células epitelio-alveolares humanas no mostró dependencia de ningún factor de virulencia en particular como así tampoco del estado de virulencia de la bacteria sugiriendo que es un proceso básicamente dependiente de la célula eucariota. Esto significa que anticuerpos capaces de bloquear la adhesión bacteriana impedirán la invasión y, eventualmente, la inmunevasión de este patógeno. Por el contrario, la sobrevivencia de *B. pertussis* dentro de la célula eucariota mostró ser dependiente del estado de virulencia de la bacteria. En fase avirulenta, *B. pertussis* tiene una sobrevivencia intracelular significativamente disminuida. Algunos factores de virulencia, en particular las toxinas, parecen tener cierto rol en la cinética de sobrevivencia intracelular de *B. pertussis*; la expresión de PT disminuye la sobrevivencia de *B. pertussis* dentro de células A549, mientras que la expresión de ACT está involucrada en una marcada disminución de la viabilidad de *B. pertussis* observada a tiempos cortos post-invasión, lo que indica que la modulación de la expresión de estas toxinas posibilitaría eventualmente la sobrevivencia intracelular. La falta de expresión de toxinas como ACT y PT, por ejemplo en el fenotipo intermedio, aunque determinaría una menor adhesión a células epiteliales por ausencia de ACT, incrementaría significativamente la sobrevivencia intracelular. Por último, los resultados presentados en este capítulo indican que existen

factores regulados por el sistema Bvg que son necesarios para la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis*, aunque dichos factores no ha podido ser identificados.

2.6 REFERENCIAS.

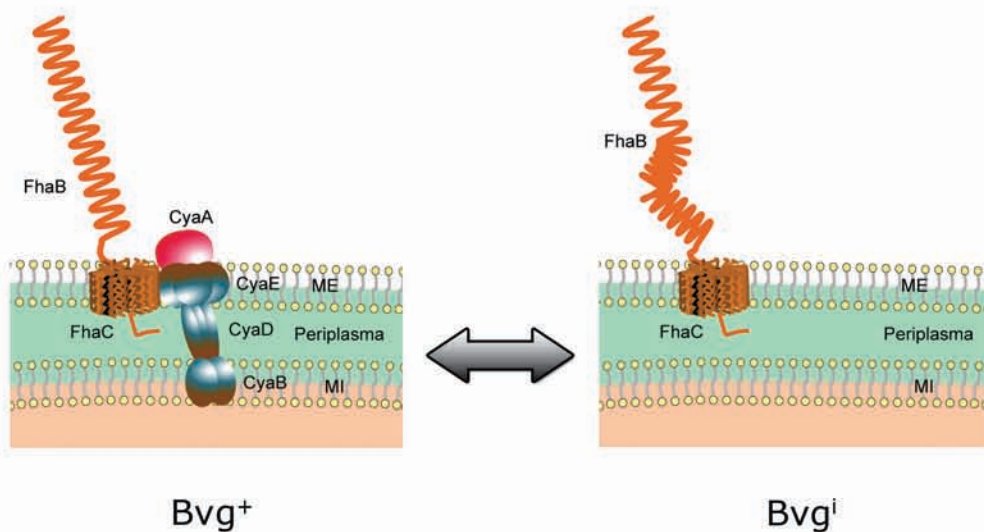
- [1] Alonso S., Pethe K., Mielcarek N., Raze D., Loch C. Role of ADP-ribosyltransferase activity of pertussis toxin in toxin-adhesin redundancy with filamentous hemagglutinin during Bordetella pertussis infection. *Infect Immun.* 2001. 69 (10): 6038-43.
- [2] Antoine R., Loch C. Roles of the disulfide bond and the carboxy-terminal region of the S1 subunit in the assembly and biosynthesis of pertussis toxin. *Infect Immun.* 1990. 58 (6): 1518-26.
- [3] Bassinet L., Gueirard P., Maitre B., Housset B., Gounon P., Guiso N. Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by Bordetella pertussis. *Infect Immun.* 2000. 68 (4): 1934-41.
- [4] Berbers G.A., Lafeber A.B., Labadie B., Vermeer-de Bondt P.E., Bolscher D.J.A., Plantinga A.D. A randomized controlled study with whole-cell or acellular pertussis vaccines in combination with regular DT-IPV vaccine and a new poliomyelitis (IPV-Vero) component in children 4 years of age in the Netherlands: National Institute of Public Health and the Environment, The Netherlands; 1999. Report No.: 105000001.
- [5] Cotter P.A., Jones A.M. Phosphorelay control of virulence gene expression in Bordetella. *Trends Microbiol.* 2003. 11 (8): 367-73.
- [6] Coutte L., Alonso S., Reveneau N., Willery E., Quatannens B., Loch C., et al. Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen. *J Exp Med.* 2003. 197 (6): 735-42.
- [7] Cherry J.D., Gornbein J., Heininger U., Stehr K. A search for serologic correlates of immunity to Bordetella pertussis cough illnesses. *Vaccine.* 1998. 16 (20): 1901-6.
- [8] Ewanowich C.A., Melton A.R., Weiss A.A., Sherburne R.K., Peppler M.S. Invasion of HeLa 229 cells by virulent Bordetella pertussis. *Infect Immun.* 1989. 57 (9): 2698-704.
- [9] Falkow S. Bacterial entry into eukaryotic cells. *Cell.* 1991. 65 (7): 1099-102.
- [10] Friedman R.L., Nordensson K., Wilson L., Akporiaye E.T., Yocum D.E. Uptake and intracellular survival of Bordetella pertussis in human macrophages. *Infect Immun.* 1992. 60 (11): 4578-85.
- [11] Guermonprez P., Khelef N., Blouin E., Rieu P., Ricciardi-Castagnoli P., Guiso N., et al. The adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med.* 2001. 193 (9): 1035-44.
- [12] Hellwig S.M., Hazenbos W.L., van de Winkel J.G., Mooi F.R. Evidence for an intracellular niche for Bordetella pertussis in broncho-alveolar lavage cells of mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999. 26 (3-4): 203-7.
- [13] Hellwig S.M., van Spruiel A.B., Schellekens J.F., Mooi F.R., van de Winkel J.G. Immunoglobulin A-mediated protection against Bordetella pertussis infection. *Infect Immun.* 2001. 69 (8): 4846-50.
- [14] Hellwig S.M., Rodriguez M.E., Berbers G.A., van de Winkel J.G., Mooi F.R. Crucial role of antibodies to pertactin in Bordetella pertussis immunity. *J Infect Dis.* 2003. 188 (5): 738-42.
- [15] Isberg R.R., Hamburger Z., Dersch P. Signaling and invasin-promoted uptake via integrin receptors. *Microbes Infect.* 2000. 2 (7): 793-801.
- [16] Ishibashi Y., Relman D.A., Nishikawa A. Invasion of human respiratory epithelial cells by Bordetella pertussis: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and alpha5beta1 integrin. *Microb Pathog.* 2001. 30 (5): 279-88.

- [17] Lee C.K., Roberts A.L., Finn T.M., Knapp S., Mekalanos J.J. A new assay for invasion of HeLa 229 cells by *Bordetella pertussis*: effects of inhibitors, phenotypic modulation, and genetic alterations. *Infect Immun.* 1990. 58 (8): 2516-22.
- [18] Li Z.M., Brennan M.J., David J.L., Carter P.H., Cowell J.L., Manclark C.R. Comparison of type 2 and type 6 fimbriae of *Bordetella pertussis* by using agglutinating monoclonal antibodies. *Infect Immun.* 1988. 56 (12): 3184-8.
- [19] Lieber M., Smith B., Szakal A., Nelson-Rees W., Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer.* 1976. 17 (1): 62-70.
- [20] Locht C., Geoffroy M.C., Renauld G. Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the papC and papD gene families. *EMBO J.* 1992. 11 (9): 3175-83.
- [21] Masure H.R. Modulation of adenylate cyclase toxin production as *Bordetella pertussis* enters human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992. 89 (14): 6521-5.
- [22] Meade B.D., Deforest A., Edwards K.M., Romani T.A., Lynn F., O'Brien C.H., et al. Description and evaluation of serologic assays used in a multicenter trial of acellular pertussis vaccines. *Pediatrics.* 1995. 96 (3 Pt 2): 570-5.
- [23] Nagel J., de Graaf S., Schijf-Evers D. Improved serodiagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis* by determination of IgG anti-LPF antibody levels. *Dev Biol Stand.* 1985. 61: 325-30.
- [24] Poolman J.T., Kuipers B., Vogel M.L., Hamstra H.J., Nagel J. Description of a hybridoma bank towards *Bordetella pertussis* toxin and surface antigens. *Microb Pathog.* 1990. 8 (6): 377-82.
- [25] Relman D.A., Domenighini M., Tuomanen E., Rappuoli R., Falkow S. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989. 86 (8): 2637-41.
- [26] Roberts M., Fairweather N.F., Leininger E., Pickard D., Hewlett E.L., Robinson A., et al. Construction and characterization of *Bordetella pertussis* mutants lacking the vir-regulated P.69 outer membrane protein. *Mol Microbiol.* 1991. 5 (6): 1393-404.
- [27] Rodriguez M.E., Hellwig S.M., Hozbor D.F., Leusen J., van der Pol W.L., van de Winkel J.G. Fc receptor-mediated immunity against *Bordetella pertussis*. *J Immunol.* 2001. 167 (11): 6545-51.
- [28] Sato Y., Arai H. Leucocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis*. I. Purification and characterization. *Infect Immun.* 1972. 6 (6): 899-904.
- [29] Schipper H., Krohne G.F., Gross R. Epithelial cell invasion and survival of *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* 1994. 62 (7): 3008-11.
- [30] Stainer D.W., Scholte M.J. A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol.* 1970. 63 (2): 211-20.
- [31] Steed L.L., Setareh M., Friedman R.L. Intracellular survival of virulent *Bordetella pertussis* in human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol.* 1991. 50 (4): 321-30.
- [32] Storsaeter J., Hallander H.O., Gustafsson L., Olin P. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine.* 1998. 16 (20): 1907-16.
- [33] Torre D., Ferrario G., Bonetta G., Perversi L., Tambini R., Speranza F. Effects of recombinant human gamma interferon on intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human phagocytic cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1994. 9 (3): 183-8.

- [34] Tuomanen E.I., Zapiain L.A., Galvan P., Hewlett E.L. Characterization of antibody inhibiting adherence of *Bordetella pertussis* to human respiratory epithelial cells. *J Clin Microbiol.* 1984. 20 (2): 167-70.
- [35] van den Akker W.M. The filamentous hemagglutinin of *Bordetella parapertussis* is the major adhesin in the phase-dependent interaction with NCI-H292 human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998. 252 (1): 128-33.
- [36] van den Berg B.M., Beekhuizen H., Mooi F.R., van Furth R. Role of antibodies against *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to human bronchial epithelial cells. *Infect Immun.* 1999. 67 (3): 1050-5.
- [37] Vergara-Irigaray N., Chavarri-Martinez A., Rodriguez-Cuesta J., Miller J.F., Cotter P.A., Martinez d.T. Evaluation of the role of the Bvg intermediate phase in *Bordetella pertussis* during experimental respiratory infection. *Infect Immun.* 2005. 73 (2): 748-60.
- [38] Weiss A.A., Hewlett E.L., Myers G.A., Falkow S. Tn5-induced mutations affecting virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1983. 42 (1): 33-41.
- [39] Willems R.J., Geuijen C., van der Heide H.G., Matheson M., Robinson A., Versluis L.F., et al. Isolation of a putative fimbrial adhesin from *Bordetella pertussis* and the identification of its gene. *Mol Microbiol.* 1993. 9 (3): 623-34.
- [40] Woods D.E., Franklin R., Cryz S.J., Jr., Ganss M., Peppler M., Ewanowich C. Development of a rat model for respiratory infection with *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1989. 57 (4): 1018-24.
- [41] Zaretzky F.R., Gray M.C., Hewlett E.L. Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of *Bordetella pertussis*: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction. *Mol Microbiol.* 2002. 45 (6): 1589-98.

CAPITULO 3

*INTERACCIÓN ENTRE FACTORES DE VIRULENCIA
DURANTE LA MODULACIÓN DE FASE.
SU IMPORTANCIA EN LA COLONIZACIÓN
DEL EPITELIO RESPIRATORIO.*



3.	INTERACCIÓN ENTRE FACTORES DE VIRULENCIA DURANTE LA MODULACIÓN DE FASE. SU IMPORTANCIA EN LA COLONIZACIÓN DEL EPITELIO RESPIRATORIO.	66
<hr/>		
3.1	INTRODUCCIÓN.	66
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS.	68
3.2.1.	CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.	68
3.2.2.	CONDICIONES DE CULTIVO DE LÍNEA CELULAR A549.	68
3.2.3.	SUEROS Y ANTICUERPOS.	68
3.2.4.	ENSAYO DE ADHESIÓN.	69
3.2.5.	WESTERN BLOT.	69
3.2.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	69
3.3	RESULTADOS.	70
3.3.1.	LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ACT NO AFECTA LA ADHESIÓN DE <i>B. PERTUSSIS</i> A CÉLULAS EPITELIALES.	70
3.3.2.	LA AUSENCIA DE EXPRESIÓN DE ACT NO AFECTA LA EXPRESIÓN DE FHA EN <i>B. PERTUSSIS</i> .	71
3.3.3.	LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE FHA Y ACT EN RESPUESTA A FACTORES MODULADORES AFECTA LA ADHESIÓN DE <i>B. PERTUSSIS</i> A CÉLULAS EPITELIO-ALVEOLARES.	72
3.3.4.	LA EXPRESIÓN DE ACT AFECTA LA ACTIVIDAD ADHESINA DE FHA INHIBIBLE POR HEPARINA.	74
3.4	DISCUSIÓN.	75
3.5	CONCLUSIONES.	78
3.6	REFERENCIAS.	79

3. INTERACCIÓN ENTRE FACTORES DE VIRULENCIA DURANTE LA MODULACIÓN DE FASE. SU IMPORTANCIA EN LA COLONIZACIÓN DEL EPITELIO RESPIRATORIO.

3.1 INTRODUCCIÓN.

Según se discutió en el capítulo 2, la ausencia de expresión ACT afecta la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales. La expresión de FHA en ausencia de expresión de ACT es característica de la fase intermedia de *B. pertussis*. La fase intermedia ha sido asociada con la etapa inicial de colonización; se postula que la bacteria ingresa al hospedador en fase intermedia o bien ingresa en fase avirulenta y luego modula a fase intermedia. Como ya se mencionó, la transición entre fase virulenta (Bvg⁺), intermedia (Bvgⁱ) y avirulenta (Bvg⁻), regulada por el sistema de dos componentes BvgAS, es contralada *in vitro* por acción de un agente modulador. Una mayor concentración del agente modulador redundante en una disminución en la concentración intracelular del activador transcripcional BvgA~P. Esto deriva en la supresión de los genes *vags* y la expresión de los genes reprimidos en virulencia o *vrgs*. La exposición a condiciones semi-moduladoras, tales como concentraciones intermedias de un agente modulador o temperaturas de cultivo entre 30 °C y 37 °C, resulta en la expresión de los factores de virulencia de la fase Bvgⁱ [2, 3].

Entre los genes regulados por Bvg, no todos los promotores son activados de igual forma. La evidencia experimental indica que la activación de los promotores regulados por Bvg resulta de una respuesta diferente frente a la concentración intracelular de BvgA~P debida a diferencias en la arquitectura de dichos promotores [1, 9]. Los promotores denominados “tempranos”, de los cuales el promotor de *fhaB* es un claro ejemplo, son activados rápidamente una vez liberados de la modulación [18] y se requieren altas concentraciones de agente modulador para inducir su represión [19]. Los promotores “tardíos”, entre los cuales se encuentran los promotores de los genes *cyaA* y *ptxA*, se activan transcurrido un lapso de tiempo mayor luego del cambio a condiciones no moduladoras y se requieren bajas concentraciones de agente modulador para inducir su represión [18, 19]. En consecuencia, durante el cambio de fase avirulenta a virulenta los genes tempranos, como *fhaB*, se activan primero que los genes tardíos, entre ellos *cyaA*. Si las condiciones semi-moduladoras se mantienen la bacteria permanece en fase intermedia, en la cual expresa FHA y no ACT.

Veal-Carr y Stibitz [22] demostraron, utilizando el sistema RIVET (*recombinase-based in vivo technology system*), que la activación diferencial de los promotores de genes de virulencia de *B. pertussis* también ocurre *in vivo*. En dicho estudio, el patrón de expresión de los genes regulados por Bvg *in vivo* coincide con el patrón de expresión observado *in vitro*. Como se mencionó antes, se ha postulado que la regulación

diferencial podría ocurrir durante la transmisión de persona a persona donde *B. pertussis* sufriría diferente grado de modulación debido a cambios en las condiciones de entorno. En estas circunstancias, el orden en que se expresan los factores de virulencia podría afectar la interacción de *B. pertussis* con el hospedador [9, 22, 23]. La expresión inicial de adhesinas como FHA y Fim facilitaría la adhesión a las células del tracto respiratorio. Una vez adheridas la expresión de las toxinas, entre ellas ACT y PT, tendría un efecto protector contra la acción bactericida de las células del sistema inmune del hospedador.

Recientemente, se demostró la asociación física entre dos de los principales factores de virulencia regulados por Bvg [26], FHA y ACT. Se determinó también que la presencia de FHA es necesaria para la retención de ACT en la membrana externa de *B. pertussis*. Sin embargo, la relevancia funcional de la expresión conjunta de FHA y ACT o de la expresión de FHA en ausencia de ACT no ha sido estudiada.

Los resultados del Capítulo 2 demostraron que la ausencia de expresión de ACT afecta la capacidad de interacción de *B. pertussis* con células epiteliales respiratorias. En este capítulo se estudió si esto se debe a un efecto de la actividad enzimática de ACT sobre receptores presentes en la célula epitelial, a una actividad tipo adhesina de ACT o bien a un efecto sobre FHA. Dada su interacción con FHA, la principal adhesina involucrada en la adhesión a células epiteliales, resulta probable que la ausencia de ACT afecte estructuras o dominios presentes en FHA involucrados en la interacción bacteria-célula.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

3.2.1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

Las cepas utilizadas en este estudio se detallan en la **Tabla 1**. Las diferentes cepas de *B. pertussis* fueron cultivadas en placas de ABGs durante 72 hs a 37 °C. Posteriormente, las cepas se repicaron en una nueva placa de ABGs y se cultivaron a 37 °C durante 24 hs. Las cepas de *B. pertussis* (salvaje y mutantes) se ensayaron en fase virulenta a menos que se especifique lo contrario.

Para los estudios comparativos de los fenotipos de *B. pertussis* dependientes del sistema Bvg, la cepa Tohama (cepa salvaje) y la cepa Bp 3183 se cultivaron en placas de ABGs con o sin el agregado de un agente modulador (50 mM MgSO₄) a 37 °C durante 24 hs. Los cultivos fueron luego repicados en medio líquido SS con y sin el agregado de agente modulador (50 mM MgSO₄) y cultivados en agitación (160 r.p.m) a 37 °C durante 30 hs. Posteriormente, ambos cultivos fueron repicados en medio SS sin agente modulador y se procedió a la toma de muestra transcurridas 0, 6, 9, 12, y 24 hs del inicio del cultivo. Las bacterias fueron lavadas, resuspendidas en medio DMEM o PBS a una concentración final de 10⁵ bacteria ml⁻¹ y empleadas en los ensayos de adhesión o western blot, respectivamente.

Tabla 1. Cepas de *B. pertussis*.

Cepa	Descripción	Referencia
Bp Tohama	Cepa salvaje	[17]
Bp GR4	Tohama, FHA (-)	[13]
Bp 3183	Tohama, ACT (-)	[25]
Bp 537	Tohama, Bvg (-) avirulenta	[16]

3.2.2. CONDICIONES DE CULTIVO DE LÍNEA CELULAR A549.

Como modelo de infección se utilizó la línea celular humana A549 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) [12]. Las células A549 fueron cultivadas en botellas (Falcon 3002; Becton Dickinson, San Jose, CA) en medio DMEM suplementado con SFB (10 %) (Cansera, Rexdale, ON, Canada) inactivado por calor, 100 unidades ml⁻¹ y 100 mg ml⁻¹ de Pen/Strep respectivamente (Bio Whittaker, Walkersville, MD), en estufas a 37 °C, con 5 % de CO₂ y 100 % de humedad. Cuando el cultivo alcanzó un 80 % de confluencia, las células fueron removidas con tripsina (0.25 % v v⁻¹)-EDTA (0.1 % p v⁻¹) (KuraboCo., Ltd., Osaka, Japón) y cultivadas en placas de 24 pocillos. El estado del cultivo se testeó por observación microscópica y recuento de células viables por exclusión mediante tinción con *Trypan blue* en pocillos elegidos al azar.

3.2.3. SUEROS Y ANTICUERPOS.

Se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales (mAc) específicos contra proteínas de *B. pertussis*: 2A12 (IgG2a) anti-ACT, 6E1 (IgG1) anti-ACT (ambos provistos por el Dr. Hewlett, Universidad de Virginia, USA), y 37F3 (IgG1) anti-FHA provisto por *The Netherlands Vaccine Institute, Bilthoven, The Netherlands*. Los anticuerpos policlonales (pAc) de ratón anti-ACT de *B. pertussis* fueron generados según se describen en Hozbor *et al.* [7]. En estos ensayos, los anticuerpos fueron empleados en concentraciones no aglutinantes.

3.2.4. ENSAYO DE ADHESIÓN.

La adhesión bacteriana a células A549 se llevó a cabo según lo descrito en el Capítulo 2 con algunas modificaciones. Aproximadamente 5×10^3 células por pocillo fueron cultivadas durante 18 hs en medio DMEM adicionado con SFB y Pen/Strep. El medio de cultivo con antibióticos fue removido mediante lavados con medio DMEM suplementado con 10 % SFB previo a la incubación con las diferentes cepas de *B. pertussis* (proporción: 100 bacterias por célula) en presencia o ausencia de mAc ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$), pAc de ratón anti-ACT (10 % v v⁻¹), suero pre-inmune, o heparina de mucosa bovina (1 mg ml^{-1}) (Sigma). Luego de adicionar el inóculo bacteriano, las placas fueron centrifugadas 5 min a $300 \times g$ para facilitar el contacto entre bacterias y células. La adhesión de bacterias a células A549 luego de 2 horas de incubación a 37 °C, se determinó según se detalla en la sección 2.2.6 del capítulo 2.

3.2.5. WESTERN BLOT.

Para los ensayos de inmunodetección, muestras proteicas obtenidas de suspensiones bacterianas tratadas con buffer Laemmli fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE; 12.5 %) [10] y transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (Immobilon PVDF Millipore) [20]. Las membranas fueron incubadas con mAc anti-FHA o pAc anti-ACT durante 2 hs a temperatura ambiente. La detección inmunoquímica se realizó empleando anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research, BaltimorePike).

3.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación de los valores obtenidos (medias) se utilizó el test de Menor Diferencia Significativa (LSD) con un grado de significación (α) de 0.05.

3.3 RESULTADOS.

3.3.1. LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ACT NO AFECTA LA ADHESIÓN DE *B. PERTUSSIS* A CÉLULAS EPITELIALES.

La disminución de adhesión a células epiteliales en bacterias deficientes en la expresión de ACT (según los resultados expuestos en el capítulo 2), podría deberse a alguna de las actividades enzimáticas de ACT. Por ejemplo, el incremento de AMPc mediado por la actividad adenilato ciclasa (AC) podría incrementar el número de receptores para adhesinas expuestos en la superficie de la célula blanco, entre otros efectos posibles. Para evaluar si alguna de las actividades enzimáticas es responsable del efecto observado, se estudió la adhesión de *B. pertussis* cepa salvaje (Tohama) en presencia de mAc bloqueantes de las distintas actividades enzimáticas de ACT. El mAc 6E1, bloquea la actividad hemolítica (Hly) pero no interfiere con la actividad AC de ACT. El mAc 2A12, bloquea la unión de ACT a la membrana de la célula blanco, e interfiere con ambas actividades enzimáticas de ACT, AC y Hly [11]. Ninguno de los mAc utilizados afectó la adhesión de *B. pertussis* cepa salvaje en fase virulenta a células epiteliales ($P < 0.05$) (**Fig. 1**). Confirmando este resultado, la presencia de suero policlonal contra ACT tampoco modificó la adhesión bacteriana (**Fig. 1**). En contraste, la adhesión de la cepa salvaje disminuyó significativamente en presencia de mAc anti-FHA ($P < 0.05$).

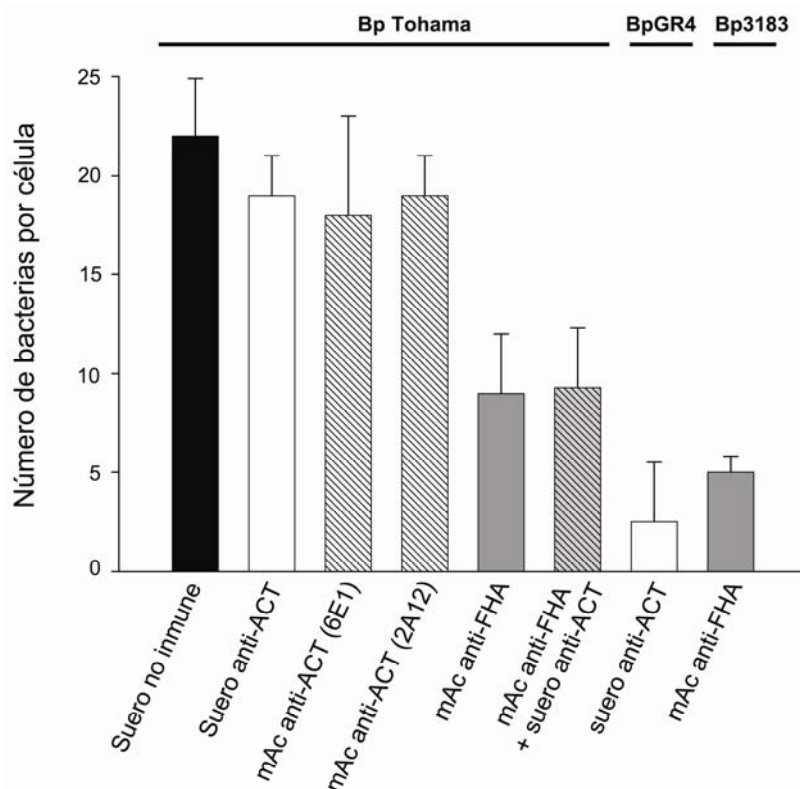


Fig. 1 Efecto de la presencia de anticuerpos anti-ACT y anti-FHA en la adhesión de *B. pertussis* a células epitelio-alveolares. *B. pertussis* cepa salvaje (Bp Tohama) o cepas deficientes en la expresión de ACT (Bp 3183) o FHA (BpGR4) fueron incubados con células A549 (R,b/c 100) en presencia de suero pre-inmune (10 % v v⁻¹), suero

anti-ACT (10 % v v⁻¹), anticuerpos monoclonales (mAc) anti-ACT (30 µg ml⁻¹), anticuerpos monoclonales anti-FHA (30 µg ml⁻¹), o ambos. Los resultados corresponden a la media ± DE de 3 experimentos independientes.

Con el fin de evaluar el posible rol de ACT como una adhesina menor de *B. pertussis*, se evaluó el efecto de la presencia de anticuerpos específicos contra ACT en la adhesión de la cepa mutante deficiente en la expresión de FHA y el efecto de la combinación de anticuerpos anti-FHA y anti-ACT en la adhesión de la cepa salvaje. Según se observa en la **Figura 1**, la presencia de anticuerpos anti-ACT no disminuyó la adhesión del mutante deficiente en la expresión de FHA (ver **Fig. 2**, Capítulo 2). Por otra parte, la presencia de anticuerpos específicos contra ACT no disminuyó la adhesión de la cepa salvaje en presencia de anticuerpos anti-FHA (**Fig. 1**), indicando que ACT no actúa como una adhesina en la interacción de *B. pertussis* con células A549. Por el contrario, la adhesión de la cepa deficiente en la expresión de ACT disminuyó en presencia de anticuerpos anti-FHA confirmando nuevamente el rol principal de FHA en la adhesión a células epiteliales (**Fig. 1**).

3.3.2. LA AUSENCIA DE EXPRESIÓN DE ACT NO AFECTA LA EXPRESIÓN DE FHA EN *B. PERTUSSIS*.

Zaretzky *et al.* [26] demostraron que la expresión de FHA resulta esencial para la expresión de ACT en la superficie bacteriana. Dado que FHA y ACT interactúan en la membrana externa, es posible que la ausencia de ACT afecte la expresión de FHA. Esto podría explicar la disminución de adhesión observada en el mutante deficiente en la expresión de ACT. De acuerdo con los resultados de Zaretzky *et al.* [26], el análisis por western blot de la cepa deficiente en la expresión de FHA (BpGR4) demostró una disminución significativa en la expresión de ACT (**Fig. 2**). Sin embargo, la ausencia de ACT no modificó la expresión celular de FHA (**Fig. 2**).

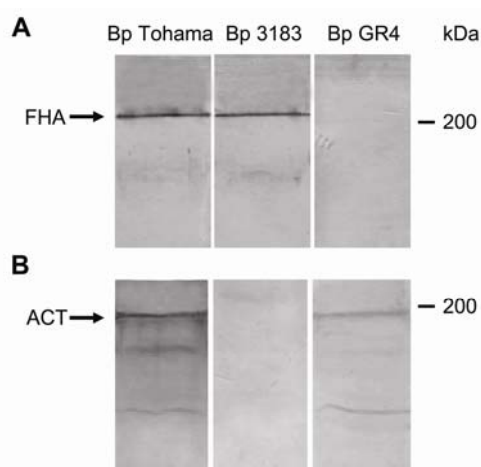


Fig. 2 La ausencia de expresión de ACT no afecta la expresión de FHA. Análisis por Western blot de células de *B. pertussis* Tohama (cepa salvaje); Bp 3183 (ACT-) y Bp GR4 (FHA-). Las muestras proteicas obtenidas de las bacterias lisadas fueron separadas mediante SDS-PAGE (12.5 %) y transferidas a membranas PVDF. Se realizó la inmunodetección empleando anticuerpos de ratón anti-FHA (**A**) o anti-ACT (**B**). La migración de los marcadores de peso molecular (kDa) se indica sobre el margen derecho de la figura.

3.3.3. LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE FHA Y ACT EN RESPUESTA A FACTORES MODULADORES AFECTA LA ADHESIÓN DE *B. PERTUSSIS* A CÉLULAS EPITELIO-ALVEOLARES.

La regulación diferencial de los promotores activados por Bvg determina que *B. pertussis* exprese transitoriamente FHA pero no ACT durante la modulación de fase. Para evaluar el efecto de la ausencia de expresión de ACT en la adhesión a células epiteliales durante la modulación de fase de *B. pertussis*, se realizaron ensayos de adhesión a células A549 con bacterias sometidas a modulación. Brevemente, bacterias cultivadas en presencia de concentraciones moduladoras de MgSO₄ durante aproximadamente 30 hs fueron cultivadas luego en condiciones no moduladoras por diferentes periodos de tiempo (Bp out-mod) y evaluadas en ensayos de adhesión a células epiteliales. *B. pertussis* cepa salvaje (Bp Tohama) y una cepa mutante deficiente en la expresión de ACT (Bp 3183) fueron cultivadas en paralelo bajo condiciones no moduladoras para ser utilizadas como controles. Paralelamente, la cepa Bp 3183 fue cultivada en presencia de concentraciones moduladoras de MgSO₄ durante 30 hs y luego cultivada en condiciones no moduladoras por diferentes periodos de tiempo (Bp 3183 out-mod). Las bacterias así cultivadas fueron utilizadas en ensayos de adhesión a células epiteliales. En la **Figura 3A** se observa que, inmediatamente después del cambio a condiciones no moduladoras, las bacterias (Bp out-mod/0) adhieren significativamente menos ($P < 0.05$) que la cepa salvaje (Bp Tohama) y la cepa Bp 3183. Bacterias recuperadas luego de 6 hs del cambio a condiciones no moduladoras (Bp out-mod/6), momento en el cual se espera que las bacterias expresen FHA y no ACT [22], muestran valores de adhesión significativamente mayores ($P < 0.05$) que aquellos exhibidos por Bp out-mod/0, pero similares a los observados en el mutante deficiente en la expresión de ACT (Bp 3183). Bacterias cultivadas durante 9 hs bajo condiciones no moduladoras adhieren significativamente más ($P < 0.05$) a células epiteliales que las bacterias recuperadas luego de 6 hs, aunque los valores de adhesión de dichas bacterias resultan aún menores que los valores observados en la cepa salvaje (Bp Tohama). Finalmente, luego de 12 horas de incubación en condiciones no moduladoras, la adhesión bacteriana alcanza valores similares a los observados en la cepa salvaje (Bp Tohama). Esto observación coincide con el momento en el que se espera la expresión tanto de FHA como de ACT [22].

La evolución de la expresión de FHA y ACT luego del cambio a condiciones no moduladoras se evaluó por western blot. Como se observa en la **Figura 3B**, luego de 6 hs de cultivo en condiciones no moduladoras se detecta la expresión celular de FHA. La evolución de los valores de adhesión bacteriana parece correlacionar con el nivel de expresión de ACT dependiente del tiempo. El incremento de adhesión del mutante deficiente en la expresión de ACT luego del cambio a condiciones no moduladoras (Bp

3183 out-mod) resultó similar al observado en la cepa salvaje (Bp out-mod) durante las primeras 6 horas. Sin embargo, luego de 9 horas de incubación en condiciones no moduladoras el valor de adhesión de la cepa salvaje (Bp out-mod/9), que a diferencia de la cepa Bp 3183 out-mod ya expresa ACT (**Fig. 3B**), resultó significativamente mayor ($P < 0.05$) que el valor observado en el mutante deficiente en la expresión de ACT bajo las mismas condiciones de cultivo.

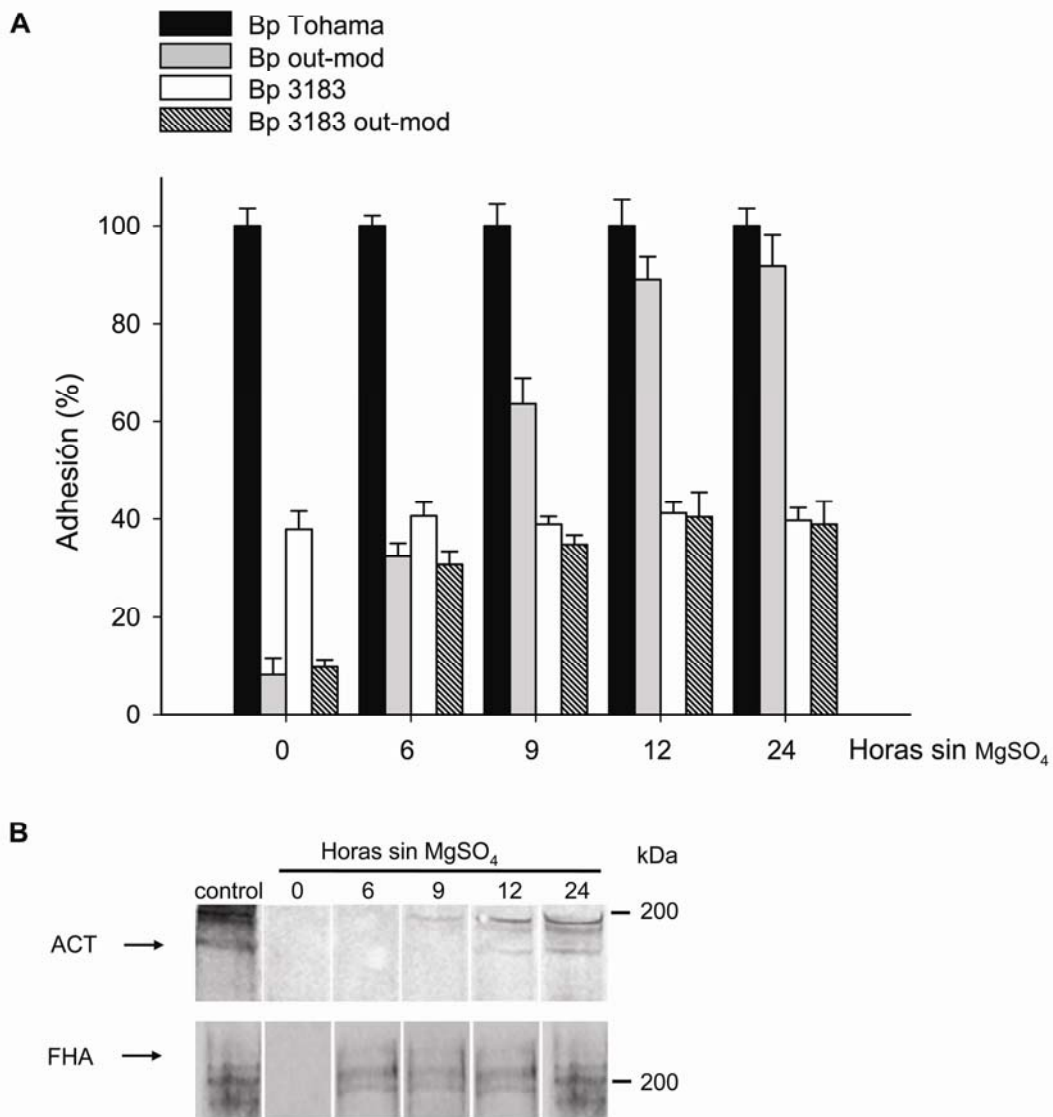


Fig. 3 Modulación fenotípica y su efecto en la adhesión de *B. pertussis* a células epitelio-alveolares humanas. *B. pertussis* cepa salvaje (Bp Tohama) y cepa mutante deficiente en la expresión de ACT (Bp 3183) fueron cultivadas en presencia de MgSO₄ (50 mM) durante 30 hs y luego cultivadas en ausencia de MgSO₄ (Bp out-mod y Bp 3183 out-mod, respectivamente) durante 0, 6, 9, 12 o 24 hs. Paralelamente, la cepa salvaje (Bp Tohama) y la cepa deficiente en la expresión de ACT (Bp 3183) fueron cultivadas en ausencia del agente modulador durante 0, 6, 9, 12 o 24 hs para ser utilizadas como control. (A) Bp out-mod, Bp 3183 out-mod, Bp Tohama, y Bp 3183 cultivadas en condiciones no moduladoras por diferentes periodos de tiempo fueron incubadas con células A549 (R_{b/c} 100). El nivel de adhesión de Bp Tohama (control) se fijó como 100 %. Los valores corresponden a la media de 3 experimentos independientes. (B) La expresión de ACT y FHA en Bp out-mod creciendo bajo condiciones no moduladoras por diferentes periodos de tiempo fue analizada mediante western blot. La expresión de ACT y FHA de Bp Tohama fue analizada como control.

3.3.4. LA EXPRESIÓN DE ACT AFECTA LA ACTIVIDAD ADHESINA DE FHA INHIBIBLE POR HEPARINA.

La adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales a través de FHA involucra un dominio de unión presente en esta proteína que es inhibido en presencia de heparina [6, 14, 15]. Con el fin de determinar si la interacción entre ACT y FHA tiene alguna influencia sobre la funcionalidad de éste dominio de unión a células del hospedador, se comparó la capacidad de adhesión de la cepa salvaje (Bp Tohama) y la cepa deficiente en la expresión de ACT (Bp 3183) a células epiteliales en presencia de heparina. La presencia de heparina determinó una disminución significativa ($P < 0.05$) en la adhesión de la cepa salvaje pero no modificó la adhesión de la cepa mutante deficiente en la expresión de FHA (Bp GR4) (**Fig. 4**). Estos resultados confirman la participación del dominio de unión inhibible por heparina en la adhesión mediada por FHA a células epiteliales. Sin embargo, la presencia de heparina no modificó la adhesión de la cepa Bp 3183 a las células A549 ($P < 0.05$), sugiriendo que la interacción FHA-ACT en la superficie bacteriana resulta relevante para la actividad del dominio de unión a heparina presente en FHA (**Fig. 4**).

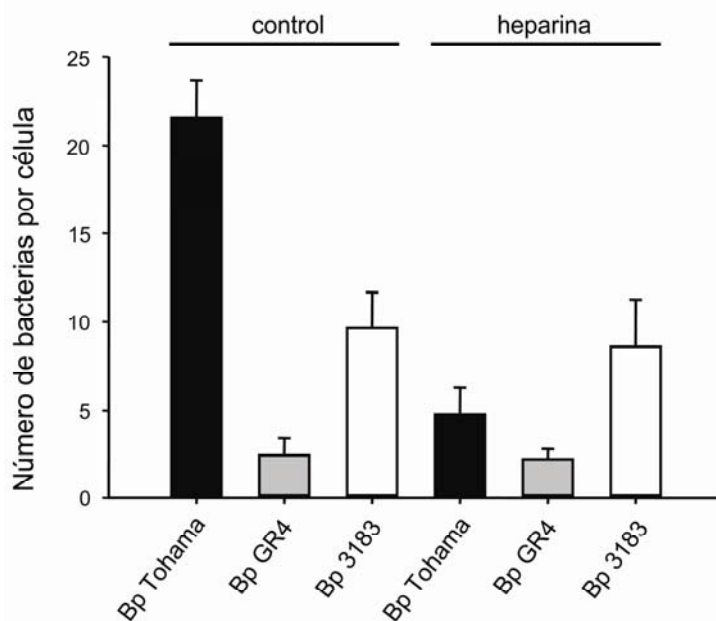


Fig. 4 Efecto de heparina en la adhesión de *B. pertussis* a células epitelio-alveolares. *B. pertussis* cepa salvaje (Bp Tohama), cepa mutante deficiente en la expresión de FHA (Bp GR4) y cepa mutante deficiente en la expresión de ACT (Bp 3183) fueron incubadas con células A549 (Rib/c 100) en presencia o ausencia de heparina (1 mg ml^{-1}). Los resultados corresponden a la media \pm DE de 3 experimentos independientes.

3.4 DISCUSIÓN.

ACT y FHA son dos de los principales factores de virulencia regulados por Bvg con expresión diferencial durante la modulación de fase. Debido a la arquitectura particular de sus promotores, los genes que codifican estas proteínas se activan bajo diferentes condiciones de entorno. Como consecuencia, *B. pertussis* expresa FHA y no ACT en la fase Bvgⁱ.

Estudios recientes demostraron la asociación física entre ACT y FHA en la membrana externa de *B. pertussis* [26]. Una cepa mutante deficiente en FHA libera significativamente más ACT debido a una retención defectiva en la superficie bacteriana [24]. Los resultados presentados en este capítulo confirman y además demuestran que la ausencia de expresión de ACT no afecta la expresión de FHA [26] pero provoca una disminución significativa en la adhesión bacteriana a células epiteliales. Estudios previos mostraron resultados similares en cuanto a la capacidad de adhesión a células epiteliales ciliadas de otra cepa mutante de *Bordetella* deficiente en la expresión de ACT [4, 21], mientras que un mutante de *B. pertussis* que expresa en la superficie bacteriana ACT sin actividad enzimática adhiere a células epiteliales respiratorias en igual magnitud a la cepa salvaje [8]. Combinados, estos resultados parecen indicar que la expresión de ACT en la superficie de *B. pertussis*, y no su actividad enzimática, resulta relevante para la adhesión bacteriana a células epiteliales.

Este efecto se observó también durante la modulación de fase. Bacterias que expresan temporalmente FHA, pero no ACT, durante la modulación de fase mostraron valores de adhesión similares a los observados en la cepa deficiente en ACT. Durante el cambio de fase avirulenta a virulenta, la expresión de FHA se detectó con anterioridad a la expresión de ACT luego del cambio a condiciones no moduladoras y los valores de adhesión observados aumentaron en paralelo con la expresión de ACT. Estos resultados concuerdan con estudios previos publicados por Edwards *et al.* [4], en los cuales se demostró que una cepa mutante de *B. bronchiseptica* deficiente en la expresión de ACT presenta un nivel “intermedio” de adhesión a células epiteliales traqueales de conejo, esto es, valores intermedios entre la cepa Bvg⁺ y Bvg⁻.

Sin embargo, ACT no parece comportarse como adhesina. Bacterias deficientes en la expresión de todos los factores de virulencia regulados por Bvg adhieren a células epiteliales en forma similar a bacterias deficientes en la expresión de FHA. Esto sugiere que FHA, y no ACT o cualquier otro de los factores de virulencia regulados por Bvg, participa en la adhesión bacteriana bajo las condiciones experimentales empleadas en este estudio. Por otro parte, la presencia de anticuerpos anti-ACT no modificó la adhesión de la cepa salvaje o del mutante deficiente en FHA a células epiteliales respiratorias. Estos datos sugieren que ACT no se comporta como adhesina en las condiciones ensayadas en este estudio.

El incremento en la concentración intracelular de AMPc provocado por ACT podría inducir cambios en la célula blanco que determinen un aumento en la adhesión bacteriana. Para evaluar esta posibilidad utilizamos anticuerpos monoclonales capaces de bloquear cada una de las actividades enzimáticas de la toxina ACT, adenilato ciclasa y hemolisina. Ninguno de los anticuerpos monoclonales disminuyó la adhesión de la cepa salvaje indicando que las actividades enzimáticas de ACT no están involucradas en el aumento de adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales. Resultados obtenidos por otro grupo de investigación parecen apoyar esta conclusión. Gray *et al.* [5] encontraron que el bloqueo de la actividad adenilato ciclasa de la toxina mediante anticuerpos monoclonales suprime la inducción de altos niveles de AMPc en monocitos de ratón pero no afecta la adhesión de *B. pertussis*. De manera similar, en un trabajo publicado por Ishibashi *et al.* [8] se demostró que los niveles de adhesión celular de una cepa de *B. pertussis* que expresa una forma inactiva de ACT en la membrana bacteriana y la cepa salvaje que expresa la toxina en forma activa son similares. En conjunto, estos resultados indican que la disminución de adhesión bacteriana en ausencia de ACT no está relacionada con ninguna de las actividades enzimáticas de esta toxina.

La asociación entre ACT y FHA en la superficie bacteriana plantea la posibilidad de que la expresión de ACT intervenga de alguna manera en la adhesión bacteriana mediada por FHA. FHA es una adhesina multifuncional que posee diferentes moléculas de anclaje, incluyendo lactosil ceramidas presente en células ciliadas, azúcares sulfatados presentes en la superficie de células epiteliales y en la matriz extracelular, e integrinas presentes en leucocitos. Menozzi *et al.* [15] demostraron que la actividad de unión inhibible por heparina de FHA es la responsable de la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales. La presencia de heparina determina una disminución en la adhesión de la cepa salvaje resultando ésta en valores similares a los observados en el mutante deficiente en FHA, mientras que la adhesión del mutante deficiente en FHA no se ve afectada por la presencia de dicho glucosaminoglucano. En este estudio se demostró que la presencia de heparina no modifica significativamente la adhesión de la cepa deficiente en ACT. Estos resultados sugieren que la expresión de ACT modifica y amplifica la función de FHA como adhesina, presumiblemente induciendo un cambio conformacional que involucra, al menos, uno de los dominios de unión de esta proteína. La ausencia de ACT modifica la interacción FHA-células epiteliales en forma tal que la adhesión bacteriana es menor pero también resulta insensible a la presencia de heparina. La heparina y otros glicosaminoglicanos sulfatados están presentes en forma abundante en la matriz extracelular e interaccionan con diversas proteínas eucariotas las cuales regulan procesos fisiológicos importantes. Los heparan sulfatos (HS) están presentes en la matriz extracelular de la superficie celular de casi todas las células animales.

Como ya se mencionó, se cree que la regulación diferencial de los factores de virulencia a través del sistema Bvg juega un rol en la patogénesis de *B. pertussis* [9, 23]. Un

estudio recientemente publicado sustenta esta hipótesis y sugiere que la fase Bvgⁱ es importante durante la infección [22]. Este fenotipo se caracteriza por la expresión de FHA pero no ACT. El cambio en la funcionalidad de FHA asociada a la superficie bacteriana en ausencia de expresión ACT podría ser relevante para la adhesión de la bacteria durante la infección, cuando la producción de mucus y de polisacáridos sulfatados aumenta considerablemente en el tracto respiratorio.

3.5 CONCLUSIONES.

La adhesión al epitelio respiratorio es un evento clave en la colonización de *B. pertussis*. En este capítulo se estudió la relevancia de la interacción entre dos factores de virulencia que presentan una asociación física en membrana externa y que poseen la particularidad de tener un patrón de expresión temporal distinto durante la modulación de fase. FHA, una de las principales adhesinas de *B. pertussis*, es un factor de virulencia de expresión temprana mientras que la toxina ACT es un factor de virulencia de expresión tardía. La ausencia de expresión de FHA o ACT resulta en una significativa disminución en la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales. En bacterias que co-expresan FHA y ACT (bacterias en fase virulenta) la heparina, así como otros heparan sulfatos abundantes en el sitio de infección, bloquea uno de los dominios de unión a carbohidratos de FHA crucial en la interacción con células epiteliales. Los resultados presentados aquí sugieren que la expresión de ACT en membrana modifica la actividad adhesina de FHA indirectamente, esto es, altera el funcionamiento del dominio de unión a carbohidratos inhibible por heparina presente en FHA. La ausencia de expresión de ACT no interfiere con la localización de FHA pero determina que *B. pertussis* se adhiera eficientemente a células epiteliales aún en presencia de heparina. De manera que, la interacción entre estos dos factores y la regulación temporal de su expresión podría ser crítica durante la infección.

3.6 REFERENCIAS.

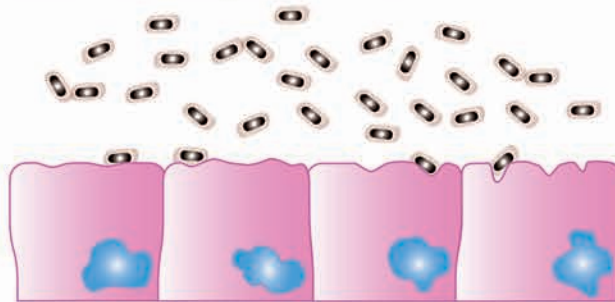
- [1] Boucher P.E., Stibitz S. Synergistic binding of RNA polymerase and BvgA phosphate to the pertussis toxin promoter of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1995. 177 (22): 6486-91.
- [2] Cotter P.A., DiRita V.J. Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu Rev Microbiol.* 2000. 54:519-65.: 519-65.
- [3] Deora R., Bootsma H.J., Miller J.F., Cotter P.A. Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol Microbiol.* 2001. 40 (3): 669-83.
- [4] Edwards J.A., Groathouse N.A., Boitano S. *Bordetella bronchiseptica* adherence to cilia is mediated by multiple adhesin factors and blocked by surfactant protein A. *Infect Immun.* 2005. 73 (6): 3618-26.
- [5] Gray M.C., Donato G.M., Jones F.R., Kim T., Hewlett E.L. Newly secreted adenylate cyclase toxin is responsible for intoxication of target cells by *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 2004. 53 (6): 1709-19.
- [6] Hannah J.H., Menozzi F.D., Renauld G., Loch C., Brennan M.J. Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infect Immun.* 1994. 62 (11): 5010-9.
- [7] Hozbor D., Chirido F.G., Rodriguez M.E., Valverde C., Yantorno O. Quantitation of adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* by enzyme linked immunosorbent assay. *Biologicals.* 1995. 23 (4): 279-84.
- [8] Ishibashi Y., Relman D.A., Nishikawa A. Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and alpha5beta1 integrin. *Microb Pathog.* 2001. 30 (5): 279-88.
- [9] Kinneer S.M., Marques R.R., Carbonetti N.H. Differential regulation of Bvg-activated virulence factors plays a role in *Bordetella pertussis* pathogenicity. *Infect Immun.* 2001. 69 (4): 1983-93.
- [10] Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970. 227 (5259): 680-5.
- [11] Lee S.J., Gray M.C., Guo L., Sebo P., Hewlett E.L. Epitope mapping of monoclonal antibodies against *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect Immun.* 1999. 67 (5): 2090-5.
- [12] Lieber M., Smith B., Szakal A., Nelson-Rees W., Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer.* 1976. 17 (1): 62-70.
- [13] Loch C., Geoffroy M.C., Renauld G. Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the papC and papD gene families. *EMBO J.* 1992. 11 (9): 3175-83.
- [14] Menozzi F.D., Gantiez C., Loch C. Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin. *FEMS Microbiol Lett.* 1991. 62 (1): 59-64.
- [15] Menozzi F.D., Mutombo R., Renauld G., Gantiez C., Hannah J.H., Leininger E., et al. Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1994. 62 (3): 769-78.
- [16] Relman D.A., Domenighini M., Tuomanen E., Rappuoli R., Falkow S. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989. 86 (8): 2637-41.

- [17] Sato Y., Arai H. Leucocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis*. I. Purification and characterization. *Infect Immun.* 1972. 6 (6): 899-904.
- [18] Scarlato V., Arico B., Prugnola A., Rappuoli R. Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* 1991. 10 (12): 3971-5.
- [19] Stibitz S. Mutations affecting the alpha subunit of *Bordetella pertussis* RNA polymerase suppress growth inhibition conferred by short C-terminal deletions of the response regulator BvgA. *J Bacteriol.* 1998. 180 (9): 2484-92.
- [20] Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology.* 1992. 24: 145-9.
- [21] Tuomanen E., Weiss A. Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory-epithelial cells. *J Infect Dis.* 1985. 152 (1): 118-25.
- [22] Veal-Carr W.L., Stibitz S. Demonstration of differential virulence gene promoter activation in vivo in *Bordetella pertussis* using RIVET. *Mol Microbiol.* 2005. 55 (3): 788-98.
- [23] Vergara-Irigaray N., Chavarri-Martinez A., Rodriguez-Cuesta J., Miller J.F., Cotter P.A., Martinez d.T. Evaluation of the role of the Bvg intermediate phase in *Bordetella pertussis* during experimental respiratory infection. *Infect Immun.* 2005. 73 (2): 748-60.
- [24] Weiss A.A., Hewlett E.L., Myers G.A., Falkow S. Tn5-induced mutations affecting virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1983. 42 (1): 33-41.
- [25] Weiss A.A., Melton A.R., Walker K.E., Andraos-Selim C., Meidl J.J. Use of the promoter fusion transposon Tn5 lac to identify mutations in *Bordetella pertussis* vir-regulated genes. *Infect Immun.* 1989. 57 (9): 2674-82.
- [26] Zaretzky F.R., Gray M.C., Hewlett E.L. Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of *Bordetella pertussis*: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction. *Mol Microbiol.* 2002. 45 (6): 1589-98.

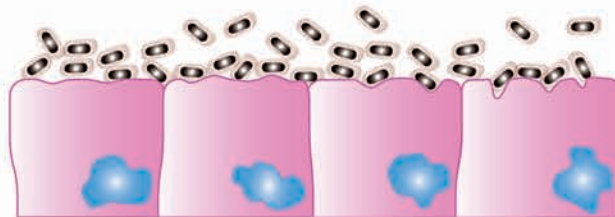
CAPITULO 4

ADAPTACIÓN FENOTÍPICA A LAS CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y SUS CONSECUENCIAS EN LA INTERACCIÓN DE *B. PERTUSSIS* CON CÉLULAS EPITELIALES.

Bordetella pertussis SS + Fe



Bordetella pertussis SS - Fe



4. ADAPTACIÓN FENOTÍPICA A LAS CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y SUS CONSECUENCIAS EN LA INTERACCIÓN DE <i>B. PERTUSSIS</i> CON CÉLULAS EPITELIALES.	84
<hr/>	
4.1 INTRODUCCIÓN.	84
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.	86
4.2.1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.	86
4.2.2. DETECCIÓN DE SIDERÓFOROS.	86
4.2.3. SUEROS Y ANTICUERPOS.	87
4.2.4. LECTINAS.	87
4.2.5. CONDICIONES DE CULTIVO DE LÍNEA CELULAR A549.	87
4.2.6. ENSAYO DE UNIÓN A LECTINAS.	88
4.2.7. ENSAYO DE UNIÓN A MUCINA.	88
4.2.8. ENSAYO DE ADHESIÓN.	88
4.2.9. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA.	89
4.2.10. WESTERN BLOT.	89
4.2.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	90
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	91
4.4 CONCLUSIONES.	99
4.5 REFERENCIAS.	100

4. ADAPTACIÓN FENOTÍPICA A LAS CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y SUS CONSECUENCIAS EN LA INTERACCIÓN DE *B. PERTUSSIS* CON CÉLULAS EPITELIALES.

4.1 INTRODUCCIÓN.

Como se mencionó anteriormente, existen dos tipos de vacunas contra la tos convulsa: las vacunas celulares, compuestas de bacterias en fase virulenta inactivadas por calor, y las vacunas acelulares, compuestas de antígenos purificados como FHA, Fim, Prn, o PT, que son proteínas propias de la fase virulenta de *B. pertussis*. Parte de la problemática asociada al uso de las vacunas actuales puede explicarse si se tiene en cuenta uno de los modelos de infección más aceptados en la actualidad. Este modelo, sustentado por resultados de numerosos grupos de investigación, sostiene que durante la etapa inicial de infección *B. pertussis* no se encuentra en fase virulenta sino en un estado intermedio o avirulento. Esta discrepancia entre el fenotipo vacunal (virulento) y el fenotipo infectante podría explicar en parte la protección deficiente de las vacunas actuales. Los resultados discutidos en el capítulo 3, demostraron la importancia de la expresión diferencial y de la interacción entre factores de virulencia durante la modulación de fase en la adhesión a células epiteliales y sus implicancias en el éxito de la colonización.

Una estrategia que permite acercarnos al estudio del fenotipo infectante de *B. pertussis*, independientemente de la fase de virulencia que este patógeno podría presentar al momento de la infección, implica el estudio del fenotipo bacteriano en respuesta a condiciones fisiológicas. Es decir aquellas características que deberán estar presentes en la bacteria infectante para que sea capaz de sobrevivir y colonizar al hospedador. Una condición del entorno que todos los microorganismos patógenos de mamíferos enfrentan es el stress nutricional por escasez de hierro libre.

El hierro es un micro-nutriente esencial para todos los organismos. La concentración de hierro libre en el cuerpo humano es demasiado baja para permitir el crecimiento microbiano, debido principalmente a la presencia de proteínas, como transferrina, lactoferrina y hemoglobina, que capturan el hierro disponible. Así, la escasez de hierro en mucosas y fluidos constituye una barrera natural contra el desarrollo de infecciones. Las bacterias responden a esta limitación de hierro mediante la expresión de sistemas de captura de hierro de alta afinidad además de otros factores que eventualmente contribuyen a la colonización [11, 14]. La expresión de estos sistemas, en general de tipo proteico, es regulada por la disponibilidad de hierro libre en el entorno bacteriano. En particular, *B. pertussis* expresa diferentes proteínas de captura de alta afinidad, incluyendo proteínas de unión a lactoferrina o transferrina y un receptor para la utilización del grupo hemo [7, 21, 23, 24]. La limitación de hierro también induce en *B.*

pertussis la expresión de diversas proteínas de membrana externa, algunas de función aún no establecida, y receptores de sideróforos [1, 6, 10].

Estudios previos indican que la limitación de hierro induce en diversos microorganismos patógenos fenotipos con mayor virulencia, los cuales, entre otras características, poseen una mayor capacidad de adhesión al epitelio del hospedador que contribuye a la colonización [18, 26]. En este capítulo, investigamos si la limitación en este nutriente, uno de los principales moduladores *in vivo*, modifica la capacidad de interacción de *B. pertussis* con células epiteliales y, si en estas condiciones, se induce la expresión de proteínas inmunogénicas que puedan representar potenciales candidatos vacunales.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

4.2.1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

Bordetella pertussis cepa salvaje (Tohama) y cepa Bp GR4, un mutante derivado de Tohama defectivo en la expresión de FHA [15], fueron utilizadas en este estudio. Para determinados experimentos, la cepa Tohama fue transformada con el plásmido pCW505 (proporcionado por Dr. Weiss, Cincinnati, Ohio) el cual induce la expresión citoplasmática de la proteína fluorescente verde GFP (*Green Fluorescent Protein*) sin modificar el crecimiento o la expresión de antígenos [29].

Las cepas de *B. pertussis* fueron cultivadas en placas de ABGs durante 72 hs a 37 °C y luego repicadas en una nueva placa ABGs y cultivadas a 37 °C durante 24 hs. De los cultivos en medio sólido se extrajo un inóculo para el cultivo en medio líquido SS a una densidad celular inicial equivalente a 0.2 Abs_{650 nm}. Las bacterias fueron cultivadas en este medio durante 30 hs a 37 °C y 160 r.p.m. Finalizado este proceso, las bacterias se recuperaron por centrifugación (10000 × g, 15 min), se lavaron con una solución salina estéril libre de hierro, y se resuspendieron a una concentración estimada de 2 × 10⁸ UFC ml⁻¹. Volúmenes iguales de la suspensión bacteriana fueron utilizados para inocular 100 ml de medio SS (SS, 36 μM hierro) y medio SS libre de hierro (SS-Fe, sin el agregado de FeSO₄·7H₂O). Dichos inóculos bacterianos fueron cultivados a 37 °C en agitación (160 r.p.m) durante 20 hs (fase exponencial temprana), y luego repicados (dos veces) en los respectivos medios de cultivo. Finalmente, las bacterias fueron recuperadas por centrifugación y utilizadas en los correspondientes ensayos.

Para los estudios comparativos de los fenotipos de *B. pertussis* dependientes del sistema Bvg, la cepa Tohama se cultivo en ABGs con y sin el agregado de un agente modulador (50 mM MgSO₄) a 37 °C durante 24 hs. Dichos cultivos fueron repicados en medio líquido SS o SS-Fe, con y sin el agregado de agente modulador (50 mM MgSO₄, 160 r.p.m. a 37 °C durante 20 hs), respectivamente.

El medio SS libre de hierro (SS-Fe) fue preparado empleando tubos de polipropileno estériles (Falcon; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) o recipientes de vidrio lavados con una solución de ácido nítrico (3M) y H₂O bidestilada para remover posibles trazas de hierro adheridas a la superficie. Toda el H₂O empleada para la preparación de medio libre de hierro fue deionizada. El medio SS libre de hierro fue finalmente tratado con una resina de intercambio catiónico Chelex 100 (Bio-Rad, Hercules, Calif., USA) según West & Sparling [30].

4.2.2. DETECCIÓN DE SIDERÓFOROS.

La presencia de sideróforos en el sobrenadante del medio de cultivo de *B. pertussis* cultivada en medio SS libre de hierro se determinó para confirmar la limitación de

hierro del cultivo. Brevemente, muestras de cultivos de *B. pertussis* en medio SS-Fe y SS (empleado como control negativo) fueron centrifugadas para remover las células. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de nylon de tamaño de poro 0.22 μm (Nalgene Co., Rochester, N. Y.) y se le adicionó a un volumen equivalente de solución de cromo azurol S (ensayo CAS) según se describe en Schwyn & Neilands [27]. El cambio de color de azul a rosado indica la presencia de sideróforos.

4.2.3. SUEROS Y ANTICUERPOS.

En este estudio se empleó un pool de 15 sueros de pacientes convalecientes de tos convulsa con elevado título contra *B. pertussis*, según se determinó por ELISA [19], y un pool de sueros de niños de 4 años de edad (nacionalidad holandesa) participantes de un ensayo clínico para comparar la eficiencia de diferentes refuerzos en la vacunación contra pertussis [5]. Estos infantes fueron vacunados según el Programa de Inmunización Nacional Regular de Holanda a la edad de 2, 3, 4 y 11 meses con la vacuna celular. Las muestras de sueros de 15 niños obtenidas transcurridos 30 días desde la última dosis de vacuna celular, con elevado título contra *B. pertussis* según se determinó por ELISA [19], se utilizaron para generar un pool de sueros el cual se utilizó en este estudio.

Se empleó el anticuerpo monoclonal (mAc) 4-37F3 (IgG1) específicos contra FHA de *B. pertussis* [22] provisto por *The Netherlands Vaccine Institute, Bilthoven, The Netherlands*.

4.2.4. LECTINAS.

Las lectinas fluorescentes por conjugación con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (FITC-lectina) procedentes de *Dioclea violácea* (DvL), *Dioclea grandiflora* (DgL), *Cratylia floribunda* (CfL), *Bryohamnum triquetrum* (BtL), y *Lonchocarpus sericeus* (LsL) [2, 3, 9, 20] fueron gentilmente proporcionadas por el Dr. Holanda Teixeira, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.

4.2.5. CONDICIONES DE CULTIVO DE LÍNEA CELULAR A549.

Como modelo de infección se utilizó la línea celular humana A549 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) [13]. Las células A549 fueron cultivadas en botellas (Falcon 3002; Becton Dickinson, San Jose, CA) en medio DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY) suplementado con 10 % de SFB inactivado por calor (Cansera, Rexdale, ON, Canada), 100 unidades ml^{-1} y 100 mg ml^{-1} de Pen/Strip (Bio Whittaker, Walkersville, MD), en estufas a 37 °C, con 5 % de CO_2 y 100 % de humedad. Cuando el cultivo alcanzó un 80 % de confluencia, las células fueron removidas con tripsina

(0.25 % v v⁻¹)-EDTA (0.1 % p v⁻¹) (KuraboCo., Ltd., Osaka, Japón) y cultivadas en placas de 24 pocillos. El estado del cultivo se testeó por observación microscópica y recuento de células viables por exclusión mediante tinción con *Trypan blue* en pocillos elegidos al azar.

4.2.6. ENSAYO DE UNIÓN A LECTINAS.

La capacidad de unión a lectinas de células A549 o de *B. pertussis* cultivada en medio SS o SS-Fe se estudió según describen Moreira *et al.* [18] con algunas modificaciones menores. Brevemente, células A549 cultivadas sobre un cubreobjetos circular de vidrio o 15 µl de una suspensión de bacterias (aproximadamente 3×10^7 bacterias ml⁻¹) dispuestas sobre un portaobjetos de vidrio, fueron secadas al aire y luego fijadas con metanol durante 20 min a 22 °C. Luego de un lavado con solución PBS-5 % albúmina bovina (BSA) las muestras fueron incubadas con 15 µl de diferentes concentraciones de FITC-lectina en PBS-5 % BSA (rango de concentraciones evaluadas: 0 a 750 µg ml⁻¹) a 22 °C durante 30 min. Posteriormente, los portaobjetos fueron lavados tres veces con PBS-5 % BSA, preparados en solución PBS-glicerol (50 % v v⁻¹), y observados en microscopio de epifluorescencia (microscopio DMLB acoplado a una cámara DC 100, Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Switzerland).

4.2.7. ENSAYO DE UNIÓN A MUCINA.

La capacidad de unión a mucina de *B. pertussis* cultivada en medio SS o SS-Fe se estudió según describen Belcher *et al.* [4]. Brevemente, 2.5 µg de mucina tipo I procedente de glándula submaxilar bovina (Sigma) fue disecada (37 °C, 14 hs) sobre los pocillos de un placa de polipropileno para ELISA. Placas tratadas con y sin mucina fueron luego lavadas con PBS, bloqueadas con una solución PBS-5 % leche descremada durante 1 h a 37 °C y lavadas nuevamente con PBS. Bacterias con expresión de GFP cultivadas en medio SS o SS-Fe fueron adicionadas a las placas (2×10^8 bacterias por pocillo) e incubadas a 37 °C durante 1 h. Las bacterias no adheridas fueron removidas mediante tres lavados con PBS. La fluorescencia en cada pocillo se determinó empleando un fluorómetro de 96 pocillos (Berthold Technology Twinkle LB970). Pocillos recubiertos únicamente con mucina o con solución de bloqueo fueron utilizados como control de fluorescencia *background*.

4.2.8. ENSAYO DE ADHESIÓN.

La adhesión bacteriana a células A549 se llevó a cabo según lo detallado en el Capítulo 2 con algunas modificaciones [25]. Aproximadamente 5×10^3 células por pocillo fueron cultivadas durante 18 hs en medio DMEM adicionado con SFB y Pen/Strep. El medio

de cultivo con antibióticos fue removido mediante dos lavados con medio DMEM suplementado con 10 % SFB previo a la incubación con las diferentes cepas de *B. pertussis* (R;b/c 100) en presencia o ausencia de 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido síalico (Sigma, St Louis, MO); 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de LsL; 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de BtL; 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de D-manosa (Sigma); 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de mucina tipo I procedente de glándula submaxilar bovina (Sigma); o 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de BtL + 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de mucina tipo I. En determinados experimentos, las bacterias fueron pre-incubadas con 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de mucina tipo I durante 30 min a 37 °C, o con 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de proteinasa K (Sigma) durante 30 min a 37 °C seguida de la adición de PMSF (1 mM) para detener la actividad proteolítica. En ambos casos la bacterias fueron lavadas con DMEM-10 % SFB luego del tratamiento, y utilizadas en ensayos de adhesión a células A549 según se detalló antes. Finalmente, se realizaron ensayos de adhesión en presencia de sueros (pool) de donantes vacunados e infectados (2.5 % v v⁻¹). Ensayos de adhesión en presencia de suero no inmune (título de anticuerpos negativo contra *B. pertussis*) fueron realizados como control. Luego de adicionar el inóculo bacteriano, las placas fueron centrifugadas 5 min a 300 $\times g$ para facilitar el contacto entre bacterias y células. La adhesión de bacterias a células A549 luego de 2 horas de incubación a 37 °C, se determinó según se detalla en la sección 2.2.6 del capítulo 2.

4.2.9. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA.

Fracciones enriquecidas en proteínas de membrana externa de *B. pertussis* cultivada en medio SS o SS-Fe se obtuvieron según describen Molloy *et al.* [17]. Brevemente, las bacterias fueron fragmentadas utilizando una prensa Francesa (*Aminco French press*, dos ciclos de 14000 psi). Las células no fragmentadas fueron removidas por centrifugación a 8000 $\times g$ durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante equivalente a 20 mg de proteína total fue diluido con una solución fría (-20 °C) de carbonato de sodio (0.1 M, pH 11) a un volumen final de 60 ml y agitado suavemente en cámara de hielo durante 1 h. Las muestras tratadas con carbonato de sodio fueron sometidas a ultracentrifugación (115000 $\times g$) durante 1 h a 4 °C empleando un rotor Beckman 55.2 Ti. Se descartó el sobrenadante y el pellet (fracción enriquecida en proteínas de membrana externa) se resuspendió y lavó en 2 ml de una solución 50 mM Tris/HCl, pH 7.5. La fracción lavada se recuperó mediante centrifugación, se resuspendió en H₂O bidestilada y se determinó la concentración de proteínas final.

4.2.10. WESTERN BLOT.

Para los ensayos de inmunodetección, muestras proteicas obtenidas de suspensiones bacterianas lisadas con buffer Laemmli y muestras de fracciones enriquecidas en proteínas de membrana externa fueron analizadas mediante electroforesis en geles de

poliacrilamida (SDS-PAGE; 12.5 %) [12] y transferidas a membranas de poli-fluoruro de vinilideno (Immobilon PVDF Millipore) [28]. Las membranas fueron incubadas con mAc anti-FHA o sueros (pool) de pacientes infectados con *B. pertussis* o pacientes vacunados contra pertussis. La detección inmunoquímica se realizó empleando anticuerpos de cabra anti-IgG de humano conjugados con fosfatasa alcalina o anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research, BaltimorePike) según el ensayo, y NBT/BCIP (Promega) como sustrato de reacción.

4.2.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación de los valores obtenidos (medias) se utilizó el test de Menor Diferencia Significativa (LSD) con un grado de significación (α) de 0.05.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El hierro es un nutriente escaso en cuanto a su accesibilidad pero esencial para el crecimiento microbiano. Proteínas bacterianas con la capacidad de secuestrar hierro son en si mismas factores de virulencia importantes para los patógenos humanos. Estudios previos han demostrado que la limitación de hierro induce no solo la síntesis de varias proteínas de membrana externa en *B. pertussis* involucradas en la adquisición de hierro [1, 6, 7, 23, 24], sino también de otras proteínas de función desconocida.

Nuestros estudios demostraron que *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro (medio SS-Fe) adhiere más eficientemente a células A549 que bacterias cultivadas en condiciones normales (medio SS) (**Fig. 1**). La mayor adhesión de estas bacterias no se debe a un incremento en la expresión de la principal adhesina de *B. pertussis*, FHA, en nuestro modelo según se determinó por western blot (**Fig. 1**). Esto fue corroborado mediante experimentos adicionales empleando bacterias deficientes en la expresión de FHA y de cualquier otro factor de virulencia regulado por Bvg (Bvg^-), las cuales mostraron un incremento en la adhesión tres veces superior (tal como se verificó en bacterias Bvg^+) luego de ser cultivadas en limitación de hierro, sugiriendo que la limitación de hierro induce la expresión de adhesinas independientes del sistema Bvg (**Fig. 1**).

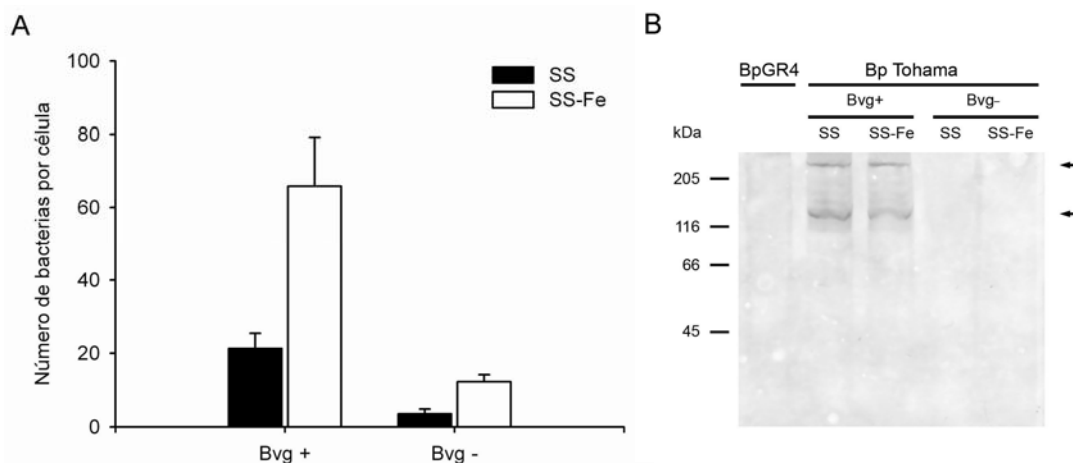


Fig. 1 Efecto de la limitación en hierro en la adhesión de *B. pertussis* a células epitelio-alveolares humanas. (A) Bacterias en fase virulenta (Bvg^+) y moduladas a fase avirulenta (Bvg^-) cultivadas en medio con exceso de hierro (SS) o medio libre de hierro (SS-Fe) fueron incubadas con células A549 (R:b/c 100). Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes. (B) Western blot de células lisadas de *Bordetella pertussis* Tohama en fase virulenta (Bvg^+) y moduladas a fase avirulenta (Bvg^-) cultivadas en medio con exceso de hierro (SS) o medio libre de hierro (SS-Fe), y *Bordetella pertussis* cepa mutante deficiente en la expresión de FHA (BpGR4). Las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-FHA de ratón. Los marcadores de peso molecular (kDa) se indican sobre el margen derecho de la figura. Las flechas indican la posición de los polipéptidos de FHA.

Con el fin de determinar si dichas adhesinas son de naturaleza proteica, bacterias cultivadas en medio SS o SS-Fe se trataron con proteinasa K previo a la incubación con las células epiteliales. El tratamiento con proteinasa K disminuyó significativamente la

adhesión bacteriana resultando en niveles de adhesión similares en ambos casos e indicando que el incremento de adhesión en respuesta a la ausencia de hierro se debe a proteínas de membrana externa o proteínas asociadas a la superficie bacteriana (**Fig. 2**).

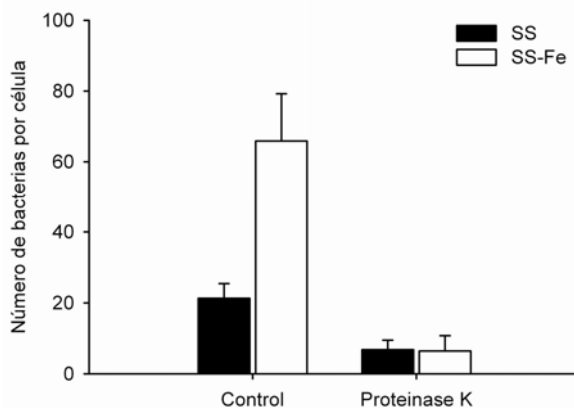


Fig. 2 Adhesión de *B. pertussis*, cultivada bajo diferentes condiciones de disponibilidad de hierro, luego del tratamiento con proteinasa K. Bacterias virulentas cultivadas en medio con exceso de hierro (SS) o medio libre de hierro (SS-Fe) fueron incubadas con proteinasa K ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) durante 30 min a 37°C , seguida de la adición de PMSF (1 mM) para detener la actividad proteolítica, y luego incubadas con células A549 (R_{b/c} 100). La adhesión de bacterias virulentas cultivadas en medio SS o SS-Fe, sin tratamiento con proteinasa K (control), se evaluó en paralelo. Los datos representan la medio \pm DE de 3 experimentos independientes.

Uno de los tipos de interacción adhesina-receptor común en las bacterias patógenas implica el reconocimiento lectina-carbohidrato. Las lectinas son estructuras con especificidad por carbohidratos, que le permiten a la bacteria unirse a residuos glicosilados de glicoproteínas o glicolípidos presentes en las células eucariotas. Las lectinas pueden conformar estructuras tipo fimbria, o ser componentes de la cápsula o de la membrana externa en bacterias Gram-negativas. En este estudio, empleamos un panel de lectinas con ligandos conocidos en ensayos de inhibición con el fin de identificar eventuales residuos de carbohidratos involucrados en el incremento de adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales dependiente de hierro. Realizamos ensayos de adhesión bacteriana en ausencia o presencia de las diferentes lectinas. La mayoría de las lectinas evaluadas, incluyendo DvL, DgL, o CfL, no modificaron la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales. Sin embargo, la presencia de LsL revirtió el incremento de adhesión observado en bacterias cultivadas en limitación de hierro (**Fig. 3A**). La adhesión de bacterias cultivadas en medio con exceso de hierro en presencia de LsL resultó leve pero significativamente ($P < 0.05$) menor al valor observado en ausencia de LsL. El único ligando descrito para esta lectina es N-acetilglucosamina (constituyente del peptidoglicano), lo cual limita tal vez la relevancia de esta observación. De cualquier forma, nuestros resultados sugieren que *B. pertussis* expresa constitutivamente un ligando de esta lectina, y que su expresión es regulada positivamente cuando la bacteria se enfrenta a condiciones de limitación de hierro (**Fig. 3A**). La presencia de BtL

umentó la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales cualquiera sea la condición de cultivo empleada. Lo cual indicaría la expresión constitutiva de un ligando para BtL en *B. pertussis*. Cuando se incubaron las lectinas fluorescentes con células A549 o *B. pertussis*, se observó que tanto BtL como LsL fueron capaces de adherirse a las bacterias, pero solamente se detectaron células epiteliales fluorescentes en el caso de incubación en presencia de BtL. En la **figura 3B**, se muestran resultados representativos de estos ensayos. Estos resultados podrían explicar el efecto de LsL en la adhesión bacteriana sugiriendo que el ligando de LsL en *B. pertussis* podría estar implicado en la adhesión a células epiteliales. Por otro lado, el incremento de adhesión observado en presencia de BtL podría indicar una interacción doble con bacterias y células A549.

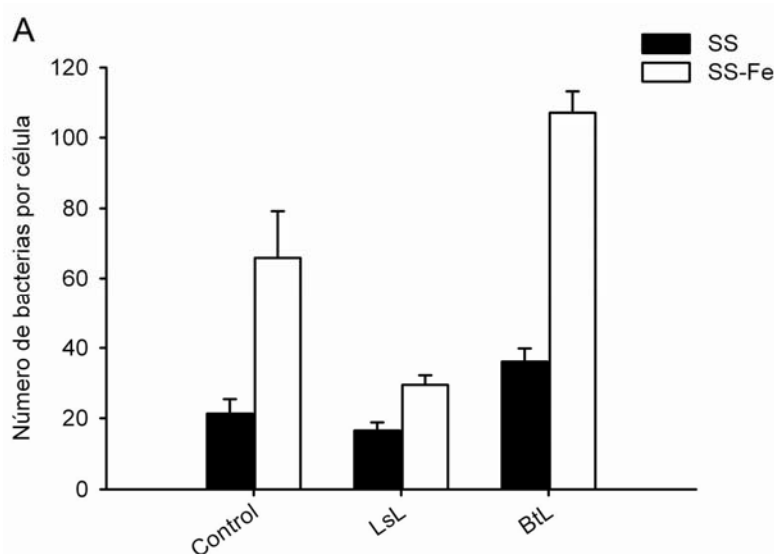
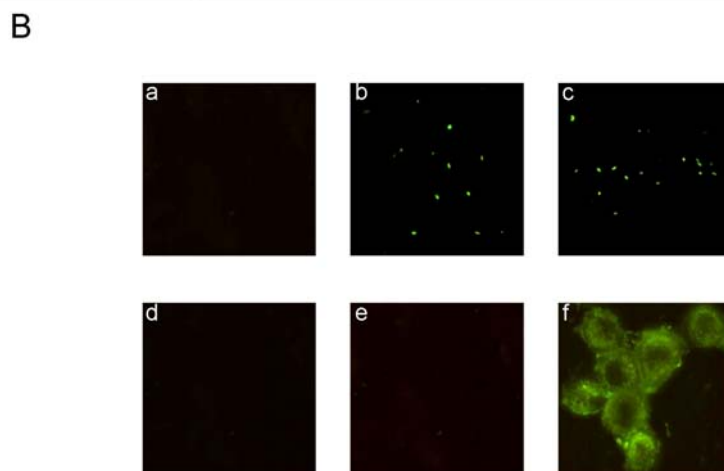


Fig. 3 Efecto de la presencia de lectinas en la adhesión de *B. pertussis* a células A549.

(A) Adhesión de bacterias virulentas cultivadas en medio con exceso de hierro (SS) o medio libre de hierro (SS-Fe) a células epitelio-alveolares A549 (R,b/c 100) en ausencia o presencia de LsL ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$), o BtL ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$). Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes. (B) Unión de BtL y LsL a *B. pertussis* y células A549. 15 μL de suspensión de bacterias (aprox. 3×10^7 bacteria ml^{-1}) fueron colocadas en un portaobjetos, secadas, fijadas con metanol, e incubadas con a) PBS (control), b) FITC-LsL, o c) FITC-BtL. Células A549 cultivadas sobre un cubreobjetos circular de vidrio, secadas, fijadas con metanol, e incubadas con d) PBS (control), e) FITC-LsL, o f) FITC-BtL. Se empleó un microscopio fluorescente Leica DMLB (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) con objetivo $\times 100/1.25$ bajo aceite de inmersión. Se muestran paneles representativos de uno de cuatro experimentos independientes.



Para caracterizar mejor esta interacción, se realizaron ensayos de inhibición empleando dos clases de ligandos conocidos de BtL, esto es carbohidratos simples y complejos. La presencia simultánea de BtL y D-manosa, el único carbohidrato simple que se sabe interactúa con esta lectina, no modificó los valores de adhesión observados en presencia

de BtL (**Fig. 4**). Sin embargo, la presencia de mucina, un carbohidrato complejo ligando de BtL, no solo suprimió el incremento de adhesión mediado por BtL sino que también provocó un nivel de adhesión menor que su respectivo control (**Fig. 4**). Estos resultados parecen consistentes con un efecto inhibitorio de mucina en la interacción de BtL con células A549 o con bacterias, o bien en la interacción de bacterias con células A549.

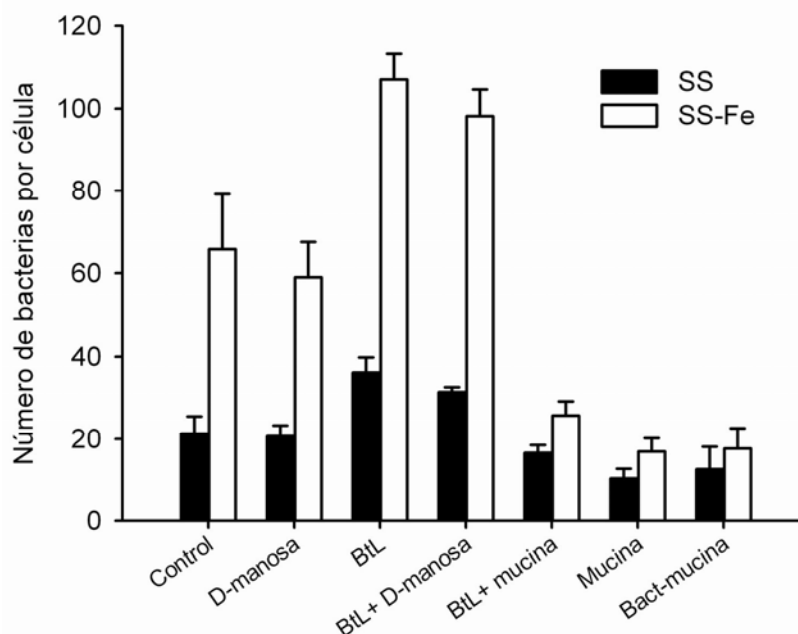


Fig. 4 El incremento de adhesión a células A549 observado en *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro involucra interacciones de tipo carbohidratos. Adhesión de bacterias virulentas cultivadas en medio con exceso de hierro (SS) o medio libre de hierro (SS-Fe) a células epiteliales humanas A549 (R_{b/c} 100) en ausencia o presencia de D-manosa (500 µg ml⁻¹), BtL (500 µg ml⁻¹), BtL y D-manosa (BtL + D-manosa) (500 µg ml⁻¹ de cada una); BtL y mucina (BtL + mucin) (500 µg ml⁻¹ de cada una); mucina (mucin) (500 µg ml⁻¹). Paralelamente, bacterias virulentas cultivadas en medio SS o SS-Fe fueron incubadas con mucina (500 µg ml⁻¹), y posteriormente lavadas previo a la incubación con células A549 (R_{b/c} 100) (Bact-mucin). Los datos representan la media ± DE de 3 experimentos independientes.

Dado que la unión de *B. pertussis* a mucina ha sido previamente descrita [4], se investigó si el incremento de adhesión a células A549 observado en bacterias sometidas a limitación de hierro se asocia con un incremento en la capacidad de unión a mucina. La incubación de *B. pertussis* con mucina previo a la incubación con células A549 disminuyó la adhesión bacteriana, independientemente de la condición de cultivo evaluada (**Fig. 4**). Sin embargo, la magnitud de la disminución observada fue mayor en bacterias cultivadas en limitación de hierro suprimiendo incluso el incremento de adhesión observado inicialmente en esta condición de cultivo. Según se observa en la **Figura 5A**, la presencia de mucina inhibió la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales en forma dosis dependiente. La curva de inhibición para bacterias sometidas a limitación de hierro mostró una pendiente más pronunciada sugiriendo que estas bacterias son más sensibles a los efectos inhibitorios de mucina. La mayor actividad de unión a mucina de *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro fue confirmada por ensayos de adhesión bacteriana a placas de microtitulación recubiertas con mucina (**Fig.**

5B). En conjunto, estos resultados indican que la limitación en hierro induce un fenotipo cuya capacidad para interactuar con mucina y con células epiteliales respiratorias se incrementa, posiblemente a través de un mecanismo similar. Cabe señalar que las células A549 forman mucus en cultivos *in vitro* [8].

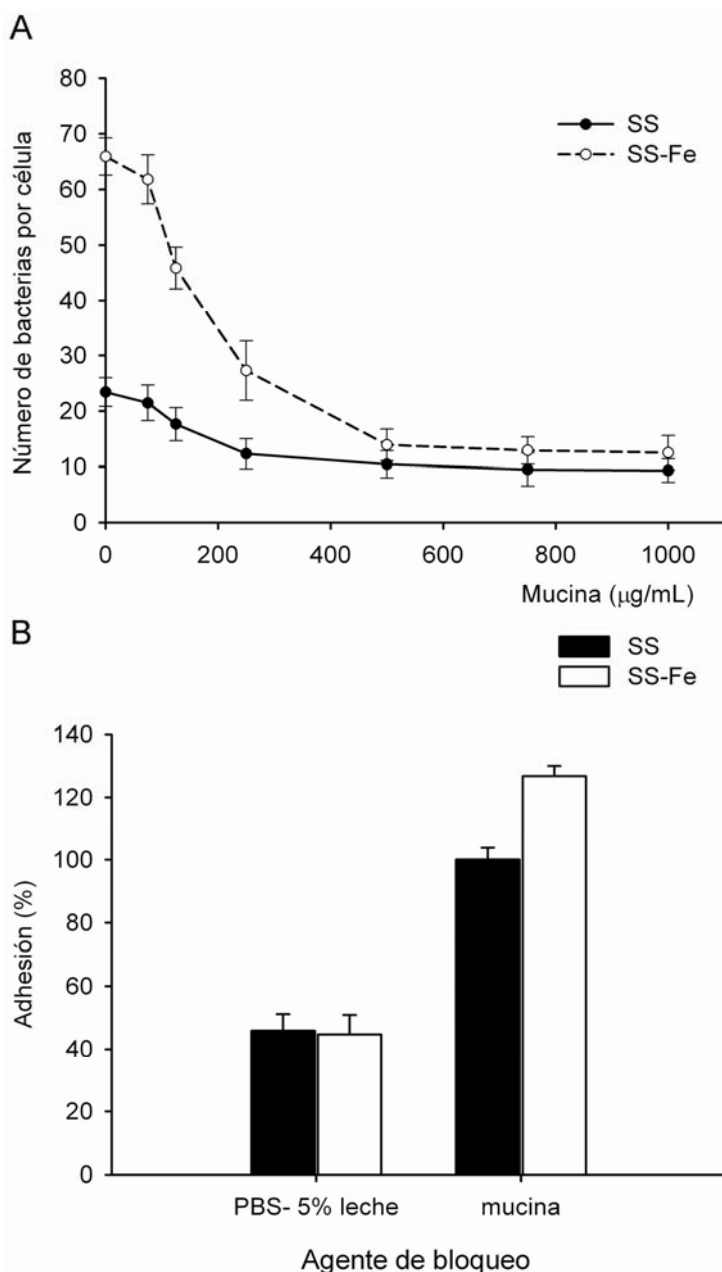


Fig. 5 La limitación en hierro incrementa la actividad de unión a mucina de *B. pertussis*. (A) Adhesión de bacterias virulentas cultivadas en medio con exceso de hierro (SS) o medio libre de hierro (SS-Fe) a células epiteliales respiratorias A549 (R_b/c 100) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de mucina (0-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). (B) Unión de bacterias virulentas cultivadas en medio con exceso de hierro (SS) o medio libre de hierro (SS-Fe) a placas recubiertas con mucina. Se sustrajo el ruido de la señal de fluorescencia en los pocillos solo recubiertos con mucina y PBS- 5 % leche descremada. La señal de fluorescencia debido a la adhesión de bacterias cultivadas en medio con exceso de hierro (SS) se fijó como 100 % de adhesión. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes.

Se ha encontrado que la unión a mucina de *B. pertussis* involucra residuos de ácido siálico presentes en glicoproteínas [4]. Para evaluar si la mayor capacidad de adhesión de bacterias sometidas a limitación de hierro depende de la presencia de glicoproteínas con residuos de ácido siálico, realizamos ensayos de adhesión en presencia de concentraciones crecientes de ácido siálico. Como se puede observar en la **Figura 6**, la

presencia de ácido siálico tuvo un efecto similar al de mucina en la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales.

En conjunto estos resultados indican que la limitación de hierro, la cual se asemeja a las condiciones que *B. pertussis* enfrenta *in vivo*, incrementa la capacidad de unión a mucina y facilita la adhesión a células epiteliales. La limitación en hierro también induce la expresión de proteínas de unión a mucina en otros patógenos respiratorios, como *Pseudomonas aeruginosa*, lo cual es un factor crucial en el proceso infeccioso de este microorganismo [26]. El mucus que se produce en el tracto respiratorio representa un desafío para las bacterias patógenas que intentan establecer una infección. Se ha demostrado previamente que la infección de *B. pertussis* induce la producción de mucina en células del hospedador [4, 16]. La mayoría de los factores de virulencia contribuyen a la producción de mucus denso durante la infección. Por lo tanto, la capacidad de unión a mucina de *B. pertussis* ha sido propuesta como un mecanismo de defensa [4]. Nuestros resultados parecen confirmar esta hipótesis, dado que condiciones fisiológicas como la limitación de hierro induce un fenotipo bacteriano caracterizado por una incrementada capacidad de unión a mucina y una mayor adhesión a células epiteliales.

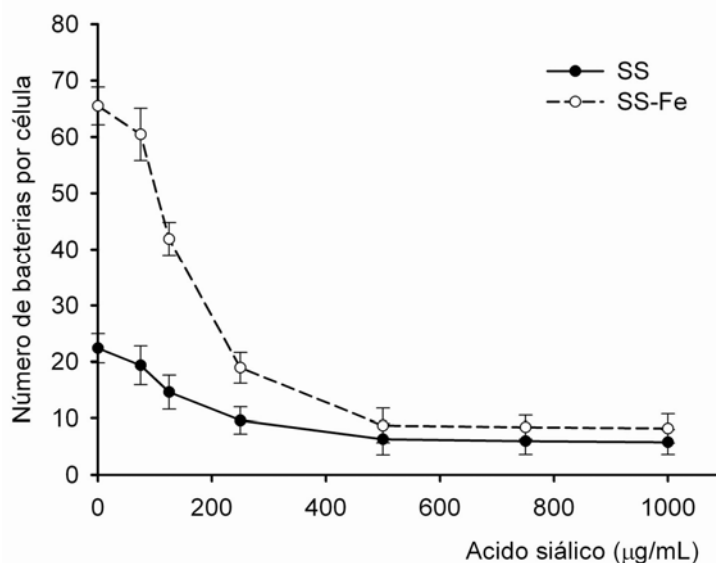


Fig. 6 La adhesión de *B. pertussis* a células A549 es inhibida por ácido siálico. Adhesión de bacterias virulentas cultivadas en medio con exceso de hierro (SS) o medio libre de hierro (SS-Fe) a células epitelio-alveolares A549 (R_b/c 100) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de ácido siálico (0-1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes.

Para determinar si las proteínas de membrana externa inducidas en limitación de hierro son inmunogénicas *in vivo* y capaces de generar anticuerpos eventualmente protectores, se evaluó la adhesión de bacterias cultivadas en medios con exceso de hierro o libre de hierro en presencia de sueros de individuos infectados con *B. pertussis* o sueros de individuos que han sido vacunados con la vacuna celular. Los pools de sueros

empleados poseen un título similar de anticuerpos específicos contra *Bordetella*, según se determinó por ELISA (1300 y 1340 respectivamente). Sin embargo, el análisis por western blot de fracción enriquecida en proteínas de membrana externa mostró que los sueros de individuos vacunados e infectados poseen anticuerpos con diferentes especificidades (**Fig. 7**).

Para evaluar la relevancia de la presencia de estos anticuerpos en la interacción de *B. pertussis* con células epiteliales se realizaron ensayos de adhesión en presencia de sueros de individuos infectados con *B. pertussis* y sueros de individuos vacunados con vacuna celular (bacterias inactivadas por calor cultivadas en exceso de hierro). La diferencia de especificidad observada por inmunodetección se comprobó también en la actividad biológica de estos anticuerpos. Los resultados que se detallan en la **Tabla 1** muestran que la presencia de sueros de individuos infectados con *B. pertussis* disminuye la adhesión de bacterias cultivadas en limitación de hierro en una proporción de 94 %, mientras que los mismos sueros solo disminuyen la adhesión de bacteria cultivadas en exceso de hierro en una proporción de 66 %. Por otra parte, la presencia de sueros de individuos vacunados, los cuales se espera carezcan de anticuerpos específicos para las proteínas inducidas en limitación de hierro, disminuye la adhesión de bacterias cultivadas en exceso o limitación de hierro en una proporción similar (60 y 70 %, respectivamente). Cabe destacar que cualquiera sea la condición de cultivo evaluada, la presencia de suero no inmune no modificó la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales. Estos resultados indican que los anticuerpos presentes en el suero de individuos infectados son capaces de reconocer proteínas presentes en el fenotipo inducido en condiciones fisiológicas e interferir, mediante el bloqueo de este tipo de proteínas, con la adhesión a células epiteliales.

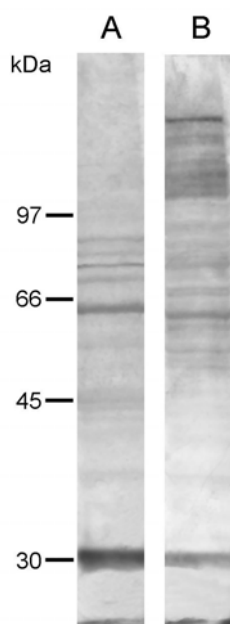


Fig. 7 Análisis por Western blot de fracción enriquecida en proteínas de membrana externa de *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro. Muestras de fracción enriquecida en proteínas de membrana externa obtenidas de bacterias cultivadas en medio libre de hierro (SS-Fe) fueron separadas mediante SDS-PAGE, transferidas a membranas de PVDF, y luego incubadas con un pool de sueros de individuos vacunados (**A**) o infectados (**B**) con *B. pertussis*. Los marcadores de peso molecular (kDa) se indican sobre el margen izquierdo de la figura.

Tabla 1. Efecto de suero de individuos infectados o vacunados en la adhesión de *B. pertussis* cultivada en diferentes condiciones de disponibilidad de hierro a células epiteliales A549.

Medio de cultivo / Tratamiento	Adhesión (bacterias por célula) \pm DE
SS	19.5 \pm 1.39
SS / suero no-inmune ^a	20.3 \pm 2.03
SS / suero vacunados ^b	8.3 \pm 1.14
SS / suero infectados ^c	6.7 \pm 0.47
SS-Fe	65.1 \pm 1.7
SS-Fe / suero no-inmune ^a	67.2 \pm 1.1
SS-Fe / suero vacunados ^b	19.5 \pm 3.24
SS-Fe / suero infectados ^c	4.07 \pm 0.64

^a Ensayo de adhesión realizado en presencia de 2.5 % v v⁻¹ de suero no inmune.

^b Ensayo de adhesión realizado en presencia de 2.5 % v v⁻¹ de un pool de sueros de donantes vacunados contra *B. pertussis*.

^c Ensayo de adhesión realizado en presencia de 2.5 % v v⁻¹ de un pool de sueros de donantes infectados con *B. pertussis*.

Los valores representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes.

4.4 CONCLUSIONES.

El estudio de fenotipos inducidos por condiciones del entorno que el microorganismo invasor debe enfrentar dentro del hospedador puede ayudar a comprender los mecanismos de patogénesis y a identificar estructuras o proteínas que deben ser bloqueadas para impedir el desarrollo de la infección. Estudios recientes indican que la limitación de hierro, uno de los estímulos *in vivo* más importantes, induce en diversos microorganismos patógenos fenotipos con mayor virulencia. Los resultados presentados en este capítulo indican que la limitación en hierro incrementa la capacidad de adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales. Según se pudo demostrar, este incremento no se relaciona con una mayor expresión de la principal adhesina de *B. pertussis* FHA, sino con la expresión de estructuras de tipo proteico que facilitan la unión a mucina y la adhesión a células epiteliales a través de un mecanismo dependiente de la presencia de ácido siálico. Las proteínas de membrana externa inducidas por limitación en hierro pueden representar factores de virulencia importantes, y según los resultados de este capítulo, algunas de ellas son inmunogénicas *in vivo*. Los anticuerpos inducidos contra dichas proteínas, es decir aquellos anticuerpos presentes en suero de individuos infectados, interfieren en mayor proporción con la adhesión a células epiteliales de bacterias cultivadas limitación de hierro respecto a bacterias cultivadas en exceso de hierro. Esto indica que las proteínas inducidas en limitación en hierro son capaces de generar anticuerpos con la capacidad de reconocer estructuras presentes en el fenotipo infectante y bloquear su adhesión a células epiteliales. La identificación de estas proteínas puede eventualmente ayudar al desarrollo de nuevas vacunas las cuales resulten más efectivas en evitar la colonización.

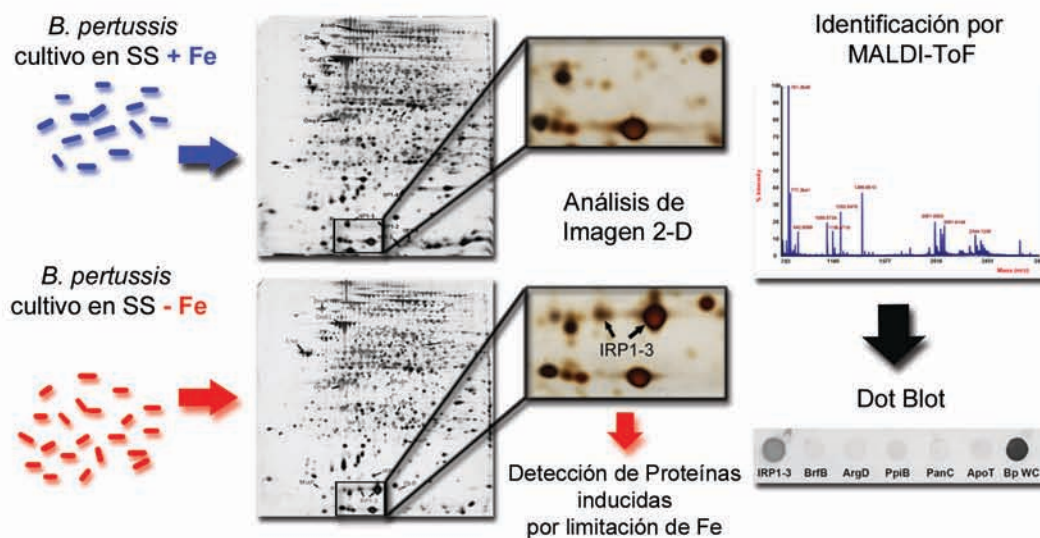
4.5 REFERENCIAS.

- [1] Agiato L.A., Dyer D.W. Siderophore production and membrane alterations by *Bordetella pertussis* in response to iron starvation. *Infect Immun* 1992. 60 (1): 117-23.
- [2] Alencar N.M., Cavalcante C.F., Vasconcelos M.P., Leite K.B., Aragao K.S., Assreuy A.M., et al. Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J Pharm Pharmacol*. 2005. 57 (7): 919-22.
- [3] Barbosa T., Arruda S., Cavada B., Grangeiro T.B., de Freitas L.A., Barral-Netto M. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001. 96 (5): 673-8.
- [4] Belcher C.E., Drenkow J., Kehoe B., Gingeras T.R., McNamara N., Lemjabbar H., et al. The transcriptional responses of respiratory epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000. 97 (25): 13847-52.
- [5] Berbers G.A., Lafeber A.B., Labadie B., Vermeer-de Bondt P.E., Bolscher D.J.A., Plantinga A.D. A randomized controlled study with whole-cell or acellular pertussis vaccines in combination with regular DT-IPV vaccine and a new poliomyelitis (IPV-Vero) component in children 4 years of age in the Netherlands: National Institute of Public Health and the Environment, The Netherlands; 1999. Report No.: 105000001.
- [6] Brickman T.J., Armstrong S.K. Essential role of the iron-regulated outer membrane receptor FauA in alcaligin siderophore-mediated iron uptake in *Bordetella* species. *J Bacteriol*. 1999. 181 (19): 5958-66.
- [7] Brickman T.J., Vanderpool C.K., Armstrong S.K. Heme transport contributes to in vivo fitness of *Bordetella pertussis* during primary infection in mice. *Infect Immun*. 2006. 74 (3): 1741-4.
- [8] Carterson A.J., Honer zu Bentrup K., Ott C.M., Clarke M.S., Pierson D.L., Vanderburg C.R., et al. A549 lung epithelial cells grown as three-dimensional aggregates: alternative tissue culture model for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun*. 2005. 73 (2): 1129-40.
- [9] Dam T.K., Cavada B.S., Grangeiro T.B., Santos C.F., de Sousa F.A., Oscarson S., et al. Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. *J Biol Chem*. 1998. 273 (20): 12082-8.
- [10] Goringe A.R., Woods G., Robinson A. Growth and siderophore production by *Bordetella pertussis* under iron-restricted conditions. *FEMS Microbiol Lett*. 1990. 66: 101-6.
- [11] Guerinot M.L. Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol*. 1994. 48: 743-72.
- [12] Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. 227 (5259): 680-5.
- [13] Lieber M., Smith B., Szakal A., Nelson-Rees W., Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer*. 1976. 17 (1): 62-70.
- [14] Litwin C.M., Calderwood S.B. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev*. 1993. 6 (2): 137-49.
- [15] Locht C., Geoffroy M.C., Renaud G. Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the papC and papD gene families. *EMBO J*. 1992. 11 (9): 3175-83.

- [16] McNamara N., Basbaum C. Signaling networks controlling mucin production in response to Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Glycoconj J.* 2001. 18 (9): 715-22.
- [17] Molloy M.P., Herbert B.R., Slade M.B., Rabilloud T., Nouwens A.S., Williams K.L., et al. Proteomic analysis of the Escherichia coli outer membrane. *Eur J Biochem.* 2000. 267 (10): 2871-81.
- [18] Moreira L.O., Andrade A.F., Vale M.D., Souza S.M., Hirata R., Jr., Asad L.M., et al. Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of Corynebacterium diphtheriae strains. *Appl Environ Microbiol.* 2003. 69 (10): 5907-13.
- [19] Nagel J., de Graaf S., Schijf-Evers D. Improved serodiagnosis of whooping cough caused by Bordetella pertussis by determination of IgG anti-LPF antibody levels. *Dev Biol Stand.* 1985. 61: 325-30.
- [20] Neves S.A., as-Baruff M., Freitas A.L., Roque-Barreira M.C. Neutrophil migration induced in vivo and in vitro by marine algal lectins. *Inflamm Res.* 2001. 50 (10): 486-90.
- [21] Nicholson M.L., Beall B. Disruption of tonB in Bordetella bronchiseptica and Bordetella pertussis prevents utilization of ferric siderophores, haemin and haemoglobin as iron sources. *Microbiology.* 1999. 145: 2453-61.
- [22] Poolman J.T., Kuipers B., Vogel M.L., Hamstra H.J., Nagel J. Description of a hybridoma bank towards Bordetella pertussis toxin and surface antigens. *Microb Pathog.* 1990. 8 (6): 377-82.
- [23] Redhead K., Hill T., Chart H. Interaction of lactoferrin and transferrins with the outer membrane of Bordetella pertussis. *J Gen Microbiol.* 1987. 133 (4): 891-8.
- [24] Redhead K., Hill T. Acquisition of iron from transferrin by Bordetella pertussis. *FEMS Microbiol Lett.* 1991. 61 (2-3): 303-7.
- [25] Rodriguez M.E., Hellwig S.M., Perez Vidakovics M.L., Berbers G.A., van de Winkel J.G. Bordetella pertussis attachment to respiratory epithelial cells can be impaired by fimbriae-specific antibodies. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006. 46 (1): 39-47.
- [26] Scharfman A., Kroczyński H., Carnoy C., Van B.E., Lamblin G., Ramphal R., et al. Adhesion of Pseudomonas aeruginosa to respiratory mucins and expression of mucin-binding proteins are increased by limiting iron during growth. *Infect Immun.* 1996. 64 (12): 5417-20.
- [27] Schwyn B., Neilands J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem.* 1987. 160 (1): 47-56.
- [28] Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology.* 1992. 24: 145-9.
- [29] Weingart C.L., Broitman-Maduro G., Dean G., Newman S., Pepler M., Weiss A.A. Fluorescent labels influence phagocytosis of Bordetella pertussis by human neutrophils. *Infect Immun.* 1999. 67 (8): 4264-7.
- [30] West S.E., Sparling P.F. Aerobactin utilization by Neisseria gonorrhoeae and cloning of a genomic DNA fragment that complements Escherichia coli fhuB mutations. *J Bacteriol.* 1987. 169 (8): 3414-21.

CAPITULO 5

PROTEÓMICA COMPARATIVA E INMUNOPROTEÓMICA APLICADAS A LA BÚSQUEDA DE FACTORES DE VIRULENCIA E INMUNÓGENOS EXPRESADOS *IN VIVO*.



5. PROTEÓMICA COMPARATIVA E INMUNOPROTEÓMICA APLICADAS A LA BÚSQUEDA DE FACTORES DE VIRULENCIA E INMUNÓGENOS EXPRESADOS <i>IN VIVO</i> .	104
<hr/>	
5.1 INTRODUCCIÓN.	104
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.	106
5.2.1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.	106
5.2.2. CONDICIONES DE CULTIVO DE LÍNEA CELULAR A549.	106
5.2.3. DETECCIÓN DE SIDERÓFOROS.	106
5.2.4. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE <i>B. PERTUSSIS</i> .	107
5.2.5. OBTENCIÓN DE FRACCIÓN ENRIQUECIDA EN PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE <i>B. PERTUSSIS</i> .	107
5.2.6. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2-DE).	108
5.2.7. ANÁLISIS DE IMAGEN DE GELES 2-DE.	109
5.2.8. EXTRACCIÓN Y DIGESTIÓN TRÍPTICA DE PÉPTIDOS.	109
5.2.9. ESPECTROMETRÍA DE MASA POR DESORCIÓN/IONIZACIÓN MEDIANTE LÁSER ASISTIDA POR MATRIZ (MALDI).	110
5.2.10. BÚSQUEDA EN BANCO DE DATOS PARA IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS.	110
5.2.11. ENSAYO DE INMUNODETECCIÓN (DOT BLOT).	111
5.2.12. OBTENCIÓN DE SUEROS.	111
5.2.13. ELISA.	112
5.2.14. ENSAYO DE AGLUTINACIÓN.	112
5.2.15. ENSAYO DE OPSONIZACIÓN.	112
5.2.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	113
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	114
5.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES REQUERIDAS PARA EL ANÁLISIS 2-DE DE PROTEÍNAS TOTALES Y DE FRACCIÓN ENRIQUECIDA EN PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE <i>B. PERTUSSIS</i> .	114
5.3.1.1. Tipo de Equipo de isoelectroenfoque (IEF).	114
5.3.1.2. Gradiente de pH en geles IPG y porcentaje de acrilamida en geles SDS-PAGE.	115
5.3.1.3. Buffers y Protocolos de solubilización.	115
5.3.1.4. Método de carga de la muestra en el IPG.	117
5.3.1.5. Tipo de Protocolo de IEF.	118
5.3.2. ANÁLISIS COMPARATIVO DEL PROTEOMA DE PROTEÍNAS TOTALES DE <i>B. PERTUSSIS</i> CULTIVADA EN CONDICIONES DE DIFERENTE DISPONIBILIDAD DE HIERRO.	119
5.3.3. ANÁLISIS COMPARATIVO DEL PROTEOMA DE FRACCIÓN ENRIQUECIDA EN PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE <i>B. PERTUSSIS</i> CULTIVADA EN CONDICIONES DE DIFERENTE DISPONIBILIDAD DE HIERRO.	129
5.3.4. ANÁLISIS SEROLÓGICO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA INDUCIDAS POR LIMITACIÓN DE HIERRO.	136
5.3.5. CAPACIDAD ANTIGÉNICA DE LAS PROTEÍNAS IRP1-3 Y AFUA.	137
5.3.6. ANTICUERPOS ANTI-IRP1-3 Y ANTI-AFUA RECONOCEN ESTRUCTURAS DE SUPERFICIE EN <i>B. PERTUSSIS</i> .	138
5.3.7. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ANTICUERPOS INDUCIDOS CONTRA IRP1-3 Y AFUA.	139
5.3.7.1. Actividad Aglutinante de los sueros anti-IRP1-3 y anti-AfuA.	139
5.3.7.2. Actividad Opsonizante de los sueros Anti-IRP1-3 y anti-AfuA.	139
5.4 CONCLUSIONES.	141
5.5 REFERENCIAS.	142

5. PROTEÓMICA COMPARATIVA E INMUNOPROTEÓMICA APLICADAS A LA BÚSQUEDA DE FACTORES DE VIRULENCIA E INMUNÓGENOS EXPRESADOS *IN VIVO*.

5.1 INTRODUCCIÓN.

Los resultados presentados en el Capítulo 4 indican que la limitación en hierro induce en *B. pertussis* la expresión de proteínas de superficie que favorecen la interacción con células epiteliales y proteínas inmunogénicas *in vivo*, es decir reconocidas diferencialmente por anticuerpos inducidos por infección. Dado que *B. pertussis* es un patógeno estrictamente humano que se transmite de hospedador a hospedador, es muy probable que la bacteria exprese estas proteínas incluso durante los estadios tempranos de colonización. La identificación y caracterización de estas proteínas puede representar un avance significativo en la búsqueda de nuevos inmunógenos protectores, ya que anticuerpos generados contra dichas proteínas reconocerían, eventualmente, estructuras de superficie presentes en la bacteria infectante. Cabe destacar que, como ya se mencionó, ninguna de estas proteínas está incluida en las vacunas actuales. Esto se debe a que tanto las células que se utilizan para la formulación de vacuna celular como los antígenos presentes en las vacunas acelulares provienen de cultivos bacterianos en medios con exceso de hierro.

Diferentes metodologías han sido implementadas para el estudio del fenotipo de *B. pertussis* inducido por limitación de hierro. Varios grupos han analizado la expresión de proteínas de membrana externa (PME) reguladas por hierro mediante SDS-PAGE. En estos estudios se encontraron diferentes patrones de expresión; algunas de estas proteínas han sido involucradas en la captura de hierro pero muchas otras no han sido identificadas o se desconoce su función [1, 32, 45, 47]. Menozzi *et al.* [32] realizaron la identificación y purificación de proteínas de unión a transferrina y lactoferrina mediante el uso de cromatografías de afinidad. Los genes que codifican posibles receptores de sideróforos (*bfrD* y *bfrE*) fueron identificados mediante técnicas de biología molecular como la inactivación sistemática de genes [2]. En otros estudios, la búsqueda en una biblioteca de mutantes que expresan proteínas de fusión dependientes de Fe, permitió la identificación de BfeA y BhuR, los receptores de enterobactina y hemo, respectivamente [3, 29].

La reciente secuenciación completa del genoma de *B. pertussis* cepa Tohama (4.09 Mb; 3816 genes) y las anotaciones funcionales de los correspondientes genes realizada por un grupo del Instituto Sanger (UK) [44] en combinación con la rápida identificación de proteínas mediante espectrometría de masa (MS) por desorción-ionización de matriz asistida por láser (MALDI) ofrece la oportunidad de estudiar la expresión del genoma

de este microorganismo en respuesta a un estímulo determinado, es decir, el proteoma inducido en esa condición en forma más integral.

En este capítulo, examinamos los cambios del proteoma de *B. pertussis* en respuesta a la limitación de hierro. Mediante la aplicación de esta metodología se intentó avanzar en la caracterización del fenotipo infectante e identificar factores de virulencia inducidos en condiciones fisiológicas y antígenos propios de este fenotipo capaces de inducir una respuesta inmune protectora.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

5.2.1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

B. pertussis cepa Tohama se cultivó en placas de ABGs durante 72 hs a 37 °C. Este cultivo se repicó en una nueva placa ABGs y se cultivó a 37 °C durante 24 hs. Del cultivo en medio sólido se extrajo un inóculo para el cultivo en medio líquido SS a una densidad celular inicial equivalente a 0.2 Abs_{650 nm} (30 hs, 37 °C, 160 r.p.m). Estas bacterias fueron recuperadas por centrifugación (10000 × g, 15 min), lavadas con una solución salina estéril libre de hierro, y diluidas a una concentración estimada de 2 × 10⁸ UFC ml⁻¹. Volúmenes iguales de suspensión bacteriana fueron utilizados para inocular 100 ml de medio SS (SS, 36 μM hierro) y medio SS libre de hierro (SS-Fe, sin el agregado de FeSO₄·7H₂O). Dichas inóculos bacterianos fueron cultivados a 37 °C en agitación (160 r.p.m) durante 20 hs, y luego repicados (dos veces) en los respectivos medios de cultivo. Cuando los cultivos alcanzaron el estado exponencial tardío, las células fueron cosechadas por centrifugación (10000 × g 15 min a 4 °C) y conservadas a -80 °C hasta su utilización.

El medio SS libre de hierro (SS-Fe) fue preparado empleando tubos de polipropileno estériles (Falcon; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) o recipientes de vidrio lavados secuencialmente con una solución de ácido nítrico (3M) y H₂O bidestilada para remover posibles trazas de hierro adheridas a la superficie. Toda el H₂O empleada para la preparación de medio libre de hierro fue deionizada. El medio SS libre de hierro fue finalmente tratado con una resina de intercambio catiónico Chelex 100 (Bio-Rad, Hercules, Calif., USA) según West & Sparling [60].

5.2.2. CONDICIONES DE CULTIVO DE LÍNEA CELULAR A549.

Como modelo de infección se utilizó la línea celular epitelial humana tipo II A549 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) [31]. Las células A549 fueron cultivadas según se detalla en el Capítulo 2. Cuando el cultivo alcanzó un 80 % de confluencia, las células fueron removidas con tripsina (0.25 % v v⁻¹)-EDTA (0.1 % p v⁻¹) (KuraboCo., Ltd., Osaka, Japón) y cultivadas en placas de 24 pocillos. El estado del cultivo se testeó por observación microscópica y recuento de células viables por exclusión mediante tinción con *Trypan blue* en pocillos elegidos al azar.

5.2.3. DETECCIÓN DE SIDERÓFOROS.

La presencia de sideróforos en el sobrenadante del medio de cultivo de *B. pertussis* cultivada en medio SS libre de hierro se determinó para confirmar la limitación de hierro del cultivo. Brevemente, muestras de cultivos de *B. pertussis* en medio SS-Fe y

SS (empleado como control negativo) fueron centrifugadas para remover las células. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de nylon de tamaño de poro 0.22 μm (Nalgene Co., Rochester, N. Y.) y se le adicionó a un volumen equivalente de solución de cromo azurol S (ensayo CAS) según se describe en Schwyn & Neilands [52]. El cambio de color de azul a rosado indica la presencia de sideróforos.

5.2.4. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE *B. PERTUSSIS*.

Para la obtención de proteínas totales de *B. pertussis*, se realizaron cultivos por triplicado en medio líquido SS y SS-Fe. Brevemente, las células provenientes de 25 ml de cultivo fueron colectadas por centrifugación a $10000 \times g$ durante 15 min, lavadas (dos veces) con H_2O bidestilada y resuspendidas en 500 μl de solución 50 mM Tris/HCl (pH 7.5) suplementada con inhibidor de proteasas *Phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF) 5mM (solución fresca). La suspensión celular fue disgregada por sonicación empleando 3 pulsos de 5 min cada uno en frío a 80 % de potencia utilizando el equipo Soniprep 150 (Sanyo). Las proteínas fueron solubilizadas durante 1 h en 1.5 ml de buffer de electroforesis bidimensional (2-DE) [7 M urea, 2 M tiourea, 2 % p v⁻¹ Triton X-100, 65 mM ditiotreitól (DTT), 0.5 % v v⁻¹ *Pharmalyte* pH 4-7 o pH 6-11 (Amersham Biosciences), 1 mM PMSF, 4 mM 4-(2-Aminoethyl)-Benzenesulfonyl Fluoride (AEBSF), y 0.002 % p v⁻¹ azul de bromofenol] y centrifugadas a $8000 \times g$ durante 10 min. La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó empleando el ensayo Ettan 2-D Quant Kit (Amersham Biosciences).

5.2.5. OBTENCIÓN DE FRACCIÓN ENRIQUECIDA EN PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *B. PERTUSSIS*.

Las fracciones enriquecidas en proteínas de membrana externa de *B. pertussis* cultivada en medio SS y SS-Fe se obtuvieron según describen Molloy *et al.* [36]. Brevemente, las bacterias fueron fragmentadas utilizando una prensa Francesa (*Aminco French press*, dos ciclos de 14000 psi). Las células no fragmentadas fueron removidas por centrifugación a $8000 \times g$ durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante equivalente a 20 mg de proteína total fue diluido con una solución fría (-20 °C) de carbonato de sodio (0.1 M, pH 11) a un volumen final de 60 ml y agitado suavemente en cámara de hielo durante 1 h. Las muestras tratadas con carbonato de sodio fueron sometidas a ultracentrifugación ($115000 \times g$) durante 1 h a 4 °C empleando un rotor Beckman 55.2 Ti. Se descartó el sobrenadante y el pellet (fracción enriquecida en proteínas de membrana externa) se resuspendió en 2 ml de una solución 50 mM Tris/HCl, pH 7.5. La fracción se recuperó mediante centrifugación, se solubilizó durante 1 h en 1 ml de buffer 2-DE + TFE [5 M urea, 2 M tiourea, 50 % v v⁻¹ 2,2,2-Trifluoroethanol (TFE, 99.0 %, Fluka, Buchs, Switzerland), 2 % p v⁻¹ Triton X-100, 65 mM DTT, 0.5 % v v⁻¹

Pharmalyte pH 4-7 o pH 6-11 (Amersham Biosciences), 1 mM PMSF, 4 mM AEBSF, y 0.002 % p v⁻¹ azul de bromofenol] con agitación periódica, y luego se centrifugó a 8000 × g durante 10 min. La concentración de proteínas se determinó empleando el ensayo Ettan 2-D Quant Kit (Amersham Biosciences).

5.2.6. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2-DE).

La separación de proteínas en primera dimensión se realizó mediante isoelectroenfoque (IEF). Para realizar el IEF, se emplearon geles con un gradiente de pH inmovilizado (IPG, *immobilized pH gradient*). En los geles IPG, el gradiente de pH es generado por inmovilinas co-polimerizadas con la matriz de acrilamida. En este estudio, se utilizaron geles IPG (Immobiline DryStrips, Amersham Biosciences, Uppsala Sweden) de 18 cm y rango de pH 3-10, 4-7 o 6-11. Las muestras proteicas fueron mezcladas con buffer 2-DE o buffer 2-DE + TFE (en ambos casos preparado antes de usar) a una concentración final de proteínas de 300 µg en 350 µl. Las proteínas solubilizadas se aplicaron en IPG pH 4-7 y pH 3-10 por el método de carga “*in-gel rehydration*” según describen Sanchez *et al.* [51]. Para el IEF se utilizó el equipo Multiphor II (Amersham Biosciences) empleando el siguiente protocolo: 500 V durante 0.01 h (1 Vh), 3500 V durante 1.30 h (en gradiente, 3000 Vh), 3500 V durante 5.40 h (20 kVh), resultando un voltaje total de 23 kVh. Los IPG alcalinos (pH 6-11) fueron rehidratados (350 µl de buffer 2-DE o buffer 2-DE + TFE) a temperatura ambiente durante toda la noche utilizando el soporte *reswelling tray*. Posteriormente, las proteínas solubilizadas (300 µg en 300 µl) se aplicaron empleando el método de carga “*paper bridge loading*” previamente detallado por Sabounchi-Schutt *et al.* [50]. Para el IEF se utilizó el equipo Multiphor II (Amersham Biosciences) empleando el siguiente protocolo: 150 V durante 1 h (75 Vh), 300 V durante 2 h (en gradiente, 300 Vh), 600 V durante 1 h (300 Vh), 3500 V durante 10 h (17.5 Vh) resultando un voltaje total de 19 kVh. Finalizado el IEF, se realizó inmediatamente la segunda dimensión de cada IPG o los mismos fueron conservados a -80 °C hasta su uso. Previo a la segunda dimensión, los IPG fueron incubados durante 15 min en 10 ml de buffer de equilibrio [50 mM Tris-Cl pH 8.8, 6 M urea, 30 % v v⁻¹ glicerol, 2 % p v⁻¹ SDS, 20 mM DTT y 0.002 % p v⁻¹ azul de bromofenol] seguida de una incubación durante 15 min en el mismo buffer pero reemplazando DTT por 20 mM de iodoacetamida. Luego de los pasos de reducción/alquilación descriptos, los IPG fueron colocados en el extremo superior de un gel 10 % SDS-PAGE y sellados con 0.5 % de agarosa en buffer de electroforesis. La electroforesis se realizó a amperaje constante (25 mAmp por gel) a 20 °C hasta que el frente del colorante alcanzó el extremo inferior del gel, utilizando una cuba de electroforesis PROTEAN® II xi 2-D (Bio-rad, Hercules, CA, USA) conectada a un intercambiador de calor Multitemp II (GE Healthcare). Las proteínas fueron

visualizadas por tinción con plata [6] para el análisis de imágenes y alternativamente por tinción con Coomassie blue [19] para la recuperación de spots destinados a digestión trípica e identificación por MALDI-ToF-MS.

5.2.7. ANÁLISIS DE IMAGEN DE GELES 2-DE.

Los geles 2-DE teñidos con plata fueron documentados empleando un scanner Umax PowerLook II, y el análisis de imagen se realizó empleando el software ImageMaster 2D Platinum 5.0 (GE Healthcare). Se emplearon al menos tres replicados independientes de cada condición de cultivo evaluada (SS o SS-Fe). Luego de la detección y *matching* de spots, se aplicó la edición manual y filtros propios del software. Todos los spots de los geles pertenecientes a la misma condición de cultivo constituyen una clase. Las diferencias en expresión de proteínas entre clases fueron asignadas utilizando tres parámetros: volumen del spot normalizado, valor Gap y el valor de superposición u Overlap. El valor Gap corresponde a la diferencia entre el valor mínimo de una clase (la clase con el mayor valor medio de volumen del spot) y el valor máximo de la otra clase (la clase con el menor valor medio de volumen del spot). El valor de Overlap corresponde a la relación entre el valor mínimo de una clase (la clase con el mayor valor medio de volumen del spot) y el valor máximo de la otra clase (la clase con el menor valor medio de volumen del spot). El valor de Overlap y Gap permiten determinar el grado de superposición entre los valores del spot de cada clase, es decir cuán diferentes son las dos clases para un spot determinado. Aquellos spots cuyo valor de volumen del spot normalizado fue al menos el doble en una clase, con valor de Gap mayor que cero y un valor de Overlap mayor que dos, se consideraron como spots diferencialmente expresados y fueron sometidos a identificación por espectrometría de masas. La reproducibilidad de los geles dentro de cada clase se determinó por comparación del *matching* de cada replicado con el correspondiente gel promedio (aquel que contiene todos los spots de todos los geles de cada condición de cultivo).

5.2.8. EXTRACCIÓN Y DIGESTIÓN TRÍPTICA DE PÉPTIDOS.

Los spots fueron recuperados del gel y desteñidos por incubación durante 15 min con una solución fresca 15 mM ferricianuro de potasio, 50 mM tiosulfato de sodio según se describió previamente [18]. Luego, cada porción de gel fue lavada varias veces con H₂O bidestilada para detener la reacción, sometida a ciclos alternados de lavados de 10 min con H₂O y acetonitrilo, y secada utilizando el equipo Speed Vac (Savant, Farmingdale, NY, USA). Posteriormente, cada porción de gel fue incubada en 5 µl de solución 50 mM NH₄CO₃, 5 mM CaCl₂ suplementada con 12.5 ng µl⁻¹ de tripsina porcina modificada (Promega, Madison, WI, USA) e incubada a 37 °C durante toda la noche.

Los péptidos trípticos fueron recuperados de la matriz de poliacrilamida por incubación con 40 µl de acetonitrilo/H₂O/Trifluoroacético (TFA) (66:33:0.1 v/v/v). Los péptidos recuperados en esta solución fueron secados al vacío, solubilizados en 10 µl 0.1 % TFA y desalinizados utilizando Zip Tips C18 (Millipore) acorde con las instrucciones del fabricante.

5.2.9. ESPECTROMETRÍA DE MASA POR DESORCIÓN/IONIZACIÓN MEDIANTE LÁSER ASISTIDA POR MATRIZ (MALDI).

Un µl de muestra desalinizada fue colocado dentro de una placa MALDI con 1 µl de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (5 mg ml⁻¹) en una relación 1:1 (v v⁻¹) con una solución 50 % de acetonitrilo/ 0.05 % TFA. Se permitió que la muestra se seque durante aproximadamente 15 min previo al análisis MS. Los espectros se obtuvieron utilizando el espectrómetro de masas Reflex IV MALDI-ToF (Bruker Daltonics, Karlsruhe, Germany) en modo reflector y utilizando como calibradores internos los picos conocidos de autólisis de tripsina. Las muestras que no pudieron ser identificadas con certeza mediante *peptide mass fingerprinting* fueron secuenciadas por espectrometría de masa en tandem utilizando el equipo MALDI ToF-ToF 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystem, Framingham, CA, USA). La fragmentación de los péptidos fue realizada mediante disociación inducida por colisión (CID, *Collision-induced Dissociation*) a una energía de colisión de 1 keV y una presión de gas de colisión de 3 × 10⁻⁷ bar. La calibración externa fue realizada utilizando la serie de iones b resultantes de la fragmentación del ión glu-fibrinopéptido B (m/z = 1570.67).

5.2.10. BÚSQUEDA EN BANCO DE DATOS PARA IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS.

Para la identificación de proteínas a través de *Peptide mass fingerprints* se realizó la búsqueda en la base de datos MSDB provista por NCBI empleando el software Mascot (Matrix Science Ltd, UK). La tolerancia de masa fue de 100 ppm y no se fijaron restricciones en la masa molecular de la proteína o el linaje filogenético. Para el análisis de los datos MS/MS, se realizó la búsqueda en Mascot de los espectros sin interpretar para identificar proteínas con péptidos trípticos idénticos a aquellos presentes en el espectro analizado. La tolerancia de la masa del ion precursor y del ion fragmentado fue 0.1 Da y 0.05 Da, respectivamente. El valor Hits se consideró significativo si el score de la proteína excede el *score* umbral calculado por Mascot asumiendo p < 0.05. Los espectros MS/MS fueron inspeccionados además manualmente considerando la correlación de los iones fragmentados y-, b- y a- versus el correspondiente valor m/z calculado de la secuencia peptídica según describen Biemann *et al.* [5]. Todas las secuencias candidatas fueron combinadas en una única secuencia de búsqueda y confrontadas en una búsqueda en MS BLAST contra una base de datos de proteínas no

redundante (nrdb, non-redundant protein database) en <http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/> o <http://dove.emblheidelberg.de/Blast2/msblast.html>, utilizando parámetros por defecto. Acorde con el *score* de confianza estadística de MS BLAST seleccionado, la proporción de falsos positivos identificados fue menor que 1 %.

5.2.11. ENSAYO DE INMUNODETECCIÓN (DOT BLOT).

Geles 2-DE preparativos realizados con 1000 µg de proteínas solubilizadas (fracción enriquecida en proteínas de membrana externa) se revelaron utilizando Coomassie blue. Las proteínas que mostraron expresión diferencial fueron recuperadas del gel según describen Hunkapiller *et al.* [26]. Para la inmunodetección mediante dot blot, volúmenes de muestra conteniendo cantidades (µg) equivalentes de cada proteína en estudio se aplicaron a una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore, Bedford, MA, USA) y se dejaron secar a temperatura ambiente. Proteínas totales de *B. pertussis* cultivada en medio con exceso de hierro (SS) y holo-transferrina humana (Sigma, St Louis, MO) se utilizaron como control positivo y negativo, respectivamente. Las membranas se incubaron durante 2 hs a temperatura ambiente en solución de bloqueo [PBS, 0.05 % v v⁻¹ Tween 20, 5 % p v⁻¹ albúmina bovina (BSA)], y luego durante otras 2 hs a temperatura ambiente con IgG humana purificada de un pool de suero de pacientes de tos convulsa con un alto título contra *B. pertussis* según se determinó por ELISA [38]. Luego de los lavados con solución PBS + 5 % p v⁻¹ BSA, la unión específica de anticuerpos IgG se visualizó mediante incubación con anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con fosfatasa alcalina (Jackson, ImmunoResearch, BaltimorePike) como anticuerpo secundario y NBT/BCIP (Bio-Rad) como sustrato de reacción.

5.2.12. OBTENCIÓN DE SUEROS.

Para la obtención de suero de ratón anti-IRP1-3 y anti-AfuA, grupos de 5 ratones hembra BALB/c de 6-8 semanas libres de patógenos fueron inmunizados subcutáneamente con 15 µg de proteína (IRP1-3 o AfuA) formulada con hidróxido de aluminio [Al (OH)₃] como adyuvante. Transcurridos 28 días, los ratones recibieron una nueva inmunización (refuerzo) con la respectiva proteína en Al (OH)₃ como adyuvante. Finalmente, 42 días después de la inoculación inicial los ratones fueron sangrados y se recuperó el suero correspondiente. Grupos de ratones inoculados con solución PBS fueron empleados como control negativo. Para la determinar la presencia de anticuerpos contra las proteínas IRP1-3 y AfuA de *B. pertussis* en los sueros, membranas tratadas con las proteínas IRP1-3 o AfuA según se describió más arriba fueron incubadas con los correspondientes sueros de ratón (dil 1/200) durante 2 hs a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con solución PBS + 5 % p v⁻¹ BSA, la unión específica de anticuerpos se

visualizó mediante la incubación con anticuerpos de cabra anti-Ig de ratón conjugados con fosfatasa alcalina y NBT/BCIP (Bio-Rad) como sustrato de reacción.

5.2.13. ELISA.

La evaluación del título de anticuerpos anti-IRP1-3 y anti-AfuA se llevó a cabo según lo descrito por Harvill *et al.* [61] con algunas modificaciones. Bacterias cultivadas en medio con exceso de hierro (SS) o medio libre de hierro (SS-Fe) se inactivaron a 56 °C durante 30 min, se lavaron con PBS y se resuspendieron en PBS a una $DO_{650\text{ nm}}$ de 1. Placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc Denmark) se sensibilizaron con 100 μl por pocillo de suspensión de bacterias cultivadas en medio SS o SS-Fe durante 12 hs a 4°C en cámara húmeda. Finalizada esta etapa, los pocillos se lavaron tres veces con solución PBS-0.05 % v v⁻¹ Tween 20 (PBS-T) y se realizó el bloqueo de sitios libre remanentes con 300 μl por pocillo de una solución PBS-10 % p v⁻¹ leche descremada (PBS-L) durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Las diluciones de los sueros de ratón anti-IRP1-3, anti-AfuA y suero normal se prepararon en solución PBS-L suplementada con 0.05 % v v⁻¹ Tween 20 (PBS-LT). Se adicionaron 100 μl de dilución de cada suero por pocillo y se incubó durante 2 hs a 28 °C en cámara húmeda. Luego de tres lavados con PBS-T, se adicionaron 100 μl por pocillo de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Pierce) diluido en PBS-LT y se incubó durante 2 hs a 37 °C en cámara húmeda. Finalizada esta etapa, los pocillos se lavaron tres veces con PBS-T y se agregó 100 μl por pocillo de sustrato para peroxidasa, orto-fenildiamina, preparado en buffer fosfato/citrato/H₂O₂ (0.1 M PO₄HNa₂ / 0.1 M ácido cítrico / 0.001 % H₂O₂). Luego de 15 min la reacción se detuvo mediante el agregado de 50 μl por pocillo de solución 2 M SO₂H₄. La absorbancia se midió a 492 nm (Spectra Rainbow, Texas).

5.2.14. ENSAYO DE AGLUTINACIÓN.

La actividad aglutinante de los sueros de ratón anti-IRP1-3 y anti-AfuA fue cuantificada según Nagel *et al.* [38] empleando como antígeno *B. pertussis* cepa Tohama transformada con el plásmido pCW505 (proporcionado por Dr. Weiss, Cincinnati, Ohio) el cual induce la expresión citoplasmática de la proteína fluorescente verde GFP (Green Fluorescent Protein) [38] y cultivada en medio SS-Fe. Antisuero pertussis de referencia (humano, *Food and Drug Administration*, FDA) y suero anti-Fim de ratón fueron utilizados como referencia. Suero de ratón no inmune fue incluido en cada ensayo como control negativo. La aglutinación se registró por observación microscópica utilizando un microscopio DMLB (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Switzerland).

5.2.15. ENSAYO DE OPSONIZACIÓN.

Bacterias cultivadas en medio SS-Fe se utilizaron para determinar la capacidad de opsonización de sueros de ratón anti-IRP1-3 y anti-AfuA. Brevemente, 15 μl de bacterias (1×10^5 bacterias ml^{-1}) se incubaron con 5 μl de suero de ratón anti-IRP1-3, suero anti-AfuA o suero normal de ratón durante 1 h a 4 °C. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS y el pellet resultante se incubó con anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con ficoeritrina (PE) durante 1 h a 4 °C. Luego de un lavado final con PBS las bacterias fueron fijadas con paraformaldehído 4 % y analizadas por citometría de flujo (BD FACSCalibur™, BD Biosciences).

5.2.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación de los valores obtenidos (medias) se utilizó el test de Menor Diferencia Significativa (LSD) con un grado de significación (α) de 0.05.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES REQUERIDAS PARA EL ANÁLISIS 2-DE DE PROTEÍNAS TOTALES Y DE FRACCIÓN ENRIQUECIDA EN PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *B. PERTUSSIS*.

El análisis global de la expresión de proteínas de un genoma en un entorno o conjunto de condiciones se conoce actualmente con el término de "Proteómica" [11]. La proteómica puede definirse como la genómica funcional a nivel de proteínas. El estudio de la expresión de proteínas de un genoma es relevante para el conocimiento de la funcionalidad y el rol biológico de nuevas proteínas en contexto del complejo sistema de interacciones que ocurren durante cada evento biológico. El análisis proteómico de bacterias patógenas posibilita el descubrimiento de proteínas con potencial aplicación en diagnóstico, como componentes vacunales o como nuevos blancos para el diseño de drogas terapéuticas. Algunos microorganismos patógenos que ya han sido sometidos a este tipo de análisis son *Mycobacterial tuberculosis*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* entre otros [11]. En el caso de *B. pertussis*, a pesar de ser un patógeno de difícil erradicación y re-emergente, no existen aún trabajos empleando este tipo de estrategia de estudio. La obtención de un mapa proteómico de referencia de un organismo creciendo bajo determinadas condiciones genera un punto de partida para la comparación proteómica o análisis substractivo de la respuesta del microorganismo frente a un estímulo genético o ambiental.

Para iniciar este estudio comenzamos con la estandarización de la metodología a emplear para el análisis por electroforesis bidimensional de proteínas totales y de fracción enriquecida en proteínas de membrana externa (PME) de *B. pertussis*. Se obtuvieron muestras de proteínas totales de *B. pertussis* cultivada en medio con exceso (SS) y libre de hierro (SS-Fe) según se detalla en materiales y métodos. Para la obtención de PME se utilizó el protocolo propuesto por Molloy *et al.* [36]. Se ajustaron diferentes condiciones de operación hasta obtener el mayor número posible de proteínas (spots) con óptima resolución (focalización). A continuación se detallan las condiciones ajustadas.

5.3.1.1. Tipo de Equipo de isoelectroenfoque (IEF).

Se evaluaron dos equipos de IEF alternativos: IPGphor y Multiphor (Pharmacia). En general, el IEF empleando el equipo Multiphor proporcionó mejores resultados, mayor número de spots y mejor focalización, para ambos tipos de muestras analizadas (**Fig. 1**). El equipo Multiphor posee mayor versatilidad en cuanto a modificaciones en los protocolos de IEF (tiempos de focalización, variaciones de voltaje) y permite la

manipulación de la muestra durante el IEF como, por ejemplo, el agregado de soluciones buffer que favorecen la focalización de proteínas.

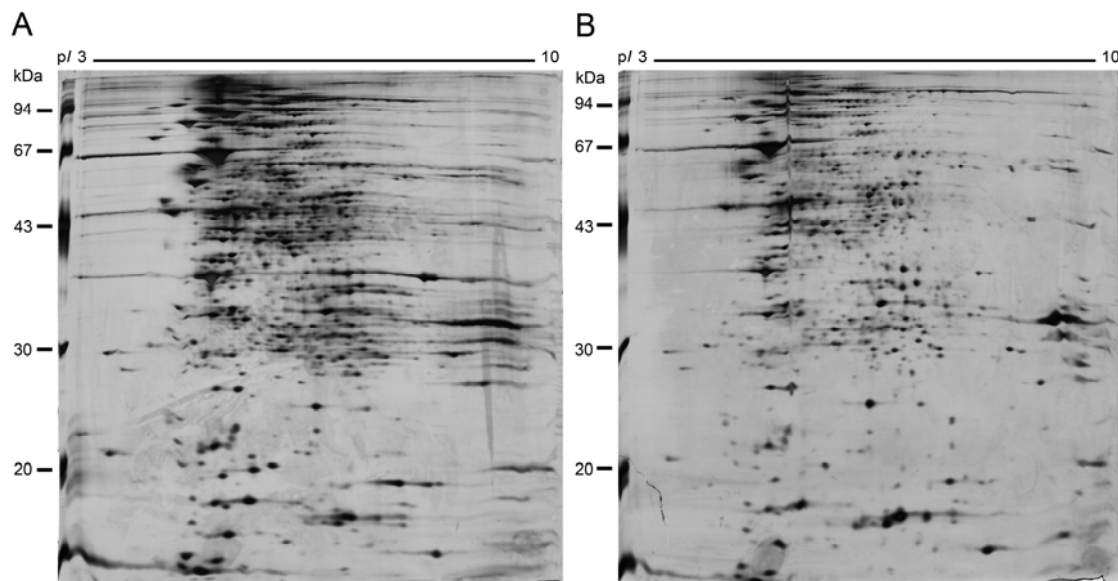


Fig. 1 Electroforesis bidimensional (2-DE) de proteínas totales de *B. pertussis*. Comparación de equipos para IEF. 300 µg de proteínas totales resuspendidas en 350 µl de buffer 2-DE se aplicaron en un IPG pH 3-10, 18 cm. Para el isoelectroenfoque (IEF) se empleó el equipo IPGphor (Pharmacia) (A) o el equipo Multiphor (Pharmacia) (B). La segunda dimensión se realizó en un gel SDS-PAGE 10 %. La visualización de proteínas se realizó mediante tinción con plata.

5.3.1.2. Gradiente de pH en geles IPG y porcentaje de acrilamida en geles SDS-PAGE.

De los gradientes de pH en geles IPG (3-10, 4-7 y 6-11) y porcentajes de acrilamida en geles SDS-PAGE (6, 10 y 12 %) evaluados, el mayor número y distribución homogénea de spots se obtuvo empleando IPG pH 4-7/6-11 y geles 10 % SDS-PAGE (dato no mostrado), por lo cuál se emplearon dichas condiciones para el análisis comparativo de geles 2-DE de proteínas totales y proteínas de fracción enriquecida en PME de *B. pertussis*.

5.3.1.3. Buffers y Protocolos de solubilización.

Se evaluaron dos protocolos de solubilización para proteínas totales previo al IEF:

(A) El material proteico liofilizado se resuspendió en 50 mM Tris/HCl y se adicionaron inhibidores de proteasas (PMSF, EDTA, AEBSF). Las muestras fueron sonicadas aplicando 3 pulsos de 5 min a 80 % de potencia con descansos de 1 min a 4 °C. Posteriormente, se realizó la precipitación de proteínas totales incubando la muestra en 3 volúmenes de acetona fría durante 1 h a -20°C. Las muestras fueron centrifugadas a 8000 × g durante 10 min. Luego de descartar el sobrenadante, el pellet fue secado al vacío y solubilizado en buffer 2-DE durante 1 h.

(B) Como alternativa al protocolo anterior, luego de resuspender en 50 mM Tris/HCl y sonicar la muestra de igual forma que en el protocolo anterior, se adicionó 3 volúmenes de buffer 2-DE y se incubó la muestra durante 1 h a temperatura ambiente en agitación suave. Luego, la muestra fue centrifugada durante 10 min a $8000 \times g$ para eliminar restos celulares y detritos. Según se observa en la **Figura 2**, la solubilización directa de la muestra en buffer 2-DE (protocolo B) sin realizar la precipitación con acetona resultó en un mayor número de proteínas (spots) detectadas, por lo cual se seleccionó este protocolo para el tratamiento de proteínas totales.

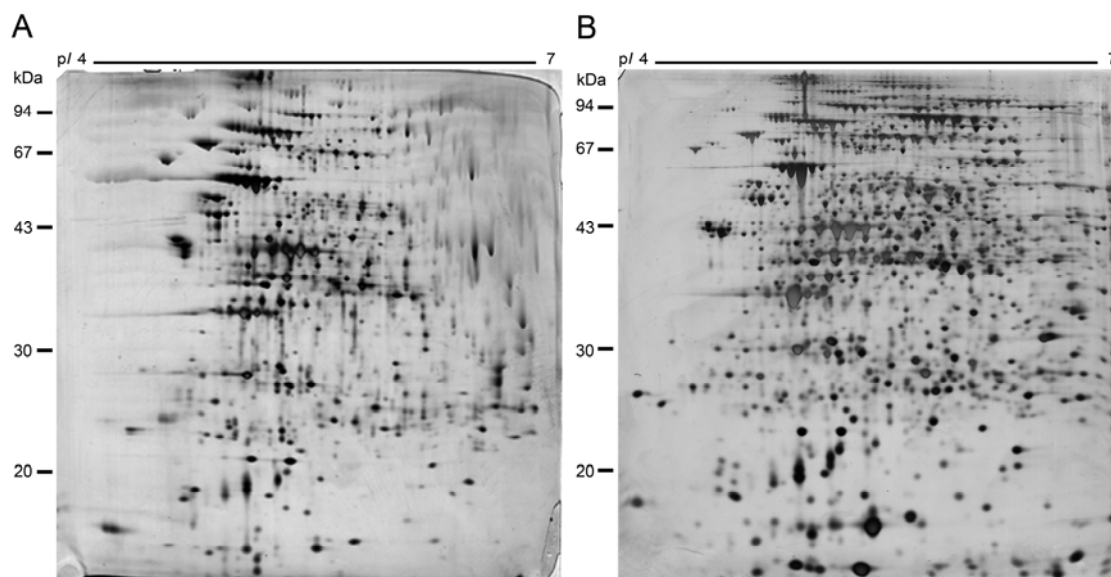


Fig. 2 Electroforesis bidimensional (2-DE) de proteínas totales de *B. pertussis*. Comparación de protocolos de solubilización. Se evaluaron dos protocolos de solubilización de proteínas totales, (A) se realizó la precipitación de proteínas totales incubando la muestra en 3 volúmenes de acetona fría durante 1 h a -20°C y (B) se adicionó 3 volúmenes de buffer 2-DE y se incubó la muestra durante 1 h a temperatura ambiente en agitación suave. En ambos casos se procesaron 300 μg de proteínas totales. Se utilizaron IPG pH 4-7, 18 cm. Para el IEF se empleó el equipo Multiphor (Pharmacia). La segunda dimensión se realizó en un gel SDS-PAGE 10 %. La visualización de proteínas se realizó mediante tinción con plata.

Para el análisis de muestras de proteínas totales de *B. pertussis* se evaluaron dos buffer de solubilización: (A) 7 M urea, 2 M tiourea, 1 % DTT, 2 % tritón X-100, 0.5 % *pharmalyte* pH 3-10 ó *pharmalyte* pH 4-7, buffer 2-DE y (B) 8 M urea, 1 % DTT, 2 % tritón X-100, 0.5 % *pharmalyte* pH 3-10 ó *pharmalyte* pH 4-7. El buffer que contiene urea y tiourea permitió obtener patrones 2-DE con una mejor focalización de proteínas (dato no mostrado).

Dada la dificultad de realizar IEF de proteínas con alto grado de hidrofobicidad, como es el caso de PME, se testearon dos buffers de solubilización para muestras de fracción enriquecida en proteínas de membrana externa: (A) 7 M urea, 2 M tiourea, 1 % DTT, 0.5 % glicerol y 10 % isopropanol y (B) 5 M urea, 2 M tiourea, 1 % DTT y 50 % trifluoroetanol. El equivalente a 300 μg de muestra (PME) se resuspendió en 360 μl cada buffer para la hidratación de IPGs de 18 cm pH 3-10. Según se observa en la

Figura 3, la focalización mejoró notablemente con el buffer de solubilización que contiene trifluoroetanol (B). El trifluoroetanol ha sido utilizado previamente como componente de buffer de IEF, mejorando notablemente la focalización de proteínas de membrana sin interferir con la identificación mediante MALDI-ToF [14]. En altas concentraciones (50 %), este solvente incrementa la estabilidad de la estructura secundaria no nativa de proteínas a expensas de la estructura terciaria, probablemente mediante la modificación de puentes de hidrógeno y la formación de una cubierta alrededor de la proteína en la cual la concentración de agua es menor. A pesar de que los métodos tradicionales de IEF se realizan en presencia de un agente caotrópico para minimizar la retención de estructuras, los efectos combinados de la presencia de TFE y un agente caotrópico resultan favorables en el análisis 2-DE de proteínas hidrofóbicas, manteniéndolas en un estado de menor agregación y facilitando su migración en el gel.

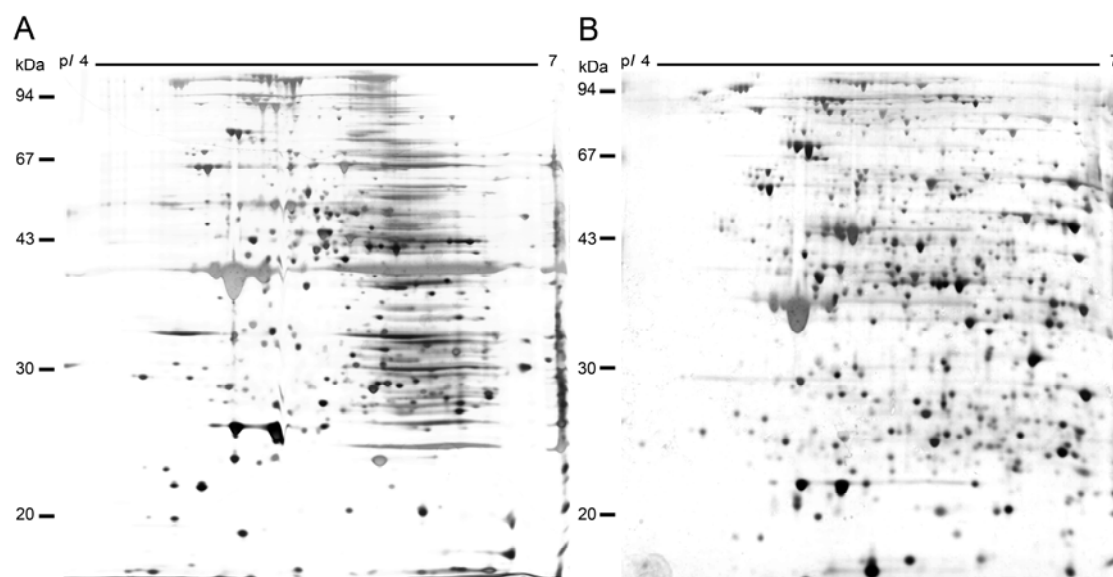


Fig. 3 Electroforesis bidimensional (2-DE) de proteínas de membrana externa (PME) de *B. pertussis*. Comparación de buffer de solubilización. 300 ug de PME resuspendidas en 350 ul de buffer (A) 7 M urea, 2 M tiourea, 1 % DTT, 0.5 % Glicerol, 10 % isopropanol o (B) 5 M urea, 2 M tiourea, 1 % DTT, 50 % Trifluoroetanol, se aplicaron en un IPG pH 4-7, 18 cm. Para el IEF se empleó el equipo Multiphor (Pharmacia). La segunda dimensión se realizó en un SDS-PAGE 10 %. La visualización de proteínas se realizó mediante tinción con plata.

5.3.1.4. Método de carga de la muestra en el IPG.

Se probaron dos métodos de carga de la muestra de proteínas en el IPG: (A) “*in-gel rehydration*” y (B) “*paper bridge*”. En el método denominado “*paper bridge*” la muestra de proteínas solubilizada en buffer de IEF se carga sobre un papel de filtro el cual se coloca luego en contacto con el IPG desde su extremo ácido. En el método de carga de muestra denominado “*in-gel rehydration*” la muestra de proteínas solubilizada en buffer de IEF se utiliza para rehidratar el IPG previo al IEF de manera tal que las proteínas están dentro de la matriz acrilamida-anfolitos del IPG cuando se inicia el IEF.

El método de carga “paper bridge” resultó más efectivo en cuanto a resolución y focalización de la muestra en el caso particular de IPGs pH 6-11 (**Fig. 4**). Su efectividad probablemente se relaciona con el modo en que las proteínas ingresan al IPG durante el IEF. La transferencia de proteínas desde el papel hacia el IPG es gradual, lo cual evita la precipitación de proteínas y favorece la focalización de proteínas con *pI* alcalino. En el caso de IPGs pH 4-7 el método de carga más efectivo resultó ser “*in-gel rehydration*” (dato no mostrado).

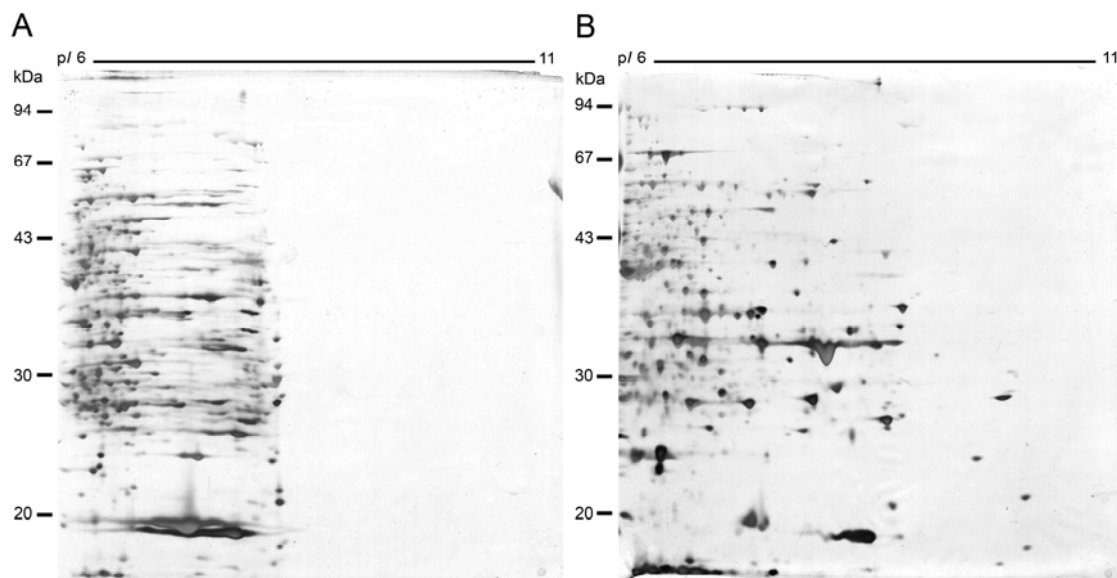


Fig. 4 Electroforesis bidimensional (2-DE) de proteínas totales de *B. pertussis*. Comparación de métodos de carga de la muestra en el IPG. 300 µg de proteínas totales resuspendidas en 350 µl de buffer 2-DE se aplicaron en un IPG pH 6-11, 18 cm utilizando el método “*in-gel-rehydration*” (A) o “*paper bridge*” (B). Para el isoelectroenfoque (IEF) se empleó el equipo Multiphor (Pharmacia). La segunda dimensión se realizó en un gel SDS-PAGE 10 %. La visualización de proteínas se realizó mediante tinción con plata.

5.3.1.5. Tipo de Protocolo de IEF.

Para IPGs pH 3-10 se evaluaron dos protocolos en gradiente de tres pasos (equipo Multiphor): (A) 500 V/0.01 h (1 Vh), 3500 V/1.30 h (3000 Vh), 3500 V/4.5 h (17 kVh), 20 kVh totales, o (B) 500 V/0.01 h (1 Vh), 3500 V/1.30 h (3000 Vh), 3500 V/6.2 h (22 kVh), 25 kVh totales. Para IPGs pH 4-7 se evaluaron dos protocolos en gradiente: (A) 3° paso 500 V/5.4 h (20 kVh), 23 kVh totales o (B) 3° paso 500 V/7.4 h (27 kVh), 30 kVh totales. Tiempos de focalización (kVh totales) superior a 20 kVh para IPGs pH 3-10 o 23 kVh para IPGs pH 4-7, resultaron en la sobrefocalización de la muestra perjudicando notablemente la resolución (**Fig. 5**).

Para IPGs pH 6-11 se evaluaron dos protocolos: (A) en gradiente, de tres pasos; 500 V/0.01 h (1 Vh), 3500 V/1.30 h (3000 Vh), 3500 V/5.4 h (20 kVh), 23 kVh totales, o (B) en gradiente, de cuatro pasos; 150 V/0.01 h (75 Vh), 300 V/2 h (300Vh), 600V/1 h (300Vh), 3500V/10 h (17,5 kVh), 19 kVh totales (equipo Multiphor). El protocolo en

gradiente de cuatro pasos mejoró notablemente la focalización de proteínas con pI alcalino (dato no mostrado).

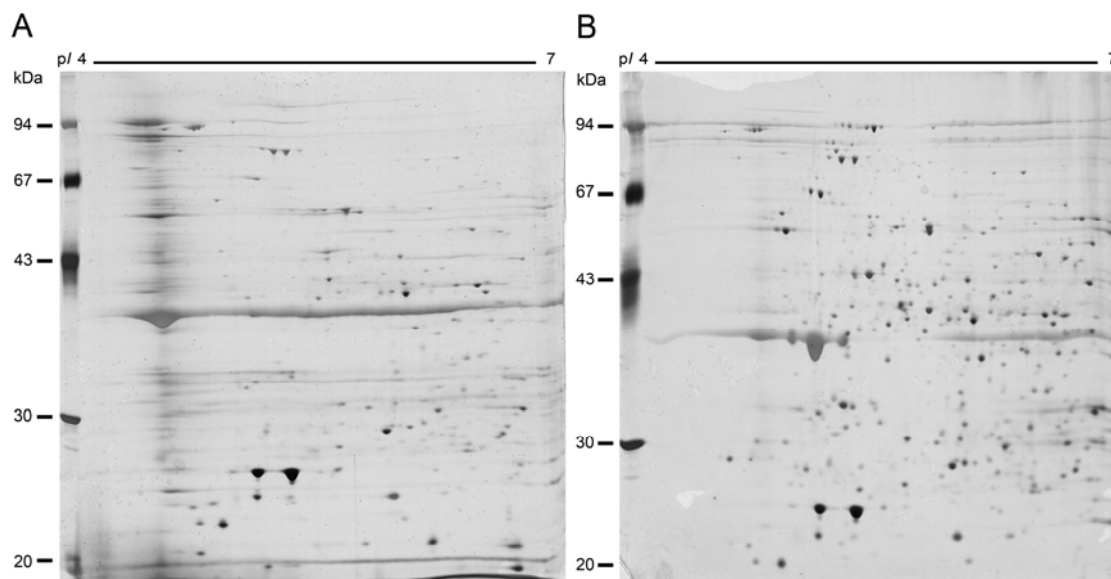


Fig. 5 Electroforesis bidimensional (2-DE) de proteínas de membrana externa (PME) de *B. pertussis*. Comparación de protocolos de IEF. 300 μ g de PME resuspendidas en 350 μ l de buffer 2-DE se aplicaron en un IPG pH 4-7, 18 cm. Para el isoelectroenfoque (IEF) se empleó el equipo Multiphor (Pharmacia). El número de voltios/hora total del protocolo de IEF utilizado fue 23,5 kVh (A) o 20 kVh (B). La segunda dimensión se realizó en un gel SDS-PAGE 10 %. La visualización de proteínas se realizó mediante tinción con plata.

5.3.2. ANÁLISIS COMPARATIVO DEL PROTEOMA DE PROTEÍNAS TOTALES DE *B. PERTUSSIS* CULTIVADA EN CONDICIONES DE DIFERENTE DISPONIBILIDAD DE HIERRO.

Una vez puesta a punto la metodología, se llevó a cabo el análisis comparativo del proteoma de *B. pertussis* cultivada en condiciones de diferente disponibilidad de hierro. En la **Figura 6** se muestran geles 2-DE representativos (pH 4-7 y 6-11) obtenidos de proteínas totales de *B. pertussis* cultivada en medio con exceso (SS) o libre de hierro (SS-Fe). La reproducibilidad (número y localización de spots) entre geles pertenecientes a la misma condición de cultivo (clase), varía entre 80 y 90 %.

El coeficiente de correlación, que resulta de la comparación entre el volumen de cada spot en un gel y el valor de volumen de spot correspondiente en el gel promedio de la clase, mostró una variación entre 0.893 y 0.961 (**Fig. 7**).

El análisis de imagen de los geles 2-DE comparando el rango de pH 4-7, demostró la presencia de 900 proteínas (spots) con un masa molecular (MM) entre 18 y 123 kDa, independientemente de la condición de cultivo evaluada. El pI/MM promedio del proteoma fue de 5.74/53.6 kDa, lo cual se asemeja al valor esperado o proteoma teórico (5.91/39.6 kDa) derivado de la secuencia genómica. Cuando se utilizaron IPG alcalinos (pH 6-11), se detectaron aproximadamente 210 proteínas (spots) con una masa molecular entre 16-148 kDa. Una vez más, el pI/MM promedio del proteoma expresado (7/39.7 kDa) fue semejante al valor teórico (8.2/36.6 kDa) derivado de la secuencia

genómica. La relación entre el número de genes que codifican proteínas con un *pI* teórico entre 4 y 7 dividido el número de spots presentes en los geles 2-DE fue de 0.59 spots (proteínas) por proteína teórica. Cabe señalar que para obtener un valor real del número de proteínas (spots) diferentes que se expresan es necesario identificar un gran número de proteínas y determinar la frecuencia de identificaciones idénticas por número de spot diferentes. Este valor varía dependiendo del microorganismo en estudio. Por ejemplo, en determinadas condiciones de cultivo se encontró que en *Pseudomonas putida* 181 spots corresponden a 106 proteínas diferentes [25], mientras que en *Escherichia coli* 2160 spots corresponden a 575 proteínas de las cuales 241 existen en más de una isoforma [22].

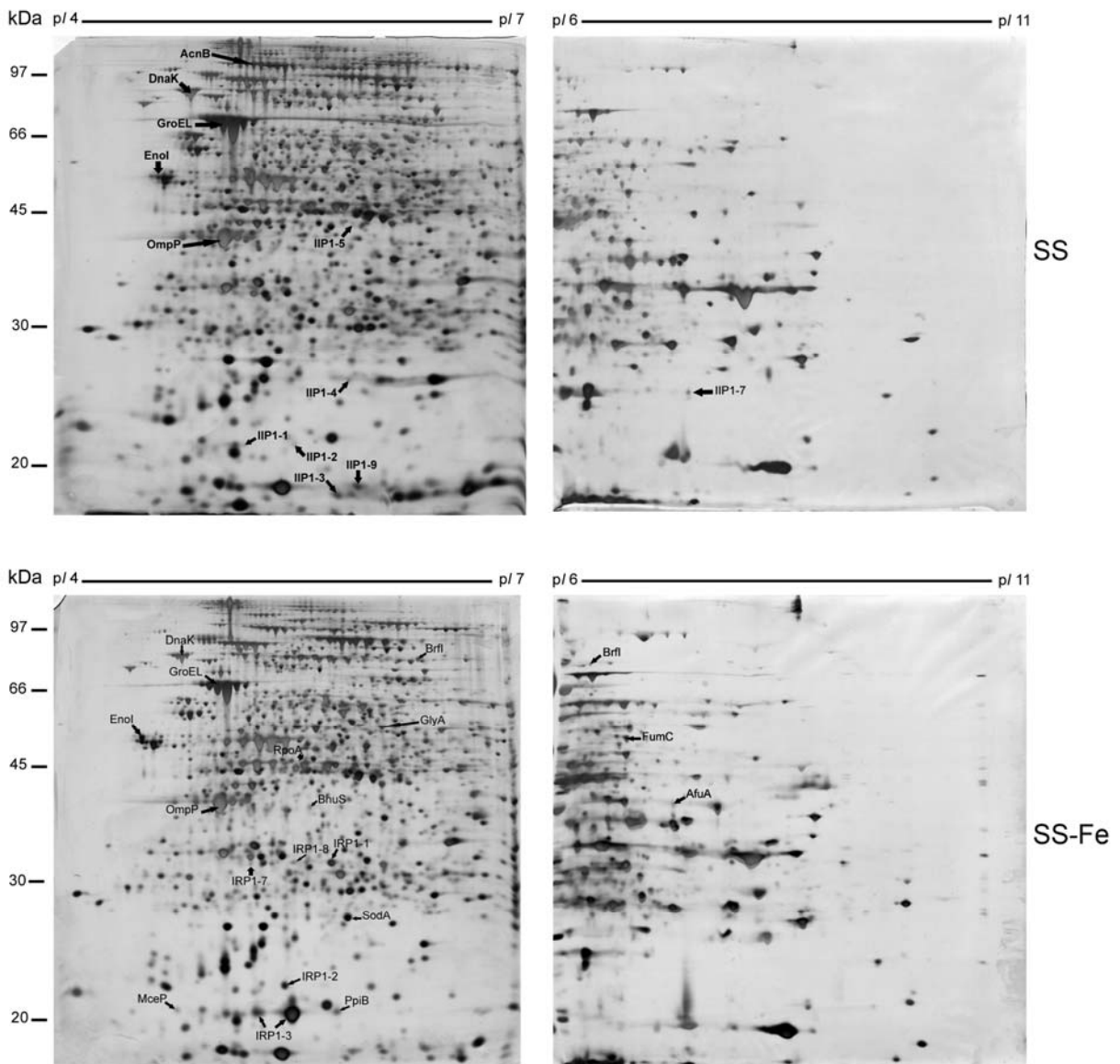


Fig 6. Geles 2-DE representativos de proteínas totales de *B. pertussis* cultivada en medio con exceso (SS) y libre de hierro (SS-Fe). 300 µg de proteínas totales fueron separadas en geles IPG de 18 cm (pI 4-7 o pI 6-11, 10 % SDS-PAGE) y visualizadas mediante tinción con plata. Las proteínas sometidas a identificación por MALDI-ToF MS se indican con flechas y se detallan en la Tabla 1. Las proteínas que no pudieron ser identificadas fueron IIP1-1, IIP1-5 (*Iron Induced Protein*) y IRP1-7, IRP1-8 (*Iron Repressed Protein*).

La comparación de los patrones 2-DE (pH 4-7 y pH 6-11) de proteínas totales procedentes de bacterias cultivadas en medio con exceso o libre de hierro permitió determinar la expresión diferencial de 23 spots (proteínas); 8 con mayor expresión en condiciones de exceso de hierro y 15 con mayor expresión en condiciones de limitación de hierro (**Fig. 6**, y **Fig. 8**). Estas proteínas y algunas proteínas de referencia (*spots landmark*) fueron sometidos a digestión trípica e identificación mediante MALDI-ToF-MS (**Tabla 1** y **Fig. 9**).

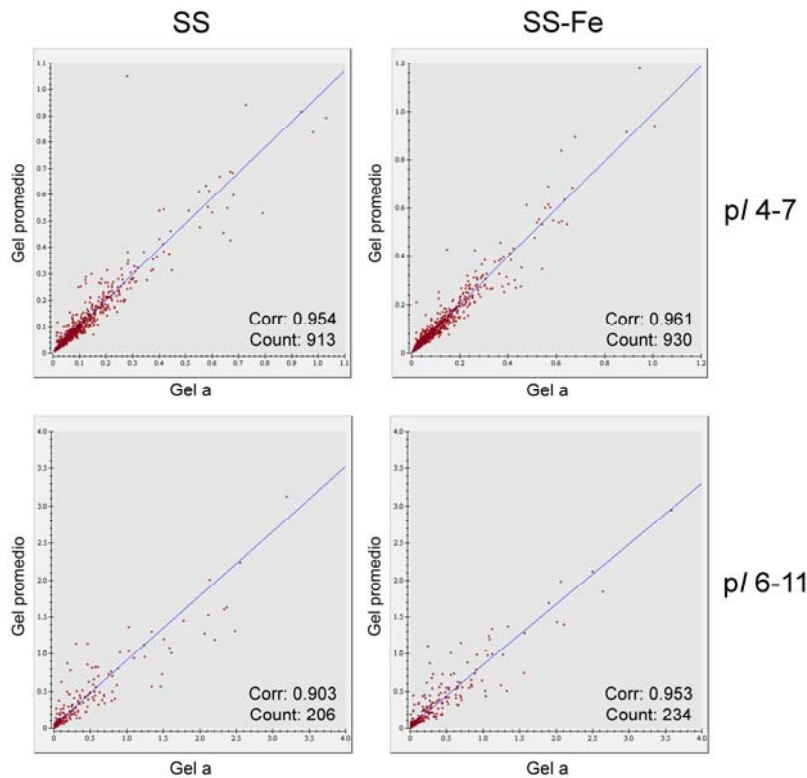


Fig 7. Scatter plots representativos de la correlación entre cada spot de un gel 2-DE de proteínas totales de *B. pertussis* y su respectivo spot en el gel promedio de una clase. Comparación de los volúmenes normalizados de spots de un gel perteneciente a una clase (eje x) y su correspondiente gel promedio (eje y), análisis 2-DE pH 4-7 y pH 6-11. (**SS**) proteínas totales de bacterias cultivadas en medio con exceso de hierro, (**SS-Fe**) proteínas totales de bacterias cultivadas en medio libre de hierro; (**count**) número de pares de spots en cada ensayo. Un coeficiente de correlación (**corr**) con un valor absoluto cercano a 1 indica un buen ajuste de correlación.

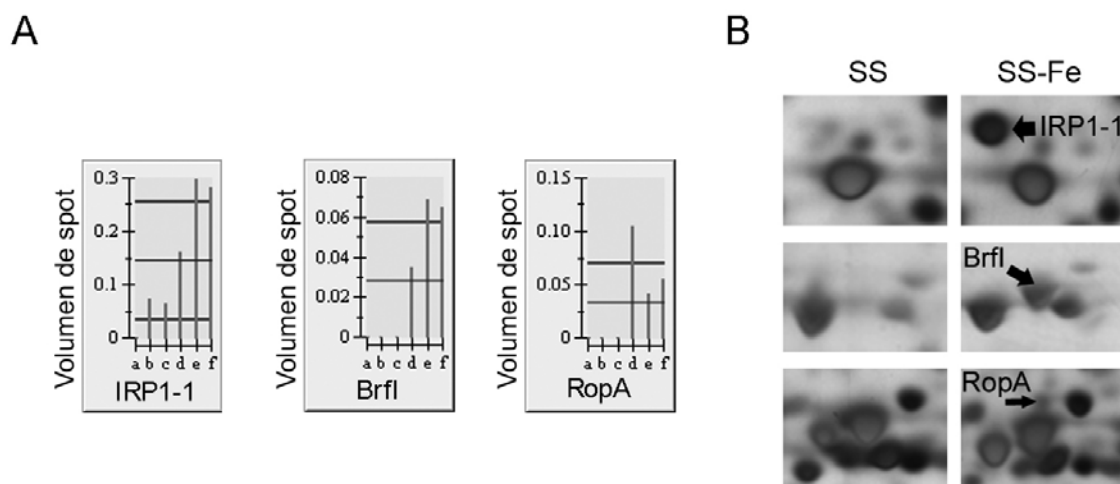


Fig. 8 Proteínas con expresión diferencial en *B. pertussis*. (A) Histogramas del volumen de spot de cada gel 2-DE de proteínas totales de *B. pertussis* cultivada en medio con exceso de hierro (a, b, c) y medio libre de hierro (d, e, f). (B) Imagen ampliada del gel 2-DE mostrando la expresión diferencial de proteínas en bacterias cultivadas en medio con exceso de hierro (SS) y medio libre de hierro (SS-Fe).

Tabla 1. Proteínas de *B. pertussis* identificadas por MALDI-TOF MS.

Nº	Nº ORF	Nombre	Score	Cobertura	Condición de	Valor Spot ^a	Descripción	kDa/p/	kDa/p/
			MS/MASCOT	(%)	cultivo	SS/SS-Fe		Teórico	Experimental
1	Bp0193	SodA	134	78	Limitación de hierro	0.04/0.32	superoxido dismutasa	23.19/5.72	27.3/5.92
2	Bp0346	BhuS	82	35	Limitación de hierro	0.01/0.09	proteína transportadora de grupo hemo	38.47/5.31	36.3/5.69
3	Bp1211	IRP 1-1	124	50	Limitación de hierro	0.05/0.26	probable proteína	28.8/6.13	31.7/5.8
4	Bp2072	IRP1-2	84	47	Limitación de hierro	0.07/0.4	probable Lipoproteína	21.57/6.59	23.3/5.45
5	Bp1962	Brfl	136	24	Limitación de hierro	0.007/0.063	receptor de ferrisideróforos	78.37/7.67	77/6.38
6	Bp3642	RpoA	74	23	Limitación de hierro	0.005/0.047	subunidad α de ARN polimerasa	36.13/5.6	41.3/5.61
7	Bp2952	GlyA	147	31	Limitación de hierro	0.036/0.26	hidroximetil serin transferasa	44.8/6.5	50/6.14
8	Bp3759	MceP ^b	170	10	Limitación de hierro	0.006/0.064	probable proteína mce	17.9/4.87	21.33/4.75
9	Bp1906	PpiB ^b	117	8	Limitación de hierro	0.003/0.034	peptidil prolil <i>cis-trans</i> isomerasa B	18.55/5.58	21.5/5.84
10	Bp1152	IRP1-3	138	35	Limitación de hierro	0.001/5.1	probable proteína exportada	19.36/6	22/5.52
12	Bp0248	FumC ^b	60	30	Limitación de hierro	0.04/0.57	fumarato hidratasa clase II	49.59/6.39	50/6.82
13	Bp1605	AfuA	60	42	Limitación de hierro	0.002/0.11	probable proteína de unión a hierro	37.5/8.8	39/7.25
11	Bp3755	IIP1-7 ^b	182	32	Exceso de hierro	0.001/0.20	probable proteína de membrana externa	23.01/9.22	24/7.5
14	Bp3524	IIP1-9	117	68	Exceso de hierro	0.62/0.15	probable acetiltransferasa	16.08/5.55	18.5/5.94
15	Bp2021	AcnB	131	21	Exceso de hierro	0.086/0.005	probable aconitasa hidratasa	93.11/5.23	97/5.17
16	Bp3495	GroEI	131	37	Limitación/exceso de hierro	7.63/7.14	chaperona	57.44/5.13	63.6/5.02
17	Bp2499	DnaK	182	38	Limitación/exceso de hierro	1.78/1.53	chaperona molecular	69.6/4.88	79.3/4.75
18	Bp2386	Enol	94	37	Limitación/exceso de hierro	3.67/3.91	Enolasa fosfopiruvato hidratasa	46.09/7.72	46/4.5
19	Bp0840	OmpP	116	38	Limitación/exceso de hierro	8.63/8.93	Precursor de porina de membrana externa	41.02/5.51	37/5.04

^a Porcentaje de la suma de todos los spost (volumen) en cada gel de la correspondiente clase.

^b Proteínas identificadas por MALDI-TOF MS/MS.

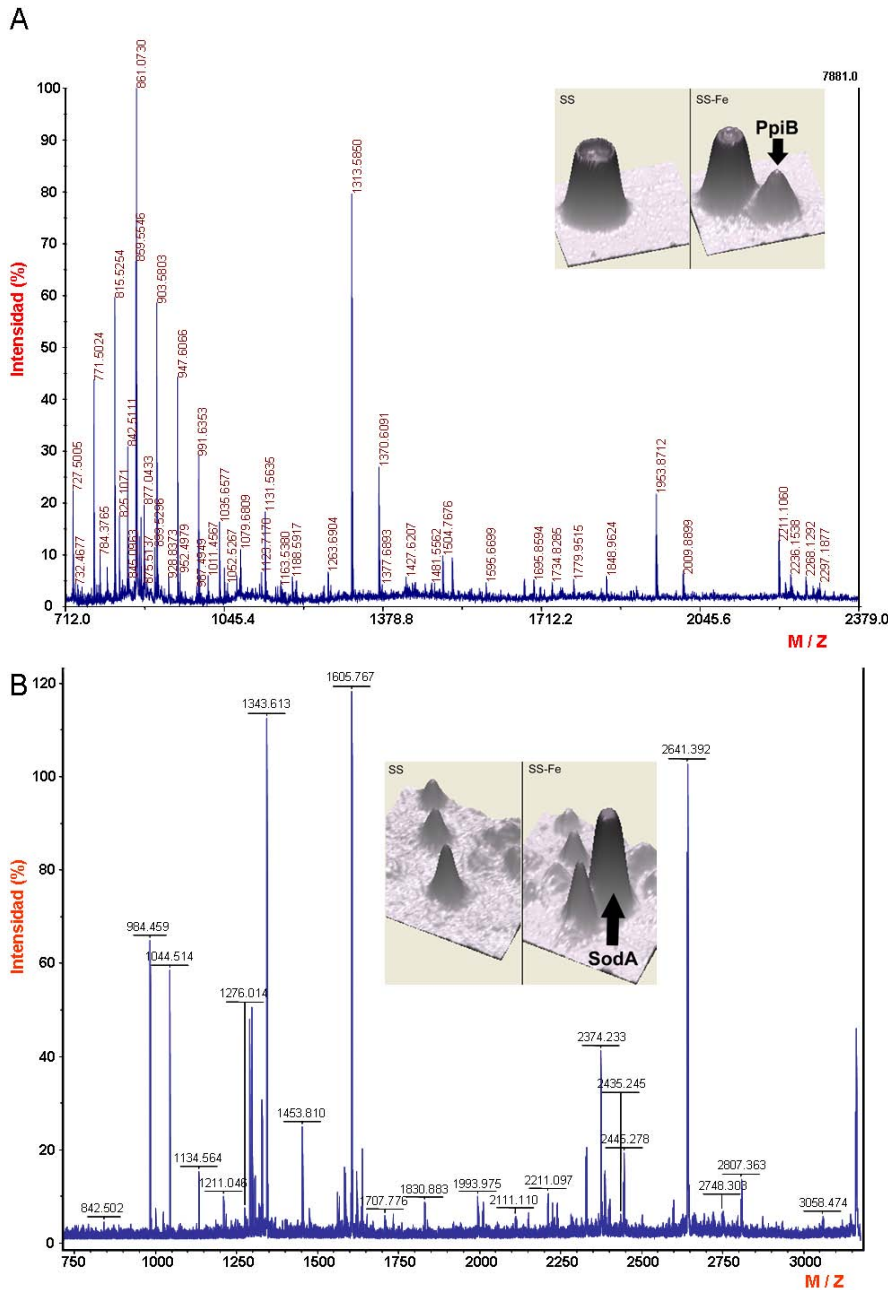


Fig. 9 Espectros representativos correspondientes a la identificación mediante MALDI-ToF de la proteína PpiB (A) y SodA (B) de *B. pertussis*. Junto con el espectro, se muestran los gráficos 3-D de la imagen del respectivo spot en el gel 2-DE.

Entre los spots que mostraron mayor expresión en condiciones de limitación de hierro, cinco proteínas cuya función se conoce fueron identificadas. Ellas son **BhuS**, **SodA**, **RpoA**, **PpiB**, **FumC**, y **GlyA**.

La proteína **BhuS**, es miembro del sistema de transporte Bhu [58], requerido para la asimilación de hierro a partir de hemoproteínas en *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*. BhuS es similar a los denominados factores degradadores de hemina de *P. aeruginosa*, *S. dysenteriae* y *Yersinia spp* [35, 41, 49]. Aunque la actividad degradadora de hemina de estas proteínas no ha sido demostrada, Stojiljkovic y Hantke [54] sugirieron que estas proteínas son capaces de unir hemina y prevenir la acumulación intracelular de este compuesto en niveles que resulten tóxicos para la bacteria. Dado que más del 90 % del hierro dentro del cuerpo humano está asociado con hemo y hemoproteínas [42], las

bacterias que puedan acceder a estos compuestos *in vivo* y utilizarlos como fuentes de hierro poseen una importante ventaja competitiva [8, 59].

La proteína **SodA** es una superóxido dismutasa dependiente de Mn^{+2} [20], cuyo gen se expresa únicamente en condiciones de limitación de hierro. *B. pertussis* posee otra enzima superóxido dismutasa denominada SodB [13]. Ambas proteínas se encuentran en otras bacterias patógenas Gram-negativas [15, 24, 40, 57]. Estas enzimas han sido asociadas con una mayor resistencia microbiana a la acción de especies reactivas del oxígeno producidas por células fagocíticas durante el denominado estallido respiratorio [21, 23]. La enzima SodA regulada por hierro podría ser relevante para la supervivencia de *B. pertussis* dentro del fagolisosoma, donde la concentración de hierro libre disponible sería muy baja [17]. La sobreexpresión de esta enzima en condiciones fisiológicas puede ser relevante para bacterias que colonizan hospedadores inmunes a la luz de resultados obtenidos recientemente por nuestro grupo. Estos resultados demuestran que *B. pertussis* no opsonizada inhibe la fusión fagolisosoma en células inmunes [48] y se mantiene en endosomas tempranos con alta tasa de supervivencia. Sin embargo, la presencia de anticuerpos opsonizantes (presentes en hospedadores inmunes) determina el tráfico a lisosomas donde la acción celular bactericida del neutrófilo disminuye significativamente la supervivencia bacteriana. La sobreexpresión de SodA en condiciones fisiológicas podría incrementar la supervivencia bacteriana al estallido respiratorio propiciando la inmunoevasión aún en hospedadores inmunes.

Otra de las proteínas sobreexpresada bajo condiciones de limitación de hierro que resulta particularmente interesante es la subunidad α de la ARN polimerasa, denominada **RopA**. La secuencia del gen *ropA* posee 63 % de homología con los genes *rpoA* de *E. coli* y *S. typhimurium* [9]. La subunidad α de la ARN polimerasa interacciona con factores de transcripción de numerosos promotores procariontes regulados positivamente, entre los cuales se incluye el factor BvgA de *B. pertussis* [7, 27]. BvgA es el factor transcripcional del sistema de dos componentes denominado Bvg (*Bordetella virulence genes*). Diferentes clases de genes pueden ser diferencialmente reguladas en función de la localización y afinidad de los sitios de unión para el factor BvgA en los respectivos promotores y por la interacción de BvgA con la ARN polimerasa (ver Capítulo 1) [28]. La sobre-expresión de RopA en condiciones fisiológicas podría interpretarse como una señal de la funcionalidad del sistema Bvg y de la expresión de una fase fenotípica potencialmente nueva en respuesta a la escasez de hierro durante la infección. En apoyo de esta hipótesis, un estudio reciente demostró que la cantidad de toxina pertussis liberada al medio de cultivo, un factor de virulencia regulado por el sistema Bvg, se ve afectada por la disponibilidad de hierro [56].

La proteína **PpiB**, también sobre-expresada en limitación de hierro, es una peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa de posible localización periplásmica. Según se determinó mediante alineamiento de secuencias, PpiB posee una importante homología con las

correspondientes proteínas PpiB de *Y. pestis* (69 %), *P. putida* (68 %) y *E. coli* (66 %) (Fig. 10). En bacterias Gram-negativas, el plegamiento extracitoplasmático de proteínas ocurre en el espacio periplásmico, el cual es extremadamente susceptible a cambios debido al contacto directo con el medio ambiente. Aunque la actividad de PpiB de *B. pertussis* aún debe ser demostrada es probable que así como sus proteínas homólogas, esta enzima facilite el correcto plegamiento de proteínas constituyentes de la envoltura celular *B. pertussis* en el espacio periplásmico. La razón del incremento de expresión de esta enzima en condiciones de limitación de hierro aun no está clara.

FumC es una enzima fumarato hidratasa del ciclo de ácido tricarboxílico (TCA), la isoforma que no une hierro, previamente descrita como regulada por hierro en *E. coli*, *Vibrio cholerae* y *P. aeruginosa* [24, 33, 43]. Se especula que bajo condiciones de limitación de hierro esta enzima podría compensar la disminución de la isoforma que contiene hierro en su estructura, permitiendo así el normal funcionamiento del ciclo TCA. Un aspecto a destacar de la sobreexpresión de esta proteína es que ha sido involucrada en *quorum sensing* y se la ha encontrado sobreexpresada también en crecimiento en biofilm [34], una forma de crecimiento típica en bacterias de difícil erradicación como *B. pertussis*. Es tentador especular que en condiciones fisiológicas se favorece esta forma de crecimiento la cual se ha demostrado en modelos *in vitro* [53].

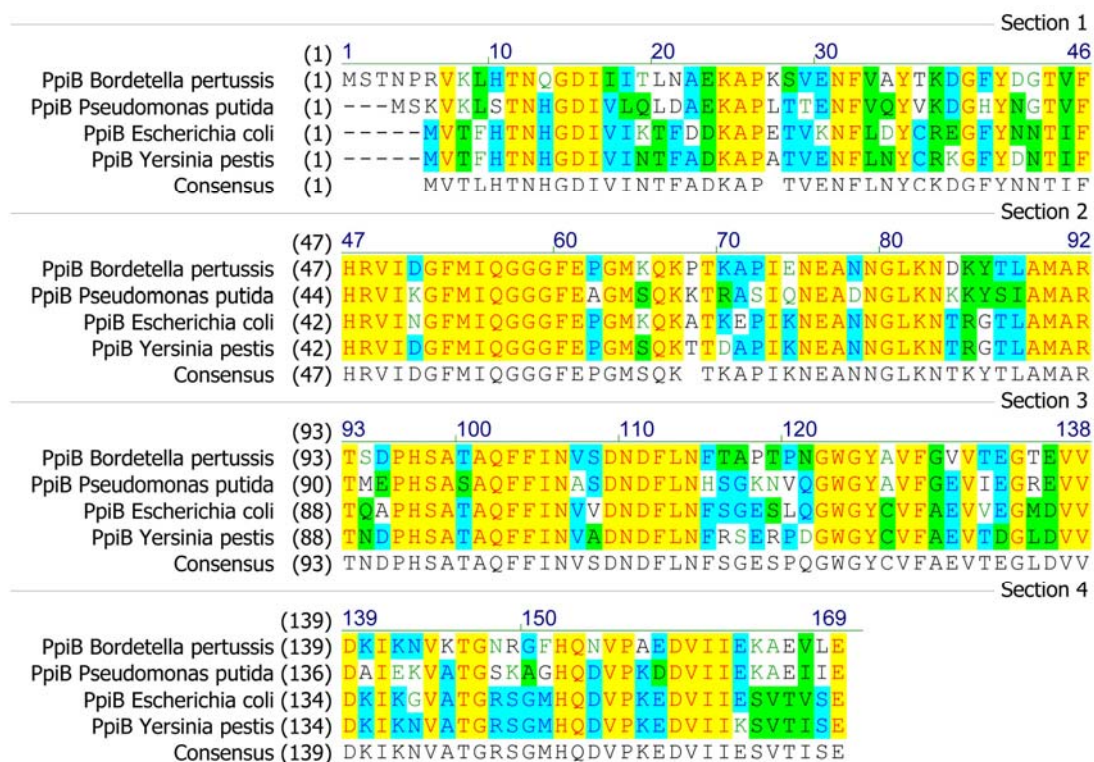


Fig. 10 Alineamiento de las secuencias (AA) de las proteínas PpiB de *B. pertussis*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* y *Yersinia pestis*. Para realizar el alineamiento de secuencias se utilizó el programa Vector NTI. En color verde se indican los AA similares, en color azul se indican las posiciones conservadas y en color amarillo los AA idénticos.

Finalmente, la proteína **GlyA**, una serina hidroximetil transferasa, cataliza la conversión de serina a glicina, lo cual representa la mayor fuente de glicina y unidades de carbono simples para la célula [46]. En condiciones de limitación de hierro (medio SS-Fe), el crecimiento bacteriano no se encuentra limitado en glutamato (la fuente de carbono para *B. pertussis*) como si ocurre en el medio SS formulado con exceso de hierro. El cambio en el nivel de expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de aminoácidos concuerda con el cambio en la abundancia relativa de glutamato en la condición de cultivo evaluada.

Además de las proteínas descritas anteriormente, se identificaron 5 proteínas de función desconocida cuya expresión se incrementa en limitación de hierro. A las proteínas sin nombre asignado previamente se las denominó IRP (*Iron Repressed Protein*). Las 5 proteínas mencionadas son: **IRP1-1**, proteína hipotética; **IRP1-2**, posible lipoproteína; **BrfI**, posible receptor de ferrisideróforos; **AfuA**, posible proteína de unión a hierro; **MceP**, proteína relacionada con la proteína mce de *Mycobacterium tuberculosis* e **IRP1-3**, posible proteína exportada (**Tabla 1**). Todas estas proteínas poseen una probable localización periplasmática o en la membrana externa de *B. pertussis* (según TargetP, TopPred, LipoP) y, al menos tres de ellas, podrían estar implicadas en la captura de hierro.

La proteína de 39-kDa, denominada **AfuA**, presenta homología con proteínas de transporte de hierro tales como HitA de *Haemophilus influenza*, o FbpA de *Neisseria meningitidis*. Estas proteínas conforman un sistema de tres componentes denominado HitABC y FbpABC, respectivamente, que permite el intercambio de Fe entre receptores de membrana para proteínas de unión a hierro del hospedador y el citosol. HitA y FbpA participan en la unión al ligando extracelular, HitB y FbpB, localizadas en la membrana interna, poseen actividad permeasa, y HitC y FbpC son proteínas actividad de unión a ATP que proveen la energía para el transporte hacia el citoplasma. El análisis de la secuencia nucleotídica adyacente al gen *afuA* sugiere que este gen podría formar parte de un operón que contiene análogos *afuB* y *afuC*, tales como aquellos presentes en los locus *hitABC* y *fbpABC* (**Fig. 11**). Además, el análisis de la secuencia *upstream* del gen *afuA*, reveló la presencia de un posible sitio de unión para la proteína Fur localizado a 72 pb de la posición +1 (ATG) (**Fig. 11**).

La proteína **BrfI** posee homología de secuencia (37 %) con el receptor de ferrisideróforos tipo hidroxamato de *P. aeruginosa* denominado FiuA y con el receptor de ferricromo de *Salmonella typhimurium* denominado FhuA (38 %).

En el caso de la proteína **IRP1-1**, la búsqueda en BLAST mostró que posee homología con el componente periplásmico de un sistema transportador tipo ABC de *Ralstonia eutropha* (58 %), el cuál estaría involucrado en el transporte y metabolismo de iones inorgánicos, como por ejemplo iones Fe⁺².

La lipoproteína **IRP1-2**, se localizaría en la membrana externa de *B. pertussis*, según se predice analizando su secuencia con el programa BOMP. IRP1-2 posee homología con otras probables lipoproteínas de bacterias Gram-negativas. El análisis de la secuencia *upstream* del gen *irp1-2*, reveló la presencia de un posible sitio de unión para la proteína Fur localizado a 74 pb del sitio de inicio de la transcripción (**Fig. 12**).

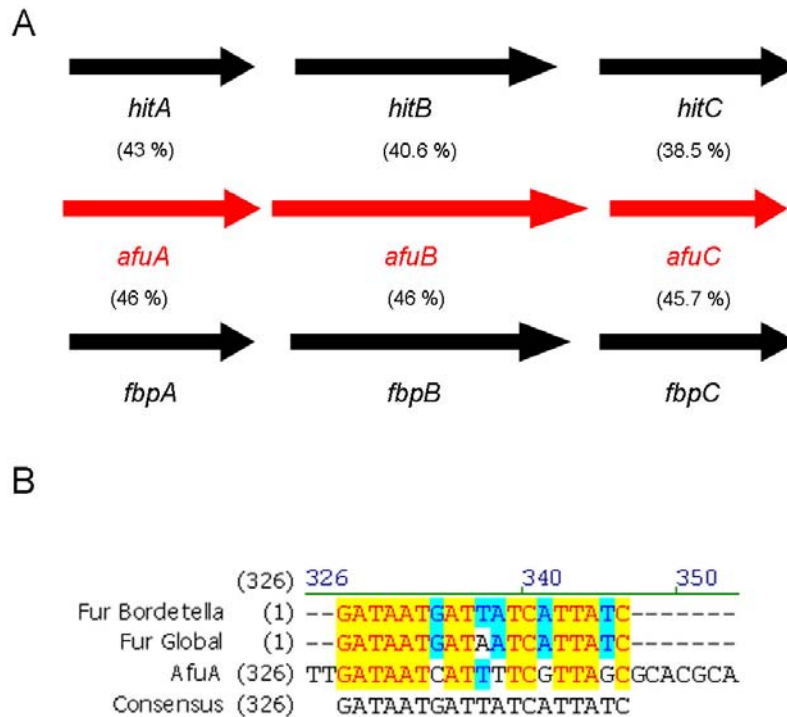


Fig. 11 Probable locus *afuABC* de *B. pertussis*. (A) Comparación del locus *afuABC* de *B. pertussis* con el locus *hitABC* de *H. influenzae* y *fbpABC* de *N. meningitidis*. Entre paréntesis se indica el porcentaje de homología entre los genes de *B. pertussis* y *H. influenzae* o *N. meningitidis*, respectivamente. (B) Probable sitio de unión de la proteína Fur en el gen *afuA* de *B. pertussis*. El alineamiento de secuencias se realizó con la secuencia consenso Fur global (incluye las secuencias Fur de genes de diferentes especies Gram-negativas) y con la secuencia consenso Fur generada a partir de secuencias Fur previamente descritas presentes en otros genes de *B. pertussis*. El alineamiento se realizó utilizando el programa Vector NTI. En color azul se indican las posiciones conservadas y en color amarillo los nucleótidos idénticos.

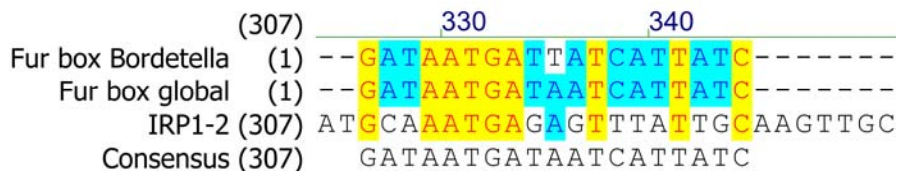


Fig. 12 Probable sitio de unión de la proteína Fur en el gen *irp1-2* de *B. pertussis*. El alineamiento de secuencias se realizó con la secuencia consenso Fur global (incluye las secuencias Fur de genes de diferentes especies Gram-negativas) y con la secuencia consenso Fur generada a partir de secuencias Fur presentes en otros genes de *B. pertussis* previamente descritas. El alineamiento se realizó utilizando el programa Vector NTI. En color azul se indican las posiciones conservadas y en color amarillo los nucleótidos idénticos.

Aunque considerablemente más pequeña que la proteína *mce* (*mammalian cell entry*) de *M. tuberculosis* involucrada en la invasión celular, **MceP** de *B. pertussis* posee una similitud de secuencia de 60 % con el dominio *mce* de dicho factor de virulencia.

Estudios previos indican que *B. pertussis* es capaz de invadir células del hospedador *in vitro*, aunque no se ha identificado ninguna invasina involucrada en este proceso. La sobreexpresión de MceP en condiciones fisiológicas podría estar involucrada en la capacidad de inmunoevasión de *B. pertussis*.

Finalmente, el análisis de la secuencia nucleotídica de **IRP1-3** revela la presencia de un dominio denominado Tpd posiblemente involucrado en el transporte de Fe^{2+} .

Por otra parte, se identificaron tres proteínas que incrementan su expresión en exceso de hierro: una posible acetil transferasa (**IIP1-9**) (*Iron Induced Protein*), una posible proteína de membrana externa (**IIP1-7**), y una enzima aconitato hidratasa (**AcnB**).

La sobreexpresión de **AcnB** resulta particularmente interesante. Como *E. coli*, *B. pertussis* posee dos enzimas aconitases diferentes, AcnA y AcnB. La proteína AcnB posee una remarcable similitud de secuencia con la proteína AcnB de *E. coli* (72 %). Las enzimas aconitases son proteínas que poseen hierro y sulfuro en su estructura y catalizan la conversión de citrato e isocitrato en el ciclo de ácido cítrico y de glioxilato. Varios estudios indican que la enzima menos estable, AcnB, es la principal enzima del ciclo de ácido cítrico la cuál se sintetiza principalmente durante el crecimiento exponencial, mientras que AcnA es la enzima inducida por stress más abundante durante la fase estacionaria [12]. Recientemente, Tang *et al.* [55] demostraron que la proteína AcnB de *E. Coli* forma homodimeros y que la transición monomero-dimero depende de la disponibilidad de hierro (**Fig. 13**).

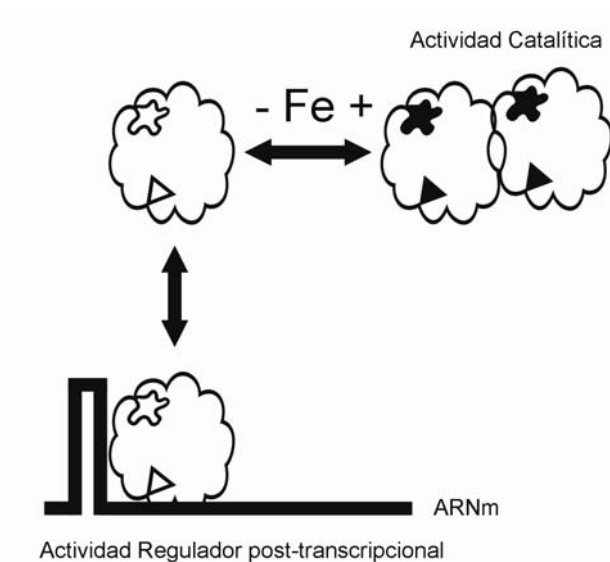


Fig. 13 Esquema ilustrativo de la probable doble funcionalidad de AcnB en función de su homología con AcnB de *E. coli*. AcnB de *B. pertussis* podría alternar entre un estado homodimérico con función catalítica o un estado monomérico con actividad de regulador post-transcripcional dependiendo de la disponibilidad de hierro. En limitación de hierro la interacción entre subunidades de AcnB disminuiría favorecida por la estabilidad de AcnB monomérica que sería capaz de reconocer y unirse a ARNm. La presencia de hierro en AcnB se indica con las figuras negras.

La región amino terminal de AcnB actúa como un sensor de Fe^{2+} que permite el cambio de AcnB de la forma dimero catalítico en condiciones de disponibilidad de hierro a la forma monomérica con capacidad de interacción con ARNm en condiciones de limitación de hierro, la cual eventualmente actuaría como un regulador post-transcripcional. En este estudio y en correlación con este modelo, la sobre-expresión de

AcnB en condiciones de exceso de hierro conduciría a la formación de dímeros de AcnB. Mientras que la forma monomérica de AcnB presente en limitación de hierro podría operar como una proteína de unión a ARNm ejerciendo una regulación post-transcripcional de genes relacionados al metabolismo de hierro.

5.3.3. ANÁLISIS COMPARATIVO DEL PROTEOMA DE FRACCIÓN ENRIQUECIDA EN PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *B. PERTUSSIS* CULTIVADA EN CONDICIONES DE DIFERENTE DISPONIBILIDAD DE HIERRO.

Las proteínas de membrana externa de bacterias Gram-negativas están involucradas en diversas funciones celulares tales como resistencia a antibióticos, transporte de nutrientes, señalización celular, adhesión a células del hospedador y virulencia en bacterias patógenas, entre otras [30]. Debido a su localización en la interfase entre la célula y el medio ambiente, las PME son particularmente relevantes en el desarrollo de estrategias para el control de infecciones.

Las proteínas de membrana son una de las fracciones más difíciles de analizar mediante 2-DE [36]. La hidrofobicidad de este tipo de proteínas dificulta la solubilización mediante el uso de protocolos comunes y provoca que una vez en el IPG tiendan a precipitar en su *pI*, lo cual reduce la transferencia a la segunda dimensión. En este estudio, se utilizó un método simple propuesto por Molloy *et al.* [37], para la obtención y separación de PME por 2-DE. Utilizando esta metodología, se obtuvo la fracción membrana enriquecida en proteínas de membrana externa que luego fue solubilizada en buffer 2-DE. Se incluyó trifluoroetanol (TFE) en el buffer 2-DE para mejorar la separación de proteínas de membrana durante el IEF. Este procedimiento fue previamente descrito por Deshusses *et al.* [14], y en acuerdo con sus resultados se obtuvo una notable mejoría en el número y resolución de las proteínas (spots).

En la **Figura 14**, se muestran geles 2-DE representativos de la fracción enriquecida en PME de *B. pertussis* empleando IPG de rango de pH 4-7 y 6-11.

La reproducibilidad (número y localización de spots) entre geles de la misma clase fue de 80 a 90 %. El coeficiente de correlación que resultó de la comparación entre el volumen de cada spot en un gel y el correspondiente valor de volumen de spot en el gel promedio de una clase (misma condición de cultivo) varió entre 0.912 y 0.988 (**Fig. 15**). El patrón 2-DE de PME de *B. pertussis* (pH 4-7) presentó una significativa similitud con los patrones previamente publicados de PME de *E. coli*, *S. typhimurum* y *Klebsiella pneumoniae* [36, 37]. En el caso de *B. pertussis*, se detectaron aproximadamente 200 proteínas (spots) con una masa molecular entre 20 y 135 kDa, independientemente de la condición de cultivo analizada. Cuando el IEF se realizó utilizando IPG alcalinos (pH 6-11), se detectaron 300 proteínas (spots) con una masa molecular entre 17 y 138 kDa. El *pI/MM* promedio del proteoma experimental fue 5.77/44.37 y 7.14/41.6 para rango de

pH 4-7 y 6-11, respectivamente. Nuevamente, estos datos se asemejan al valor teórico del sub-proteoma de proteínas con localización en membrana externa (5.94/52.3 kDa y 9.16/39.8 respectivamente). Cabe destacar que la discrepancia entre el valor promedio experimental de *pI* del sub-proteoma fracción enriquecida en proteínas de membrana externa para pH 6-11 y el correspondiente valor promedio teórico (dos unidades mayor) podría estar relacionada con el hecho de que las proteínas básicas son difíciles de separar mediante 2-DE, y por lo tanto muchas de ellas están ausentes cuando se analiza el patrón 2-DE experimental. Para mejorar este análisis se requiere ensayar diferentes condiciones, por ejemplo emplear IPG de pH alcalino en rangos más estrechos para expandir el patrón de referencia de proteínas alcalinas de *B. pertussis*.

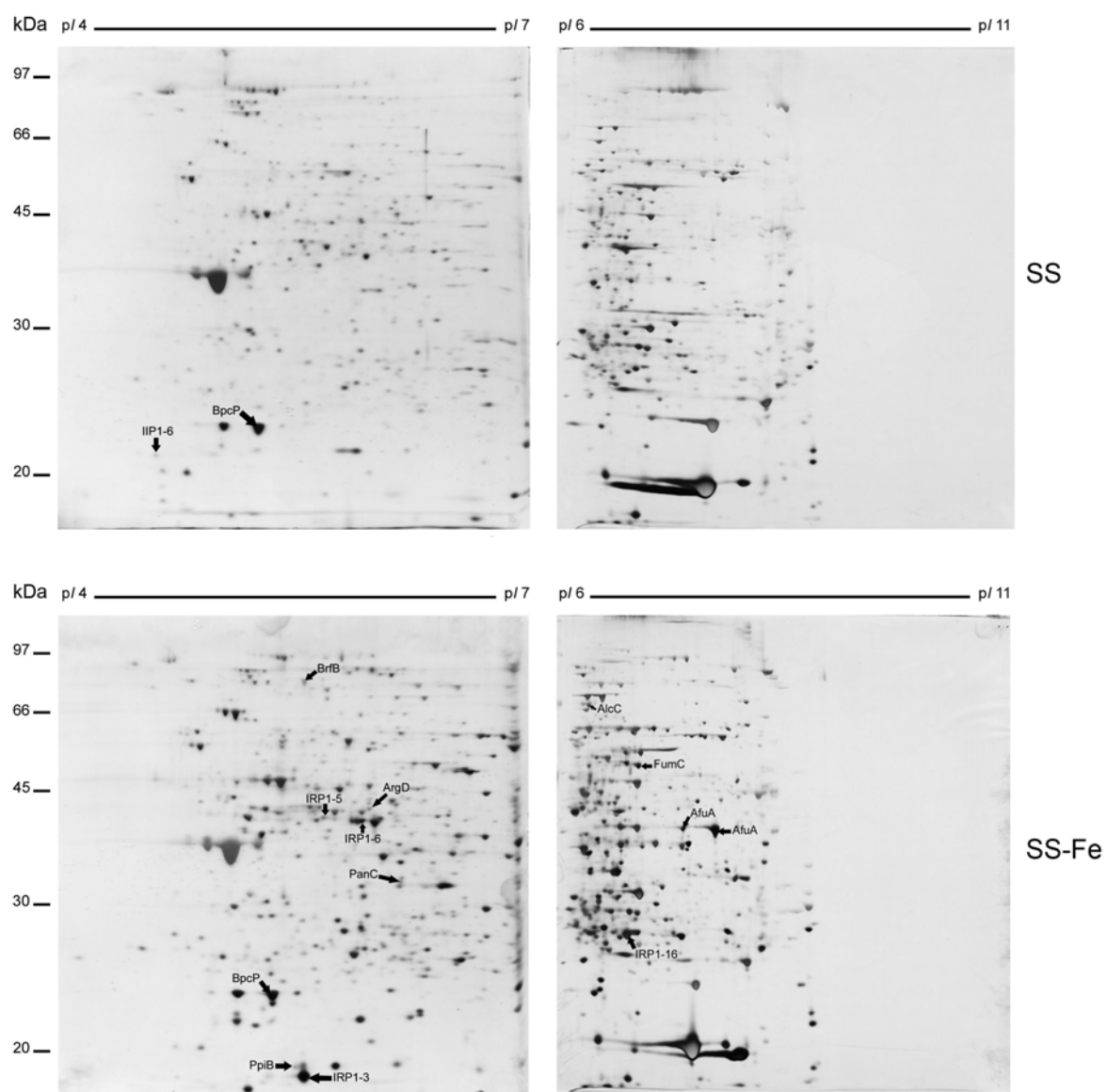


Fig. 14 Geles 2-DE representativos de la fracción enriquecida en PME de *B. pertussis* cultivada en medio con exceso (SS) y libre de hierro (SS-Fe). 300 µg de PME fueron separadas en geles IPG de 18 cm (pI 4-7 o pI 6-11, 10 % SDS-PAGE) y visualizadas mediante tinción con plata. Las proteínas identificadas por MALDI-ToF MS se indican con flechas y se detallan en la Tabla 2. La proteína con expresión diferencial aun no identificada se indica como IIP1-6 (*Iron Induced Protein*).

Para determinar la variación en la expresión de PME de *B. pertussis* cultivada en condiciones de exceso (SS) o limitación de hierro (SS-Fe), se realizó el análisis comparativo de geles 2-DE (pH 4-7 y 6-11). El análisis estadístico del volumen de spots promedio en cada condición de cultivo reveló la presencia de 13 proteínas (spots) con expresión diferencial: 1 con mayor expresión en exceso de hierro y 12 con mayor expresión en limitación de hierro (**Fig. 14** y **Fig. 16**). Estas proteínas fueron sometidas a digestión trípica y análisis mediante espectrometría de masa MALDI-ToF, lográndose la identificación de las siguientes proteínas expresadas en limitación de hierro: **PanC**, **ArgD**, **PpiB**, **BrfB**, **AlcC**, **FumC**, **AfuA**, **IRP1-16**, **IRP1-3**, **IRP1-5**, y **IRP1-6** (Tabla 2 y Fig. 17).

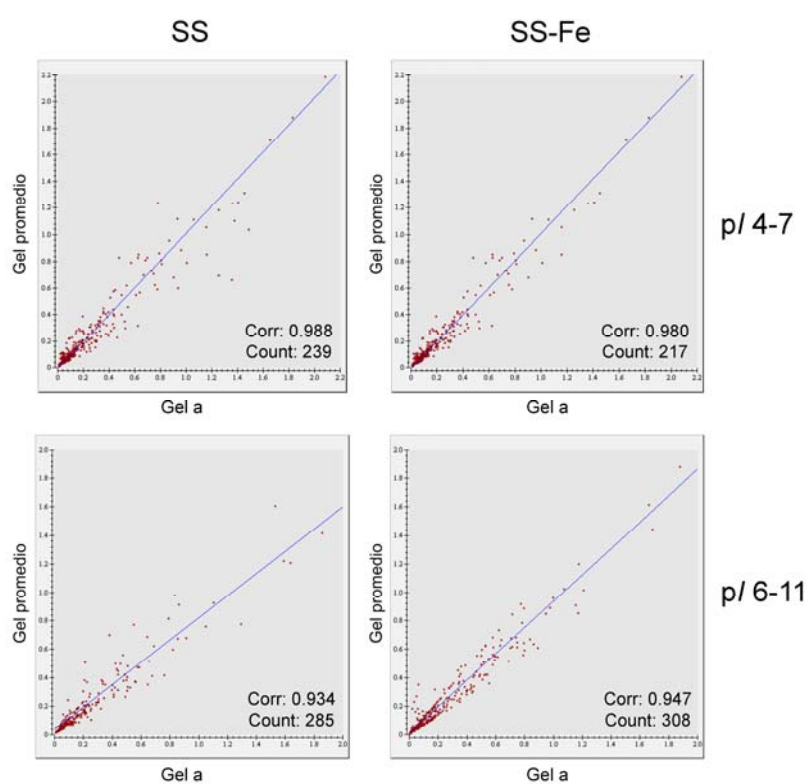


Fig. 15 Scatter plots representativos de la correlación entre cada spot de un gel 2-DE de fracción enriquecida en PME de *B. pertussis* y su respectivo spot en el gel promedio de una clase. Comparación de los volúmenes normalizados de spots de un gel perteneciente a una clase (eje x) y su correspondiente gel promedio (eje y), análisis 2-DE pH 4-7 y pH 6-11. (**SS**) fracción enriquecida en PME de *B. pertussis* cultivada en medio con exceso de hierro, (**SS-Fe**) fracción enriquecida en PME de *B. pertussis* cultivada en medio libre de hierro; (**count**) número de pares de spots en cada ensayo. Un coeficiente de correlación (**corr**) con un valor absoluto cercano a 1 indica un buen ajuste de correlación.

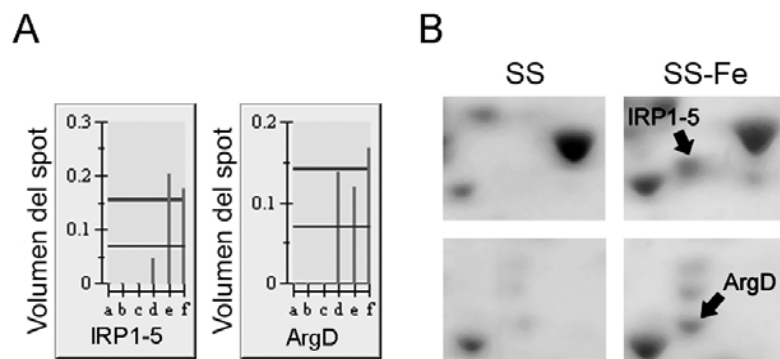


Fig. 16 Proteínas con expresión diferencial en fracción enriquecida en PME de *B. pertussis*. (A) Histogramas del volumen de spot en cada gel 2-DE de fracción enriquecida en PME de *B. pertussis* cultivada en medio con exceso de hierro (a, b, c) y medio libre de hierro (d, e, f). (B) Imagen ampliada del gel 2-DE mostrando la expresión diferencial de proteínas en bacterias cultivadas en medio con exceso de hierro (SS) y medio libre de hierro (SS-Fe).

Tabla 2. PME de *B. pertussis* identificadas por MALDI-TOF MS.

Nº	Nº ORF	Nombre	Score	Cobertura (%)	Condición de cultivo	Valor Spot ^a	Descripción	kDa/pI	kDa/pI
			MS/MASCOT			SS/SS-Fe		Teórico	Experimental
1	Bp2016	BrfB	86	56	Limitación de hierro	0.008/0.318	Probable receptor de ferrisideróforos	78.66/5.73	78.5/5.56
2	Bp3821	PanC	150	35	Limitación de hierro	0/0.06	pantoato-beta-alanina ligasa	31.72/5.93	33.5/6.19
3	Bp0800	IRP1-5	213	87	Limitación de hierro	0/0.141	probable deshidrogenasa de unión a zinc	33.69/5.5	39.7/5.68
4	Bp2747	IRP1-6	60	38	Limitación de hierro	0.106/0.780	probable transportador de solutos tipoABC	40.7/6.17	40/5.94
5	Bp1152	IRP1-3	138	56	Limitación de hierro	0/4.464	probable proteína exportada	19.36/6	22.3/5.49
6	Bp0451	ArgD	116	54	Limitación de hierro	0/0.142	succinil ornitina transaminasa	43.08/5.79	41/6
7	Bp1906	PpiB	76	57	Limitación de hierro	0/0.0480	peptidil-prolil cis-trans isomerasa	18.5/5.6	22/5.44
8	Bp2458	AlcC	161	44	Limitación de hierro	0/0.11	proteína biosíntesis de alcalignina	70.2/5.84	65/6.28
9	Bp0248	FumC	137	55	Limitación de hierro	0.11/0.86	fumarato hidratasa clase II	49.57/6.39	48/6.86
10	Bp1605	AfuA	51	37	Limitación de hierro	0.02/0.56	probable proteína de unión a Fe	37.5/8.8	39/7.41
11	Bp2770	IRP1-16	55	48	Limitación de hierro	0.36/1.49	probable deshidrogenasa	26.3/6.3	28/6.7
12	Bp3441	BpcP	80	37	Limitación/exceso de hierro	8.74/6.29	probable proteína, secuencia conservada	19.8/5.1	26.34/5.08

^a Porcentaje de la suma de todos los spost (volumen) en cada gel de la correspondiente clase.

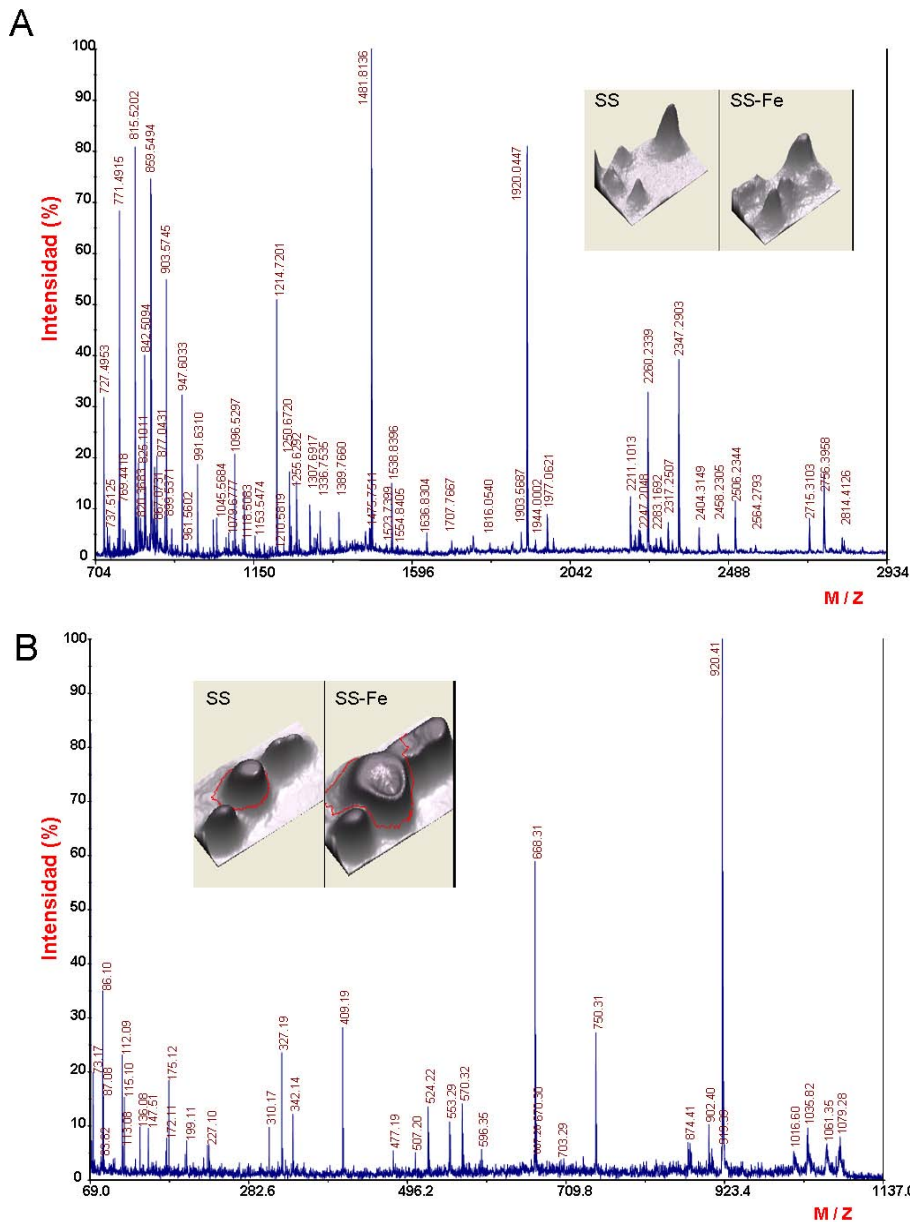


Fig. 17 Espectros representativos correspondientes a la identificación mediante MALDI-ToF MS de la proteína IRP1-5 (A) y MALDI-ToF MS/MS de la proteína IRP1-16 (B) de *B. pertussis*. Junto con el espectro, se muestran los gráficos 3-D de la imagen del respectivo spot en el gel 2-DE.

Entre las proteínas identificadas, dos son enzimas involucradas en el metabolismo de aminoácidos: **PanC** y **ArgD**. La enzima pantoato ligasa β -alanina, denominada **PanC**, cataliza la formación de pantotenato a partir de pantoato y β -alanina. La proteína **ArgD** es una enzima con probable doble funcionalidad diaminopimelato (DAP)-aminotransferasa y acetilornitina transaminasa que participa en la biosíntesis de arginina y lisina. La sobreexpresión de estas enzimas podría estar relacionada con el incremento del metabolismo de aminoácidos debido al exceso de glutamato durante la limitación en hierro. Por otra parte, la enzima ArgD de *B. pertussis* mostró una significativa homología con la proteína ArgD de *E. coli* (40 %), la cuál presenta actividad acetilornitina y DAP-aminotransferasa, esta última involucrada en la formación de DAP (**Fig. 18**). *B. pertussis* también posee una enzima denominada DapC con actividad DAP-aminotransferasa [16]. Sin embargo, a diferencia de ArgD, DapC no comparte

homología de secuencia con ArgD de *E. coli*. Aunque la doble funcionalidad de ArgD de *B. pertussis* aún debe ser demostrada, es posible suponer que participa en ambas rutas de metabolitos. Dado que DAP es un constituyente importante del peptidoglicano de muchas bacterias Gram-negativas, el aumento de expresión de ArgD podría reflejar una reestructuración o cambio en la composición de la membrana en respuesta a condiciones de escasez de hierro en el entorno de la bacteria. Además, DAP es un constituyente central de la citotoxina traqueal, un importante factor de virulencia de *B. pertussis* [10], y su incremento podría estar relacionado con un cambio en la expresión de esta toxina en condiciones fisiológicas (**Fig. 18**).

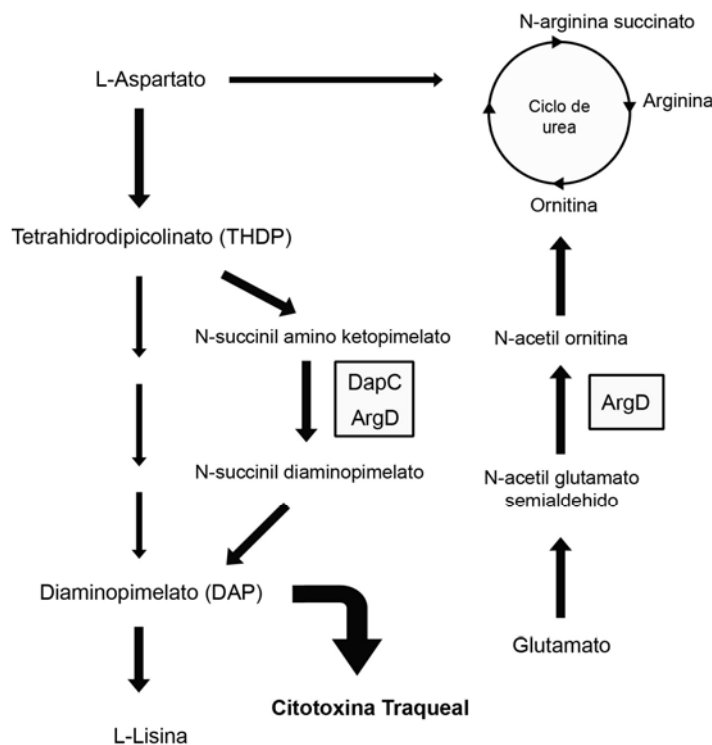


Fig. 18 Esquema de las rutas metabólicas en las cuales ArgD de *B. pertussis* posiblemente participa. La actividad acetil ornitina transaminasa de ArgD participa en el catabolismo de glutamato, el cual se encuentra en exceso en condiciones de limitación de hierro. La actividad succinil diaminopimelato (DAP) aminotransferasa de ArgD podría además estar involucrada en el metabolismo de Diaminopimelato (DAP), el cual es un componente de la citotoxina traqueal de *B. pertussis*. La sobreexpresión de esta enzima en condiciones de limitación de hierro podría incrementar la producción de citotoxina traqueal.

La proteína **AlcC** participa en la biosíntesis de alcalignina, uno de los principales sistemas de captura de hierro de *B. pertussis*.

Cinco de las once proteínas identificadas poseen una localización supuesta en el espacio periplásmico o en la membrana externa de *B. pertussis* (según TargetP, TopPred, LipoP). Dichas proteínas son: **BrfB**, posible receptor de ferrisideróforos; **AfuA**, posible proteína de unión a hierro; **IRP1-5**, posible deshidrogenada de unión a zinc; **IRP1-6**, posible proteína transportadora de solutos tipo ABC; e **IRP1-3**, posible proteína exportada.

La proteína **BrfB** de *B. pertussis* ha sido reconocida previamente como un posible receptor de sideróforos dependiente de TonB [4] cuya función en la adquisición de hierro aún debe ser demostrada. Estudios recientes [39] demostraron un aumento de transcripción de los genes *brfB*, *brfC* y otros genes involucrados en la adquisición de hierro durante la transición de fase logarítmica a fase estacionaria de crecimiento de *B. pertussis*. Los autores sugirieron que la transición a la fase estacionaria podría inducir un fenotipo similar al fenotipo inducido por limitación de hierro, ya sea en respuesta directa a la escasez de hierro en su sistema de estudio o de forma indirecta como un tipo de respuesta generalizada inducida por stress que acompaña el cambio a fase estacionaria.

La búsqueda en BLAST reveló que la proteína **IRP1-5** posee homología de secuencia con varias enzimas alcohol deshidrogenasas de bacterias Gram-negativas como por ejemplo *Burkholderia* sp., y que la proteína **IRP1-6** posee un alto grado de homología con numerosas proteínas de membrana transportadoras de solutos, entre ellas, una proteína de unión a aminoácidos periplásmica de *Burkholderia mallei* (59 %) y un receptor de ligandos extracelulares de *Burkholderia cenocepacia* (56 %).

Finalmente, **FumC**, **AfuA**, **IRP1-3** y **PpiB** se identificaron también como proteínas que incrementan su expresión en limitación de hierro cuando se analizaron proteínas totales de *B. pertussis* y ya fueron mencionadas previamente.

Varias proteínas de *B. pertussis* previamente descritas como proteínas reguladas por hierro (tales como BrfD, BrfE, BfeA o BhuR entre otras) no se encontraron en este estudio. Existen diferentes razones posibles que pueden explicar esta ausencia. Las proteínas de mayor masa molecular (> 80 kDa) comúnmente se pierden en el análisis 2-DE. Estas proteínas también pueden perderse durante el procedimiento de separación del conjunto de proteínas presentes en la muestra, ya sea durante la carga del IPG en el *reswelling tray* o debido a la precipitación de proteínas durante el IEF. Alternativamente, estas u otras proteínas reguladas por hierro podrían tener un nivel de expresión muy bajo el cuál escapa a la detección y análisis de proteínas llevado a cabo en este estudio. Cabe destacar que la proteína de aproximadamente 130 kDa que se detectó como inmunogénica mediante western blot de la fracción de proteínas de membrana externa de *B. pertussis* cultivada en medio libre de hierro (SS-Fe) en el Capítulo 4, no se encontró en el análisis 2-DE presentado en este capítulo. Probablemente su ausencia esté relacionada con su tamaño molecular el cual, como se mencionó, puede escapar al análisis 2-DE.

En resumen, el estudio del proteoma de *B. pertussis* permitió identificar proteínas con diversas funciones que aumentan significativamente su expresión en condiciones fisiológicas. La mayor expresión en condiciones fisiológicas de algunas de estas proteínas puede contribuir a comprender la patogénesis de *B. pertussis*. Por ejemplo, la

mayor expresión de SodA permitiría a la bacteria resistir el estallido respiratorio de neutrófilos incrementando su sobrevivencia y favoreciendo la inmunoevasión. La sobreexpresión de ArgD podría resultar en un aumento de producción de citotoxina traqueal, la cual causa ciliastosis en el epitelio respiratorio. El aumento de expresión de RpoA podría corresponderse con el cambio a una fase fenotípica regulada por Bvg más favorable para la colonización del epitelio. La sobreexpresión de FumC en condiciones fisiológicas podría indicar que en estas condiciones se favorece el desarrollo de biofilm como forma de persistencia. Además, se identificaron 10 nuevas proteínas con mayor expresión en limitación de hierro cuya función no ha sido caracterizada previamente. Entre estas proteínas, BrfB, BrfI, AfuA, IRP1-2, IRP1-3 y IRP1-6, podrían estar involucradas en la adquisición de hierro y, por su potencial localización en la superficie celular de *B. pertussis*, podrían participar en la interacción del microorganismo con las células del hospedador. La proteína identificada como MceP podría tener un rol en la invasión a células del hospedador, uno de los mecanismos de inmunoevasión que explicaría la difícil erradicación de este patógeno.

En este contexto, la relevancia de estas proteínas en la virulencia y el proceso infeccioso de *B. pertussis* continua siendo motivo de estudio. Por otra parte, por su potencial localización en membrana, la inmunogenicidad de algunas de estas proteínas es uno de los aspectos que se ha comenzado a estudiar con el fin de determinar si son capaces de inducir una respuesta inmune protectora. Los resultados obtenidos en este aspecto se mencionan a continuación.

5.3.4. ANÁLISIS SEROLÓGICO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA INDUCIDAS POR LIMITACIÓN DE HIERRO.

Los anticuerpos generados contra proteínas presentes en la superficie bacteriana son un componente esencial en la protección del hospedador contra futuras infecciones dado que son capaces reconocer al microorganismo infectante. Por esta razón, en este estudio se evaluó la inmunogenicidad de las proteínas inducidas en limitación de hierro identificadas a partir del análisis proteómico de la fracción enriquecida en proteínas de membrana externa. Las proteínas con mayor expresión en el fenotipo inducido por limitación de hierro fueron recuperadas del gel y cantidades equivalentes de cada proteína se utilizaron en ensayos de inmunodetección (dot blot) empleando IgG purificada de un pool de sueros de individuos infectados con *B. pertussis*. Proteínas totales de *B. pertussis* y lactoferrina humana se utilizaron como control positivo y negativo, respectivamente. Según se observa en la **Figura 19**, cuatro proteínas, FumC, AfuA, IRP1-16, e IRP1-3, reaccionaron con anticuerpos humanos inducidos por infección con *B. pertussis*, de las cuales solo IRP1-3 y AfuA tienen potencial localización en la superficie bacteriana según se evaluó empleando los programas de

predicción de localización denominados BOMP, TargetP y TopPred. Estas proteínas cuya expresión se incrementa en condiciones fisiológicas y a la vez son reconocidas por suero de individuos infectados, resultan atractivos candidatos a componente de vacunas contra *B. pertussis*. Anticuerpos dirigidos contra estas proteínas podrían evitar la colonización de *B. pertussis* a través de diferentes mecanismos, por ejemplo, la opsonización bacteriana, el bloqueo de la adhesión a células del hospedador, o interfiriendo con un sistema de captura de hierro esencial para la colonización. En particular, IRP1-3 mostró una señal más fuerte, lo cual sugiere que esta proteína se expresa durante la infección y es muy inmunogénica. IRP1-3 es una proteína probablemente asociada a la membrana externa cuya expresión aumenta significativamente durante la limitación de hierro. Más aun, entre las proteínas identificadas con expresión diferencial, es la proteína que posee un mayor incremento asociado al cambio a condiciones fisiológicas (ver Fig. 14 y Tabla 2), lo cual podría sugerir un rol en la patogénesis de *B. pertussis*.

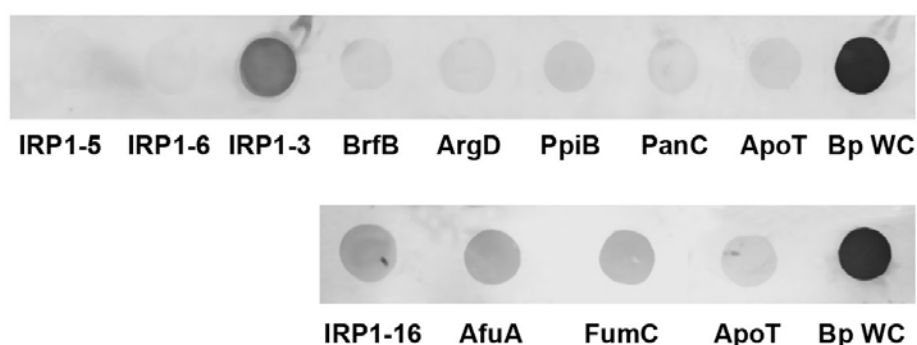


Fig. 19 Dot blot de proteínas de fracción enriquecida en PME de *B. pertussis* con expresión diferencial en limitación de hierro. Las proteínas fueron recuperadas del gel, transferidas a una membrana PVDF e incubadas con anticuerpos (fracción IgG) de un pool de sueros de individuos convalecientes infectados con *B. pertussis*. Proteínas totales de *B. pertussis* (Bp WC) y holo-transferrina humana (ApoT) fueron utilizadas como control positivo y negativo, respectivamente.

5.3.5. CAPACIDAD ANTIGÉNICA DE LAS PROTEÍNAS IRP1-3 Y AFUA.

Se evaluó la inmunogenicidad *in vivo* de las proteínas reconocidas por anticuerpos de individuos infectados con posible localización en la membrana externa de *B. pertussis*, IRP1-3 y AfuA. Según ya se discutió, ambas proteínas podrían estar involucradas en la adquisición de hierro. Las proteínas recuperadas a partir de geles 2-DE preparativos fueron utilizadas para inocular ratones BALC/c hembras. Se recuperó el suero previo a la inoculación inicial, 28 días posteriores a la inoculación y al finalizar el experimento de prueba (42 días). La producción de anticuerpos específicos se evaluó mediante dot blot según se detalla en la sección 5.2.12. En la **Figura 20** se muestra un dot blot representativo. Tanto IRP1-3 como AfuA resultaron inmunogénicas en ratones. La

presencia de anticuerpos anti-IRP1-3 y anti-AfuA se detectó a partir del día 28, luego de la primera inoculación. De esta forma se confirmó la actividad antigénica de estas proteínas en la forma en que fueron recuperadas del gel 2-DE.

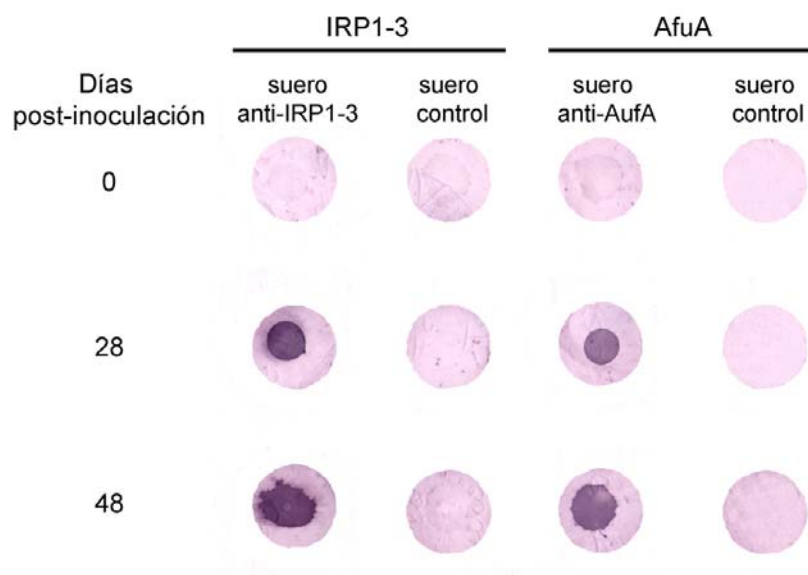


Fig. 20 Dot blot representativo de anticuerpos generados en ratón contra las proteínas IRP1-3 y AfuA de *B. pertussis*. Las proteínas IRP1-3 y AfuA fueron recuperadas del gel, transferidas a una membrana PVDF e incubadas con suero de ratón inoculado con IRP1-3 o AfuA, respectivamente. Las muestras de suero evaluadas fueron obtenidas previo a la inoculación inicial (día 0), 28 días y 48 días post-inoculación. Muestras de suero provenientes de ratones inoculados con PBS (suero control) fueron utilizadas como control negativo.

5.3.6. ANTICUERPOS ANTI-IRP1-3 Y ANTI-AFU A RECONOCEN ESTRUCTURAS DE SUPERFICIE EN *B. PERTUSSIS*.

Para determinar el título de anticuerpos anti-IRP1-3 y anti-AfuA en los sueros de ratón y evaluar la capacidad de dichos anticuerpos de reconocer estos antígenos en la superficie de *B. pertussis* se realizaron ensayos de ELISA empleando placas sensibilizadas con células enteras de *B. pertussis* cultivadas en medio con exceso de hierro (SS) o medio libre de hierro (SS-Fe) como antígeno. El título promedio de anticuerpos anti-IRP1-3 en los sueros evaluados (día 42 post-inoculación inicial) resultó significativamente mayor cuando se utilizaron células enteras cultivadas en SS-Fe como antígeno (1.325 ± 0.047) en comparación con el valor obtenido con células enteras cultivadas en SS (0.536 ± 0.043). De manera similar, el título promedio de anticuerpos anti-AfuA en los sueros, aunque menor que en el caso de IRP1-3, fue significativamente mayor para células enteras cultivadas en SS-Fe (0.448 ± 0.032) en comparación al valor obtenido con células enteras cultivadas en SS (0.325 ± 0.026). El título promedio de los sueros normales (controles) empleando células enteras SS-Fe o células enteras SS como antígeno (0.188 ± 0.029 y 0.191 ± 0.033 , respectivamente) resultó negativo en ambos casos. Estos resultados indican que tanto los anticuerpos anti-IRP1-3 como los anticuerpos anti-AfuA son capaces de reconocer estructuras presentes en la superficie

de *B. pertussis* las cuales se expresan en mayor proporción en bacterias cultivadas en limitación de hierro. Estos resultados también confirman la localización en la superficie celular de *B. pertussis* de dichos antígenos.

5.3.7. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ANTICUERPOS INDUCIDOS CONTRA IRP1-3 Y AFUA.

Para evaluar la actividad biológica de los anticuerpos inducidos contra IRP1-3 y AfuA, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* cuyos resultados se describen a continuación.

5.3.7.1. Actividad Aglutinante de los sueros anti-IRP1-3 y anti-AfuA.

La aglutinación bacteriana promovida por anticuerpos es un mecanismo de defensa importante dado que promueve eliminación de microorganismos patógenos. En el caso de *B. pertussis*, y según se discutió en el Capítulo 2, los anticuerpos contra las proteínas denominadas fimbrias funcionan como aglutininas disminuyendo significativamente la capacidad de adhesión a células epiteliales de *B. pertussis*. Para evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-IRP1-3 y anti-AfuA de inducir la aglutinación de *B. pertussis* se realizaron ensayos de aglutinación empleando bacterias cultivadas en limitación de hierro que expresan la proteína fluorescente verde GFP y concentraciones decrecientes del anticuerpo en estudio. Según se observa en la **Figura 21**, los anticuerpos contra la proteína AfuA inducen la aglutinación de *B. pertussis* aún en la menor concentración de anticuerpos evaluada (dil 1/8). Por otra parte, aunque el suero anti-IRP1-3 sin diluir (s/dil) mostró indicios de aglutinación de *B. pertussis*, para el resto de las concentraciones de suero anti-IRP1-3 evaluadas no se observó actividad aglutinante significativa. Esto puede deberse al tipo de antígeno o a la concentración de anticuerpos en el suero la cual podría no resultar aglutinante en la condiciones ensayadas.

5.3.7.2. Actividad Oponizante de los sueros Anti-IRP1-3 y anti-AfuA.

Como se mencionó anteriormente, la presencia de anticuerpos opsonizantes es crítica para inducir la actividad celular bactericida de neutrófilos. Según se muestra en la **Figura 22**, tanto los anticuerpos anti-IRP1-3 como los anticuerpos anti-AfuA se comportan como opsoninas. Estos resultados no solo sugieren nuevamente la localización de AfuA e IRP1-3 en la superficie bacteriana sino que señalan a estas proteínas como atractivos componentes de nuevas vacunas.

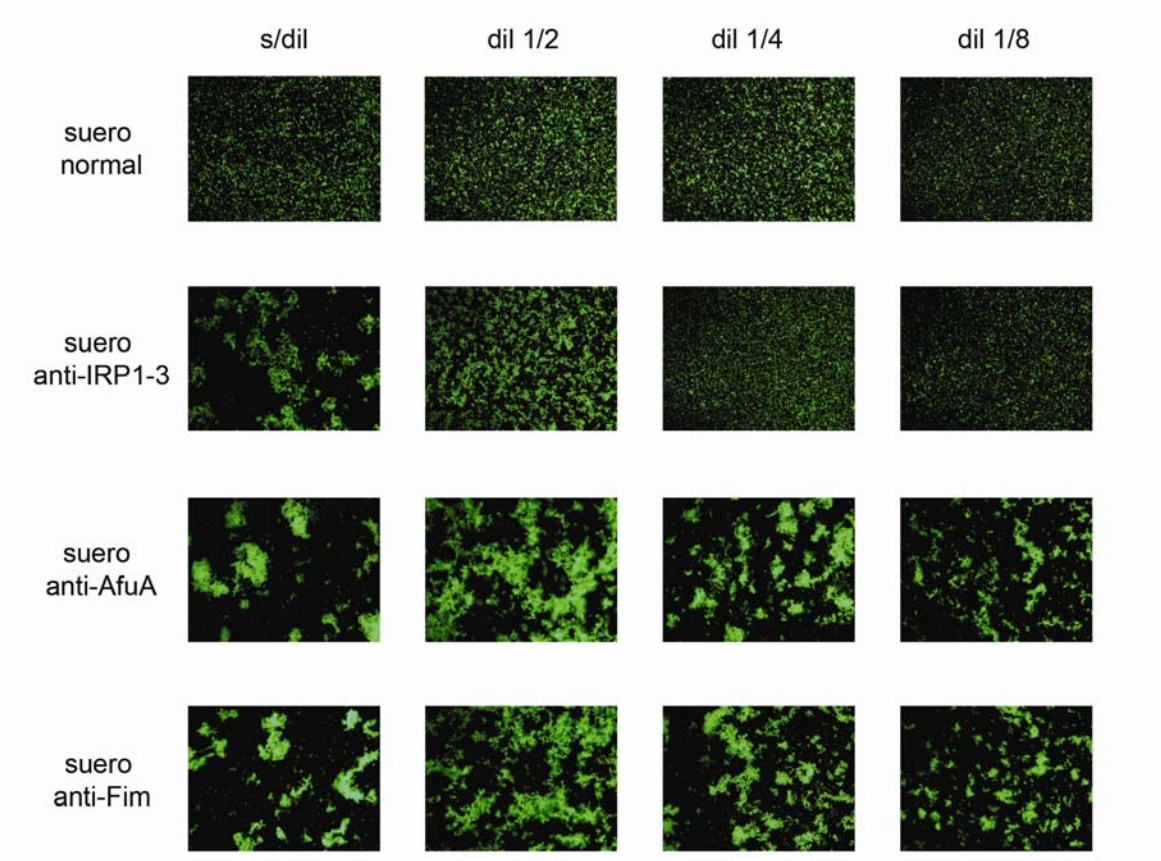


Fig. 21 Aglutinación de *B. pertussis* en presencia de anticuerpos anti-IRP1-3 y AfuA. *B. pertussis* cepa Tohama expresando la proteína verde fluorescente GFP se cultivo en medio libre de hierro. Las bacterias se incubaron durante 30 min a 37 °C en solución PBS suplementado con 10 % de suero de ratón no inmune (control negativo), suero de ratón anti-IRP1-3, suero de ratón anti-AfuA o suero de ratón anti-Fim (control positivo). Se muestran paneles representativos de 3 experimentos independientes.

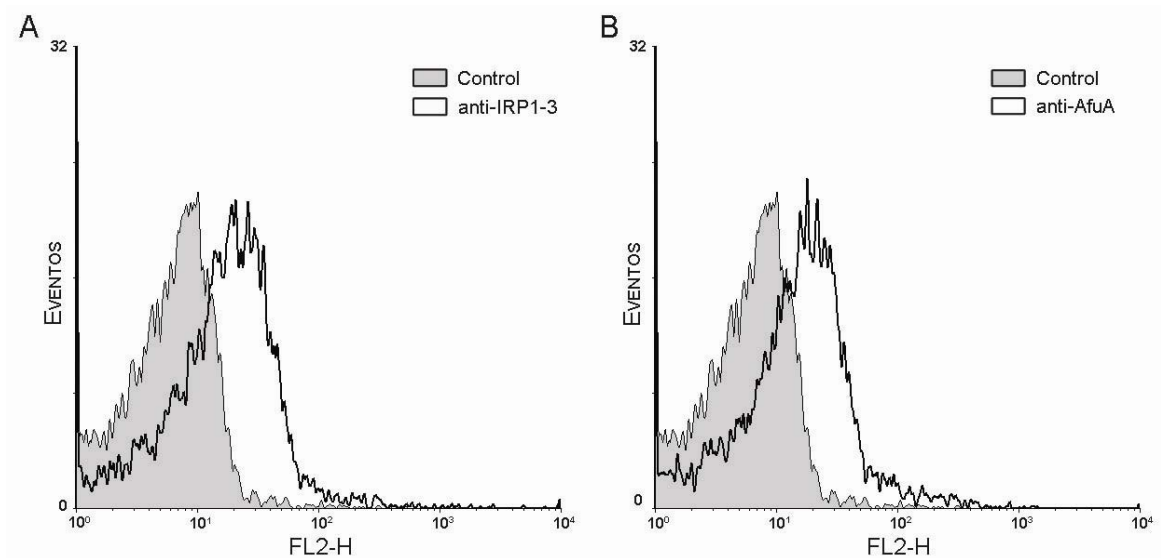


Fig. 22 Opsonización de *B. pertussis* en presencia de anticuerpos anti-IRP1-3 y AfuA. *B. pertussis* cepa Tohama se cultivó en medio libre de hierro. 15 µl de bacterias (1×10^5 bacterias ml⁻¹) se incubaron con 5 µl de suero de ratón anti-IRP1-3 (A), suero anti-AfuA (B) o suero normal de ratón durante 1 h a 4 °C (control). Luego de los correspondientes lavados, las bacterias se incubaron con anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados con PE durante 1 h a 4 °C, y se analizaron por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de 3 experimentos independientes.

5.4 CONCLUSIONES.

En este capítulo se estudió el perfil global de expresión de proteínas de *B. pertussis* en respuesta a la limitación de hierro condición ambiental que este patógeno enfrenta *in vivo*. La escasez de hierro es un factor crítico para el desarrollo de la infección y en general afecta la patogenicidad de los microorganismos invasores. El análisis proteómico de *B. pertussis* bajo estas condiciones nos permitió identificar proteínas con diferente funcionalidad cuya expresión se ve influenciada por la disponibilidad de hierro. Algunas de estas proteínas parecen estar involucradas en la adquisición de hierro y, por su potencial localización en la superficie celular de *B. pertussis*, podrían participar en la interacción del microorganismo con las células del hospedador. Otras proteínas identificadas son potenciales factores de virulencia que podrían ayudar a explicar algunos aspectos de la patogenicidad e inmunoevasión de *B. pertussis* que aún no han sido esclarecidos. La evaluación de la inmunogenicidad de las proteínas inducidas en limitación de hierro identificadas a partir del análisis proteómico de la fracción enriquecida en proteínas de membrana externa, permitió detectar proteínas que reaccionan específicamente con suero de individuos infectados, dos de ellas con probable localización en la superficie celular. Mediante ensayos de evaluación de capacidad antigénica en ratones se demostró que estas proteínas (IRP1-3 y AfuA) son inmunogénicas *in vivo*. Ensayos de ELISA empleando células enteras de *B. pertussis* demostraron que tanto los anticuerpos anti-IRP1-3 como anti-AfuA son capaces de reconocer dichos antígenos, los cuales se localizan evidentemente en la superficie celular de *B. pertussis*. El título de anticuerpos determinado por ELISA fue mayor cuando se emplearon células enteras cultivadas en limitación de hierro como antígeno, lo cual confirma la expresión diferencial de estos antígenos en condiciones fisiológicas. Paralelamente, los ensayos de actividad biológica demostraron que los anticuerpos contra una de ellas (AfuA) son capaces de inducir la aglutinación de *B. pertussis* y que los anticuerpos inducidos contra ambas proteínas (IRP1-3 y AfuA) se comportan como opsoninas, lo cual no solamente confirma la localización de AfuA e IRP1-3 en la superficie bacteriana sino que también señala a estas proteínas como posibles componentes de nuevas vacunas capaces de reconocer al fenotipo infectante cualquiera sea la fase de virulencia que este microorganismo presente.

5.5 REFERENCIAS.

- [1] Agiato L.A., Dyer D.W. Siderophore production and membrane alterations by *Bordetella pertussis* in response to iron starvation. *Infect Immun* 1992. 60 (1): 117-23.
- [2] Antoine R., Alonso S., Raze D., Coutte L., Lesjean S., Willery E., et al. New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol*. 2000. 182 (20): 5902-5.
- [3] Beall B., Sanden G.N. A *Bordetella pertussis* fepA homologue required for utilization of exogenous ferric enterobactin. *Microbiology*. 1995. 141 (Pt 12): 3193-205.
- [4] Beall B. Two iron-regulated putative ferric siderophore receptor genes in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis*. *Res Microbiol*. 1998. 149 (3): 189-201.
- [5] Biemann K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed Environ Mass Spectrom*. 1988. 16 (1-12): 99-111.
- [6] Blum H., Beier H., Gross H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 1987. 8 (2): 93-9.
- [7] Boucher P.E., Maris A.E., Yang M.S., Stibitz S. 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*. 2003. 11 (1): 163-73.
- [8] Brickman T.J., Vanderpool C.K., Armstrong S.K. Heme transport contributes to in vivo fitness of *Bordetella pertussis* during primary infection in mice. *Infect Immun*. 2006. 74 (3): 1741-4.
- [9] Carbonetti N.H., Fuchs T.M., Patamawenu A.A., Irish T.J., Deppisch H., Gross R. Effect of mutations causing overexpression of RNA polymerase alpha subunit on regulation of virulence factors in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol*. 1994. 176 (23): 7267-73.
- [10] Cookson B.T., Cho H.L., Herwaldt L.A., Goldman W.E. Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 1989. 57 (7): 2223-9.
- [11] Cordwell S.J., Nouwens A.S., Walsh B.J. Comparative proteomics of bacterial pathogens. *Proteomics*. 2001. 1 (4): 461-72.
- [12] Cunningham L., Gruer M.J., Guest J.R. Transcriptional regulation of the aconitase genes (acnA and acnB) of *Escherichia coli*. *Microbiology*. 1997. 143 (Pt 12): 3795-805.
- [13] DeShazer D., Bannan J.D., Moran M.J., Friedman R.L. Characterization of the gene encoding superoxide dismutase of *Bordetella pertussis* and construction of a SOD-deficient mutant. *Gene*. 1994. 142 (1): 85-9.
- [14] Deshusses J.M., Burgess J.A., Scherl A., Wenger Y., Walter N., Converset V., et al. Exploitation of specific properties of trifluoroethanol for extraction and separation of membrane proteins. *Proteomics*. 2003. 3 (8): 1418-24.
- [15] Franzon V.L., Arondel J., Sansonetti P.J. Contribution of superoxide dismutase and catalase activities to *Shigella flexneri* pathogenesis. *Infect Immun*. 1990. 58 (2): 529-35.
- [16] Fuchs T.M., Schneider B., Krumbach K., Eggeling L., Gross R. Characterization of a *bordetella pertussis* diaminopimelate (DAP) biosynthesis locus identifies dapC, a novel gene coding for an N-succinyl-L,L-DAP aminotransferase. *J Bacteriol*. 2000. 182 (13): 3626-31.
- [17] Garcia-del P.F., Foster J.W., Maguire M.E., Finlay B.B. Characterization of the micro-environment of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles within MDCK epithelial cells. *Mol Microbiol*. 1992. 6 (22): 3289-97.

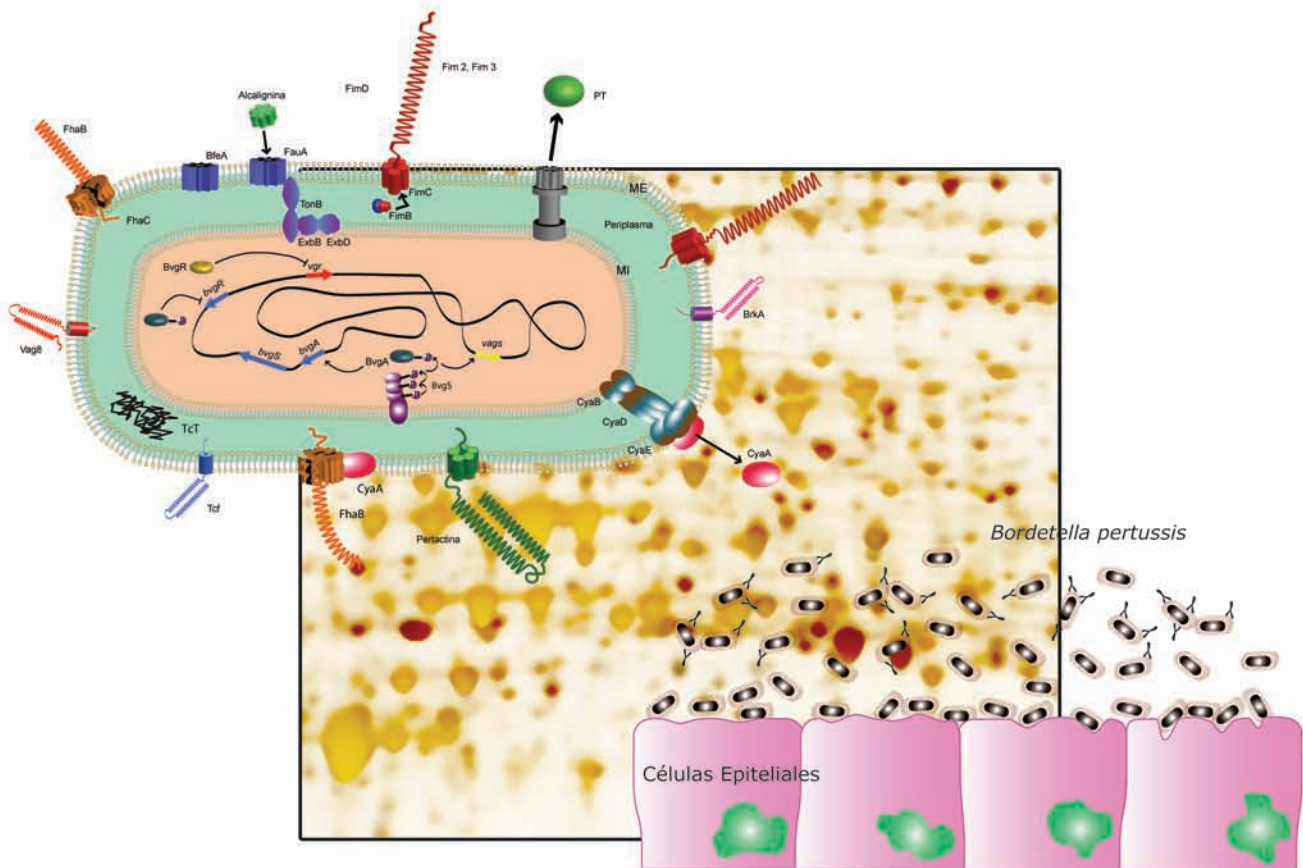
- [18] Gharahdaghi F., Weinberg C.R., Meagher D.A., Imai B.S., Mische S.M. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis*. 1999. 20 (3): 601-5.
- [19] Gorg A., Postel W., Gunther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 1988. 9 (9): 531-46.
- [20] Graeff-Wohlleben H., Killat S., Banemann A., Guiso N., Gross R. Cloning and characterization of an Mn-containing superoxide dismutase (SodA) of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol*. 1997. 179 (7): 2194-201.
- [21] Haas A., Brehm K. Superoxide dismutases and catalases- biochemistry, molecular biology and some biomedical aspects. *Genet Eng Biotechnol*. 1993. 13: 243-69.
- [22] Han M.J., Lee S.Y. The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future prospects. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006. 70 (2): 362-439.
- [23] Hassett D.J., Cohen M.S. Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells. *FASEB J*. 1989. 3 (14): 2574-82.
- [24] Hassett D.J., Howell M.L., Ochsner U.A., Vasil M.L., Johnson Z., Dean G.E. An operon containing *fumC* and *sodA* encoding fumarase C and manganese superoxide dismutase is controlled by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: *fur* mutants produce elevated alginate levels. *J Bacteriol*. 1997. 179 (5): 1452-9.
- [25] Heim S., Ferrer M., Heuer H., Regenhardt D., Nimtz M., Timmis K.N. Proteome reference map of *Pseudomonas putida* strain KT2440 for genome expression profiling: distinct responses of KT2440 and *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 to iron deprivation and a new form of superoxide dismutase. *Environ Microbiol*. 2003. 5 (12): 1257-69.
- [26] Hunkapiller M.W., Lujan E., Ostrander F., Hood L.E. Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. *Methods Enzymol*. 1983. 91: 227-36.
- [27] Ishihama A. Role of the RNA polymerase alpha subunit in transcription activation. *Mol Microbiol*. 1992. 6 (22): 3283-8.
- [28] Jones A.M., Boucher P.E., Williams C.L., Stibitz S., Cotter P.A. Role of BvgA phosphorylation and DNA binding affinity in control of Bvg-mediated phenotypic phase transition in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol*. 2005. 58 (3): 700-13.
- [29] Kirby A.E., Metzger D.J., Murphy E.R., Connell T.D. Heme utilization in *Bordetella avium* is regulated by RhuI, a heme-responsive extracytoplasmic function sigma factor. *Infect Immun*. 2001. 69 (11): 6951-61.
- [30] Koebnik R., Locher K.P., Van G.P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol*. 2000. 37 (2): 239-53.
- [31] Lieber M., Smith B., Szakal A., Nelson-Rees W., Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer*. 1976. 17 (1): 62-70.
- [32] Menozzi F.D., Gantiez C., Locht C. Identification and purification of transferrin- and lactoferrin-binding proteins of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun*. 1991. 59 (11): 3982-8.
- [33] Mey A.R., Wyckoff E.E., Kanukurthy V., Fisher C.R., Payne S.M. Iron and *fur* regulation in *Vibrio cholerae* and the role of *fur* in virulence. *Infect Immun*. 2005. 73 (12): 8167-78.
- [34] Mikkelsen H., Duck Z., Lilley K.S., Welch M. Interrelationships between colonies, biofilms, and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2007. 189 (6): 2411-6. Epub 007 Jan 12.

- [35] Mills M., Payne S.M. Genetics and regulation of heme iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol.* 1995. 177 (11): 3004-9.
- [36] Molloy M.P., Herbert B.R., Slade M.B., Rabilloud T., Nouwens A.S., Williams K.L., et al. Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur J Biochem.* 2000. 267 (10): 2871-81.
- [37] Molloy M.P., Phadke N.D., Maddock J.R., Andrews P.C. Two-dimensional electrophoresis and peptide mass fingerprinting of bacterial outer membrane proteins. *Electrophoresis.* 2001. 22: 1686-96.
- [38] Nagel J., de Graaf S., Schijf-Evers D. Improved serodiagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis* by determination of IgG anti-LPF antibody levels. *Dev Biol Stand.* 1985. 61: 325-30.
- [39] Nakamura M.M., Liew S.Y., Cummings C.A., Brinig M.M., Dieterich C., Relman D.A. Growth phase- and nutrient limitation-associated transcript abundance regulation in *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 2006. 74 (10): 5537-48.
- [40] Niederhoffer E.C., Naranjo C.M., Bradley K.L., Fee J.A. Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (sodA and sodB) genes by the ferric uptake regulation (fur) locus. *J Bacteriol.* 1990. 172 (4): 1930-8.
- [41] Ochsner U.A., Johnson Z., Vasil M.L. Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, phu and has, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 2000. 146 (Pt 1): 185-98.
- [42] Panter S.S. Release of iron from hemoglobin. *Methods Enzymol.* 1994. 231: 502-14.
- [43] Park S.J., Gunsalus R.P. Oxygen, iron, carbon, and superoxide control of the fumarase fumA and fumC genes of *Escherichia coli*: role of the arcA, fnr, and soxR gene products. *J Bacteriol.* 1995. 177 (21): 6255-62.
- [44] Parkhill J., Sebahia M., Preston A., Murphy L.D., Thomson N., Harris D.E., et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet.* 2003. 35 (1): 32-40.
- [45] Passerini de Rossi B.N., Friedman L.E., Gonzalez Flecha F.L., Castello P.R., Franco M.A., Rossi J.P. Identification of *Bordetella pertussis* virulence-associated outer membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett.* 1999. 172 (1): 9-13.
- [46] Pizer L.I. Glycine Synthesis and metabolism in *Escherichia Coli* *J Bacteriol.* 1965. 89: 1145-50.
- [47] Redhead K., Hill T., Chart H. Interaction of lactoferrin and transferrins with the outer membrane of *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol.* 1987. 133 (4): 891-8.
- [48] Rodriguez M.E., Hellwig S.M., Hozbor D.F., Leusen J., van der Pol W.L., van de Winkel J.G. Fc receptor-mediated immunity against *Bordetella pertussis*. *J Immunol.* 2001. 167 (11): 6545-51.
- [49] Rossi M.S., Fetherston J.D., Letoffe S., Carniel E., Perry R.D., Ghigo J.M. Identification and characterization of the hemophore-dependent heme acquisition system of *Yersinia pestis*. *Infect Immun.* 2001. 69 (11): 6707-17.
- [50] Sabounchi-Schutt F., Astrom J., Olsson I., Eklund A., Grunewald J., Bjellqvist B. An immobilized DryStrip application method enabling high-capacity two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 2000. 21 (17): 3649-56.
- [51] Sanchez J.C., Hochstrasser D., Rabilloud T. In-gel sample rehydration of immobilized pH gradient. *Methods Mol Biol.* 1999. 112: 221-5.
- [52] Schwyn B., Neilands J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem.* 1987. 160 (1): 47-56.

- [53] Serra D., Bosch A., Russo D.M., Rodriguez M.E., Zorreguieta A., Schmitt J., et al. Continuous nondestructive monitoring of *Bordetella pertussis* biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy and other corroborative techniques. *Anal Bioanal Chem.* 2007. 387 (5): 1759-67.
- [54] Stojiljkovic I., Hantke K. Transport of haemin across the cytoplasmic membrane through a haemin-specific periplasmic binding-protein-dependent transport system in *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol.* 1994. 13 (4): 719-32.
- [55] Tang Y., Guest J.R., Artymiuk P.J., Green J. Switching aconitase B between catalytic and regulatory modes involves iron-dependent dimer formation. *Mol Microbiol.* 2005. 56 (5): 1149-58.
- [56] Thalen M., Venema M., van d.I., Berwald L., Beuvery C., Martens D., et al. Effect of relevant culture parameters on Pertussis Toxin expression by *Bordetella pertussis*. *Biologicals.* 2006. 34 (3): 213-20.
- [57] Tsois R.M., Baumler A.J., Heffron F. Role of *Salmonella typhimurium* Mn-superoxide dismutase (SodA) in protection against early killing by J774 macrophages. *Infect Immun.* 1995. 63 (5): 1739-44.
- [58] Vanderpool C.K., Armstrong S.K. The *Bordetella bhv* locus is required for heme iron utilization. *J Bacteriol.* 2001. 183 (14): 4278-87.
- [59] Wandersman C., Stojiljkovic I. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr Opin Microbiol.* 2000. 3 (2): 215-20.
- [60] West S.E., Sparling P.F. Aerobactin utilization by *Neisseria gonorrhoeae* and cloning of a genomic DNA fragment that complements *Escherichia coli* fluB mutations. *J Bacteriol.* 1987. 169 (8): 3414-21.
- [61] Wolfe D.N., Goebel E.M., Bjornstad O.N., Restif O., Harvill E.T. The O Antigen Enables *Bordetella parapertussis* To Avoid *Bordetella pertussis*-Induced Immunity. *Infect Immun.* 2007 Oct. 75 (10): 4972-9.

CAPITULO 6

DISCUSIÓN GENERAL



6. DISCUSIÓN GENERAL.

148

6. DISCUSIÓN GENERAL.

La tos convulsa continúa siendo una de las principales enfermedades infantiles inmunoprevenibles. Tanto en nuestro país como en el resto del mundo la implementación de programas de vacunación durante casi 60 años no ha logrado evitar la continua circulación de este patógeno en la población. Los datos epidemiológicos indican también un cambio en el rango etario de casos. Cada vez son más comunes los casos de tos convulsa asintomática o leve en niños y adolescentes. Esta población constituye un reservorio importante y una continua fuente de transmisión para lactantes y niños parcialmente inmunizados.

Parte de la situación epidemiológica actual se asocia con la deficiente protección contra la colonización que brindan las vacunas actuales. A la inmunidad de corto plazo que confieren la infección o la inmunización, se suma la inmunoselección de cepas dirigida por vacunación. Las diferencias entre el fenotipo vacunal y el fenotipo infectante pueden explicarse en parte por la deficiencia en la prevención de la colonización de las vacunas en uso que ha permitido la continua circulación del patógeno en la población. Sumado a esto, si la transmisión de *B. pertussis* de persona a persona ocurre como se postula, en fase avirulenta o intermedia, las vacunas celulares o acelulares (bacterias en fase virulenta o antígenos propios de esta fase, respectivamente) podrían no inducir una respuesta inmune capaz de reconocer eficientemente a las bacterias que ingresan al hospedador.

Para resolver esta situación se requiere una mejor caracterización de los eventos de colonización del epitelio respiratorio y de los factores involucrados en este proceso. Es necesario también avanzar en la caracterización del fenotipo infectante e identificar inmunógenos cuya expresión se manifieste desde los estadios tempranos de colonización, independientemente de la fase de virulencia que el microorganismo presente, y sean capaces de inducir una respuesta inmune protectora efectiva en bloquear la etapa inicial de colonización.

En el presente trabajo se empleó un modelo de colonización *in vitro* para evaluar la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales, determinar los factores de virulencia involucrados en este proceso y determinar cuáles de los anticuerpos dirigidos contra factores de virulencia regulados por el sistema Bvg están involucrados en el bloqueo de la adhesión bacteriana. Los resultados obtenidos permiten concluir que, entre los factores de virulencia regulados por Bvg, FHA es el principal factor involucrado en la adhesión de *B. pertussis* en fase virulenta o intermedia a células epiteliales. Los anticuerpos dirigidos contra FHA y contra Fim interfieren la adhesión a células epiteliales. En el caso de los anticuerpos anti-Fim, su actividad biológica se relaciona con su capacidad de aglutinación, mientras que en el caso de los anticuerpos anti-FHA su actividad parece involucrar su capacidad de bloquear los dominios de adhesión

presentes en esta proteína. Sin embargo, estudios anteriores indican que los anticuerpos dirigidos contra estos antígenos no se comportan como opsoninas ni promueven la actividad celular bactericida crítica para lograr la eliminación. Este resultado pone en evidencia la importancia de la multivalencia en la formulación de vacunas contra este patógeno. Los antígenos incluidos en la vacunas contra este microorganismo, que presenta una gran variedad de factores de virulencia, deben inducir la producción de anticuerpos capaces de mediar mecanismos de defensa diferentes y a la vez sinérgicos, como por ejemplo el bloqueo de adhesinas y toxinas, la opsonofagocitosis, entre otros.

La invasión celular durante la colonización es un mecanismo de inmunoevasión empleado por numerosos microorganismos patógenos. En varios casos este proceso involucra la participación de factores bacterianos que reconocen estructuras presentes en la célula blanco y son necesarios para la invasión. En el caso de *B. pertussis*, no pudimos identificar ningún factor de virulencia regulado por el sistema BvgAS del cual dependa la invasión bacteriana. Según nuestros resultados, el ingreso de *B. pertussis* a células respiratorias depende básicamente de que éstas puedan adherirse, lo cual vuelve aún más importante el bloqueo de la adhesión para evitar este posible mecanismo de inmunoevasión. Por el contrario, la persistencia intracelular parece depender del estado de virulencia de *B. pertussis*. La expresión de toxinas, PT y ACT, afecta la capacidad de sobrevivir a corto y largo plazo. Este resultado sugiere que el fenotipo intermedio, caracterizado por la ausencia de expresión de estas toxinas, sería el más apto para la sobrevivir intracelular. En dichas condiciones, el resultado de la interacción de *B. pertussis* con células epiteliales o células del sistema inmune podría favorecer la persistencia en el hospedador. Aún durante cortos periodos de tiempo, la capacidad de sobrevivir dentro de las células del hospedador podría proporcionar a esta bacteria un mecanismo de inmunoevasión y/o un nicho intracelular transitorio antes o durante la transmisión a un nuevo hospedador.

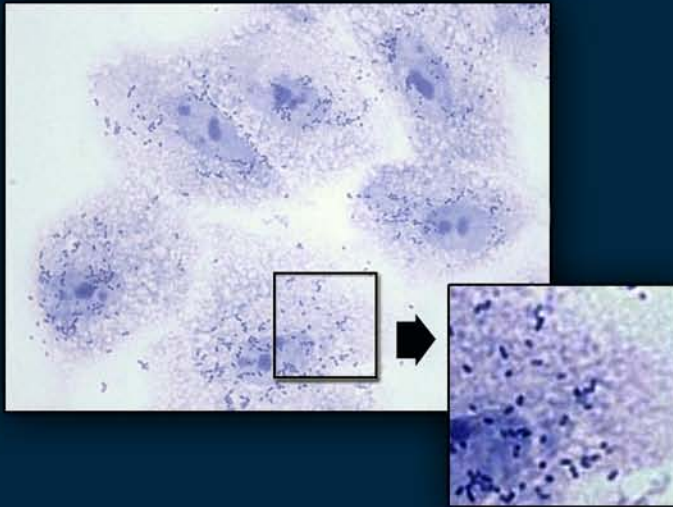
El orden en que se expresan los factores de virulencia durante la modulación de fase parece ser un punto crítico en el éxito de la colonización. Según se pudo corroborar, la interacción entre los factores de virulencia FHA y ACT, los cuales presentan una asociación física en membrana externa y poseen un patrón de expresión temporal distinto durante la modulación de fase, modifica la capacidad de interacción de *B. pertussis* con células epiteliales. La expresión de ACT en membrana modifica la actividad adhesina de FHA indirectamente, es decir, altera el funcionamiento del dominio de unión a carbohidratos inhibible por heparina presente en FHA. La heparina y otros glicosaminoglicanos sulfatados están presentes en forma abundante en la matriz extracelular y en el mucus que se produce en el epitelio respiratorio. Este cambio de funcionalidad en FHA favorecería la colonización de bacterias que ingresen al hospedador en fase intermedia o que modulen hacia este fenotipo durante la infección, en el cual *B. pertussis* expresa FHA y no ACT.

Estos resultados señalan al fenotipo intermedio de virulencia (Bvgⁱ) como el mejor adaptado a las condiciones de infección. Sin embargo, aún no se sabe exactamente cual es el estado o fase de virulencia de la bacteria infectante. Incluso ésta podría cambiar según el caso. De cualquier forma, las cepas circulantes muestran variaciones respecto a la cepa vacunal en todos los antígenos regulados por el sistema Bvg que han sido identificados como inductores de una respuesta inmune protectora: Fim y FHA (inducen anticuerpos que interfieren con la adhesión, según este estudio), Prn (inductor de anticuerpos cruciales para promover la actividad celular bactericida) y PT (inductor anticuerpos neutralizantes).

Con el fin de buscar nuevos antígenos para la formulación de vacunas que generen una respuesta inmune capaz de reconocer a la bacteria infectante cualquiera sea su fase de virulencia, abordamos la caracterización del fenotipo inducido en condiciones fisiológicas. Para esto, evaluamos los cambios fenotípicos inducidos por uno de los principales estímulos *in vivo* que modifica la virulencia de numerosos microorganismos patógenos, la limitación de hierro. Nuestros resultados muestran que el crecimiento en condiciones de limitación en hierro induce en *B. pertussis* la expresión de proteínas de superficie que facilitan la unión a mucina y la adhesión a células epiteliales a través de un mecanismo dependiente de ácido siálico. Anticuerpos presentes en el suero de individuos infectados, que reconocen diferencialmente a las proteínas inducidas en limitación de hierro, interfieren con la adhesión bacteriana a células epiteliales. Este resultado sugiere que bajo condiciones fisiológicas se expresan adhesinas que favorecen la interacción con células del hospedador y que, a la vez, son reconocidas por el sistema inmune e inducen anticuerpos con potencial capacidad protectora. Para profundizar el estudio del fenotipo infectante y evaluar la expresión de proteínas propias de este fenotipo inducidas en condiciones fisiológicas, realizamos el análisis de proteínas totales y de fracción enriquecida en proteínas de membrana externa de *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro mediante proteómica comparativa. Utilizando esta metodología se identificaron proteínas con diferente funcionalidad cuya expresión se ve influenciada por la disponibilidad de hierro. Algunas de estas proteínas parecen estar involucradas en la adquisición de hierro y, por su potencial localización en la superficie celular de *B. pertussis*, podrían participar en la interacción del microorganismo con las células del hospedador. Otras proteínas identificadas son potenciales factores de virulencia que podrían ayudar a explicar algunos aspectos de la patogenicidad e inmunoevasión de *B. pertussis* que aún no han sido esclarecidos. La evaluación de la inmunogenicidad de las proteínas inducidas en limitación de hierro identificadas a partir del análisis proteómico de la fracción enriquecida en proteínas de membrana externa, permitió detectar proteínas que reaccionan específicamente con suero de individuos infectados, dos de ellas con probable localización en la superficie celular. Mediante ensayos de evaluación de capacidad antigénica en ratones se demostró que estas

proteínas son inmunogénicas *in vivo* y que son capaces de generar anticuerpos que reconocen antígenos de membrana inducidos en condiciones fisiológicas. Estos anticuerpos mostraron promover la aglutinación y opsonización de bacterias adaptadas a la limitación de hierro, lo cual no solamente demuestra la localización de ambos antígenos en la superficie bacteriana sino que también señala a estas proteínas como posibles componentes de nuevas vacunas capaces de reconocer al fenotipo infectante cualquiera sea la fase de virulencia que este microorganismo presente.

En síntesis, los estudios presentados en esta tesis doctoral representan un avance en la caracterización de interacción de *B. pertussis* con el hospedador y de los mecanismos que intervienen en este proceso. Utilizando metodologías de microbiología celular e inmunoproteómica se avanzó en la caracterización del fenotipo inducido en condiciones fisiológicas identificándose proteínas propias de este fenotipo. Algunas de estas proteínas son potenciales factores de virulencia cuya futura caracterización podrá contribuir al conocimiento de la patogénesis de *B. pertussis*, mientras que al menos dos de ellas son atractivos candidatos a componentes de nuevas vacunas.



La Tos convulsa, cuyo agente etiológico es la bacteria *Bordetella pertussis*, continua siendo una de las principales enfermedades infantiles inmunoprevenibles. Tanto en Argentina como en el resto del mundo la implementación de programas de vacunación durante casi 60 años no ha logrado evitar la continua circulación de este patógeno en la población. Parte de la situación epidemiológica actual se asocia con la

deficiente protección contra la colonización que brindan las vacunas en uso. Las diferencias entre el fenotipo vacunal y el fenotipo infectante pueden explicar en parte la deficiencia de las vacunas actuales. Mediante un sistema de dos componentes denominado BvgAS, el cual controla la expresión de diversos factores de virulencia, *B. pertussis* puede alternar entre diferentes fases fenotípicas. Al menos tres de estas fases han sido caracterizadas: virulenta, intermedia y avirulenta. Si la transmisión de *B. pertussis* de persona a persona ocurre, como se postula, en fase avirulenta o intermedia, las vacunas celulares o acelulares (bacterias en fase virulenta o antígenos propios de esta fase, respectivamente) podrían no inducir una respuesta inmune protectora contra las bacterias que ingresan al hospedador. Para resolver esta situación se requiere una mejor caracterización de los eventos tempranos de colonización del epitelio respiratorio y de los factores involucrados en este proceso. Es necesario también caracterizar el fenotipo infectante e identificar inmunógenos cuya expresión se manifieste desde los estadios tempranos de colonización, independientemente de la fase de virulencia que el microorganismo presente, y sean capaces de inducir una respuesta inmune protectora efectiva en bloquear la etapa inicial de colonización. El presente trabajo de Tesis Doctoral abordó el estudio de los factores involucrados en los eventos tempranos de colonización del epitelio y el fenotipo infectante con el fin de avanzar en la comprensión de la patogénesis de *B. pertussis*, determinar factores de virulencia que se expresan en condiciones fisiológicas e identificar nuevos antígenos protectores que permitan mejorar las formulaciones vacunales actuales.