

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Estudio de los factores que condicionan la
producción y estabilidad de la Adenilato
Ciclasa de *Bordetella pertussis*.**

Tesis Doctoral

Daniela F. Hozbor

1993

El presente trabajo para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas se realizó en el Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas - Universidad Nacional de La Plata- bajo la dirección del Dr. Osvaldo Miguel Yantorno.

Mi reconocimiento:

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) por el otorgamiento de sucesivas becas que permitieron la realización del presente trabajo y por el apoyo económico brindado para estos estudios.

Mi agradecimiento:

Al Dr. Osvaldo Miguel Yantorno por haberme brindado la posibilidad de iniciarme en la investigación, y dirigir este trabajo de tesis.

Al Dr R. Ertola (CINDEFI), por su estímulo y apoyo.

A los Dres. R. Polero (INIBIOLP) y R. Grigera (IFLYSIB), por su tiempo y dedicación en la discusión y ejecución de los experimentos de determinación cuali y cuantitativa de lípidos, y de resonancia magnética nuclear.

A la Doctora M. Flawiá (INGEBI) por todo su apoyo, que me permitió realizar las determinaciones de actividad de AC en el INGENBI, y también a Horacio Martinetto y Jorge Muscheti por la inestimable ayuda experimental.

A todos mis compañeros del CINDEFI, por el apoyo y amistad brindados.

A Catalina López, por su espontánea colaboración y su excelente apoyo técnico cada vez que lo necesité.

A Carlos Castro, por su ayuda con la PC y demás electrónicos.

A mis amigas y compañeras de laboratorio Analía Samo y María Eugenia Rodríguez, por sus toneladas de apoyo, comprensión y cariño.

A mis compañeros de Química Biológica, por haberme sacado de la mayoría de mis apuros.

A Aníbal Lodeiro, por todo.

ABREVIATURAS

AC= adenilato ciclasa

ADP= adenosina difosfato

AMPC= adenosina monofosfato cíclico

ATP= adenosina trifosfato

BCIP= 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato p-toluidina

DO_{650 nm}= densidad óptica a 650 nm

DPH= 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno

EDTA= etilendiaminotetracetato de sodio

FHA= hemaglutinina filamentosa

HEPES= ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etano sulfónico

Hly= hemolisina

HLT= toxina lábil al calor

kDa= kilodalton

KDO= ácido 2-ceto-3-deoxi octulosónico

LPS= lipopolisacárido

Me β CD= 2,6-O-dimetil- β -ciclodextrina

NBT= cloruro de azul de tetrazolium

OMP= polipéptidos de membrana externa

PAGE= electroforesis en geles de poliacrilamida

PT= toxina pertussis

PVDF= polivinildifluoruro

SS= Stainer-Scholte

SDS= dodecil sulfato de sodio

TCT= toxina citotraqueal

TLC= cromatografía en capa fina

TNS= 2-p-toluidinilnaftalen-6-sulfato

VME= vesículas de membrana externa

CONTENIDO

CAPITULO 1

Introducción.....	1
Tos convulsa. Enfermedad clínica.....	4
Epidemiología.....	7
Etiología.....	8
Cultivo <i>in vitro</i> de <i>B. pertussis</i>	10
Factores de virulencia de <i>B. pertussis</i>	12
Regulación de la expresión de los factores de virulencia de <i>B. pertussis</i>	28
Secuencia fisiopatológica.....	36
Control de la enfermedad.....	43
Efecto de la composición del medio y las condiciones de cultivo sobre la producción de los factores de virulencia de <i>B. pertussis</i>	50
Objetivos.....	56

CAPITULO 2

Materiales y Métodos.....	62
Cepas bacterianas.....	62
Medios de cultivo líquido.....	62
Condiciones de cultivo.....	63
Determinación de la actividad hemaglutinante (FHA)....	65
Determinación de la actividad de AC extracelular.....	65
Determinación de la actividad hemolítica.....	67
Resistencia a antibióticos.....	67

Determinación de proteínas.....	68
Polipéptidos de membrana externa.....	68
Aislamiento de lipopolisacáridos.....	69
Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	70
Determinación de KDO.....	70
Extracción y análisis de lípidos.....	71
Derivatización y análisis de ácidos grasos.....	72
Ensayo de fluorescencia para Me β CD.....	72
Anisotropía de fluorescencia.....	73
Aislamiento de VME.....	74
Western blot.....	76
Análisis estadístico.....	77

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO 3

Cinética de producción de células y del antígeno AC extracelular.....	78
Efecto de la Me β CD sobre la actividad de AC.....	85
Acción de ácidos grasos sobre la actividad de AC.....	103

CAPITULO 4

Desestabilización de la membrana externa y su relación con la liberación de antígenos (I).....	107
Desestabilización de la membrana externa (II).....	122

CAPITULO 5

Relación entre la secreción de AC
y los componentes de membrana externa.....129

CAPITULO 6

Conclusiones.....145
Referencias.....151

Capítulo 1

La tos convulsa (pertussis) es una enfermedad infecciosa de las vías respiratorias superiores que se manifiesta esencialmente como un síndrome de tos paroxística sin fiebre. Esta enfermedad afecta preferentemente a niños menores de cuatro años de edad, pudiendo provocarles la muerte como consecuencia de complicaciones neurológicas o por infecciones secundarias recurrentes. Se transmite a través de gotas de aerosoles y la única fuente de infección es el individuo con la enfermedad clínica o subclínica (Alonso y col., 1985).

El agente causal, *Bordetella pertussis*, no invade tejidos y la patogénesis de la enfermedad requiere que el microorganismo se fije al epitelio ciliado del tracto respiratorio (Wardlaw y Parton, 1983). La multiplicación de la bacteria y la producción de toxinas provocan inflamación y necrosis de la membrana mucosa de la tráquea y brónqu coastos. Varios de los síntomas de la enfermedad como la linfocitosis, hipoglucemia y tos paroxística parecen ser consecuencia de la actividad biológica de componentes activos de *B. pertussis* (Peter y col., 1986), los cuales serán descriptos más adelante en este trabajo.

Para la prevención de esta enfermedad se emplean en muchos países, incluyendo Argentina, vacunas constituídas por una suspensión del agente causal muerto por calor y

detoxificado. Si bien estas vacunas celulares han demostrado ser efectivas en la disminución de la incidencia de la enfermedad, actualmente la aceptación de las mismas por parte de la población ha disminuído como consecuencia de los reportes existentes sobre la aparición de reacciones adversas asociadas con la vacunación (Robinson y col., 1985b). Estas reacciones adversas van desde moderadas -como enrojecimiento en el lugar de la inyección, fiebre, irritabilidad-, hasta daños neurológicos severos pudiendo ocasionar la muerte en una proporción de 1: 310000 vacunaciones.

Como consecuencia de la menor aceptación de la vacuna celular clásica y de la consecuente, mayor incidencia de la tos convulsa en la población, emerge, a nivel nacional e internacional, un renovado interés por esta enfermedad.

Actualmente las investigaciones sobre pertussis se han orientado hacia el desarrollo de una nueva vacuna de tipo acelular que resulte más efectiva y menos reactogénica (Christodoulides y col., 1986; Chazono y col., 1988). Varias son las razones que justifican el desarrollo de esta nueva vacuna, entre las cuales se pueden citar las siguientes:

1) la protección que proveen las vacunas celulares no resultó ser tan sólida como se esperaba. Estudios de frecuencia epidémica de pertussis indican que las vacunas en realidad, protegen a los individuos, no de la infección, sino de los síntomas de la enfermedad, con lo cual los niños vacunados resultarían ser portadores asintomáticos (Fine y

Clarkson, 1987).

2) la toxicidad inherente a las vacunas pertussis celulares y el desarrollo de desórdenes neurológicos, aunque no se conozca con precisión cómo se desencadenan (Mortimer, 1990).

Estos hechos marcan la necesidad de desarrollar una vacuna acelular completamente no tóxica.

3) se han producido considerables avances en el campo de la inmunología, bioquímica y patogenicidad microbiana, desde que se introdujo la inmunización masiva contra pertussis. Actualmente es posible identificar con cierta certeza aquellos antígenos que pueden inducir una respuesta inmune protectora e incluso purificarlos. Resulta posible entonces, producir vacunas de composición definida, potencia protectora constante y de baja toxicidad.

Para el diseño de estas nuevas vacunas se requiere entender y conocer: a) los mecanismos mediante los cuales *B. pertussis* causa la enfermedad, b) los componentes microbianos que son esenciales para el desarrollo de la enfermedad y c) la respuesta inmune del hospedador.

El estado de conocimiento sobre éstos y otros aspectos relacionados con la enfermedad y el microorganismo se detallan a continuación.

TOS CONVULSA

ENFERMEDAD CLINICA

La tos convulsa se caracteriza por los accesos de tos quintosa en número y duración variables. El período de incubación de la enfermedad dura en general de siete a diez días. Una incubación prolongada puede esperarse en los casos con inmunización pasiva o activa previa. Las manifestaciones clínicas de pertussis se dividen en tres períodos (Peter y col., 1986), que se suceden uno tras otro sin límite preciso y son

- a) de invasión o catarral.
- b) paroxístico o de estado.
- c) convalecencia.

Período de invasión o catarral: corresponde a las manifestaciones clínicas de los fenómenos inflamatorios de las vías aéreas superiores. Comienza con una tos seca, molesta, de predominio nocturno. Se acompaña de coriza, rinorrea y ocasionalmente de fiebre leve o moderada. Los síntomas y signos mencionados son inespecíficos y generalmente se consideran como una expresión de una infección corriente de las vías aéreas superiores. Durante este período de dos semanas de duración, *B. pertussis* puede ser aislada de cultivos nasofaríngeos en una proporción del

90%. Sin embargo, en ausencia de la tos clásica, pertussis no es el primer diagnóstico clínico que se realiza y en general son pocos los médicos que consideran, en este punto, el estudio bacteriológico para el diagnóstico.

La fase catarral continúa con la fase paroxística cuando la tos seca no productiva pasa a ser una tos paroxística con producción de mucus y vómitos.

Período paroxístico: también llamado convulsivo o espasmódico, se caracteriza por la presentación de accesos o quintas de tos (de allí su nombre de tos quintosa). Algunos segundos antes del ataque se presentan síntomas de "aura" (cosquilleo, picor, opresión) que advierte a los niños mayores de la proximidad del acceso de tos. El primer movimiento respiratorio que inicia la crisis es una inspiración no ruidosa, seguida de inmediato por una serie de sacudidas rápidas (de cinco a veinte) con el tórax fijo en inspiración. Luego se produce la apnea que a veces puede llevar a la cianosis y finalmente termina con una inspiración sibilante y ruidosa. Este episodio se repite varias veces consecutivas hasta que por fin el niño finaliza vomitando o expectorando una secreción filante con aspecto de clara de huevo cruda. En ocasiones se presentan convulsiones. Los pacientes pueden presentar pérdida de peso, ocasionalmente hipoglucemia y raramente encefalopatías. En el análisis de elementos sanguíneos se observa una marcada leucocitosis con

predominancia de linfocitos. Paradójicamente, el aislamiento del microorganismo resulta progresivamente más difícil después del primer ataque de tos de la fase paroxística. La incapacidad de cultivar el microorganismo durante la fase más severa de la enfermedad, indica que la mayoría de las manifestaciones clínicas se deben a la presencia de toxinas liberadas por el microorganismo y a su diseminación sistémica.

Período de convalecencia: se caracteriza por la disminución gradual y progresiva de los accesos de tos. Las espiraciones forzadas disminuyen en número e intensidad, y paulatinamente se van interponiendo entre las crisis otras de tos corriente. La duración de la convalecencia está en función de la gravedad de la enfermedad. En algunos casos persisten accesos en forma aislada (tic coqueluchoide), interpretados como una dependencia afectiva del niño y que se mantiene durante tres o cuatro meses.

La enfermedad se transmite por vía de aerosol infectante y generalmente es de mayor prevalencia en los lugares de mayor densidad poblacional. El paciente permanece infectante desde la segunda semana hasta los tres meses posteriores al comienzo de la fase catarral. Pueden ocurrir reinfecciones subclínicas, pero su frecuencia no es conocida con certeza.

EPIDEMIOLOGIA

La tos convulsa es una enfermedad de distribución universal. El único reservorio conocido de *B. pertussis* es el hombre. Es endémica y se producen epidemias cada 2-4 años (Funkhouser y col., 1988).

La epidemiología de pertussis es determinada por los factores que influyen la transmisión de la enfermedad dentro de la comunidad, dentro de los cuales se destacan:

- a) infectividad del microorganismo.
- b) número de contactos con individuos infectados, incluyendo grado de exposición.
- c) el grado o nivel de inmunidad a pertussis de los individuos sanos expuestos a la infección.

La epidemia ocurre cuando un pool crítico de individuos susceptibles crece (usualmente cada tres a cuatro años) en una población vacunada. Estos ciclos pueden llegar a ocurrir en lapsos de tiempo más cortos, por ejemplo en los casos donde la tasa de natalidad aumenta o en los que la inmunización disminuya. Los casos de pertussis generalmente ocurren en las poblaciones de bajo nivel socioeconómico, con reducido porcentaje de vacunación.

Los niños que no han completado los planes de vacunación y los adolescentes y adultos jóvenes que tienen disminuída la inmunidad, o que la misma persiste incompleta, constituyen

los grupos considerados de alto riesgo. Los niños más pequeños pueden infectarse como consecuencia de no adquirir vía transplacentaria anticuerpos contra la enfermedad, ya que como toda bacteria Gram-negativa, *B. pertussis* está vinculada con anticuerpos IgM, los cuales no atraviesan placenta (Funkhouser y col., 1988). En los brotes epidémicos se presentan numerosos casos en los primeros meses de vida. Este grupo de edad, menor de seis meses, es el que registra la mayor tasa de letalidad.

De todas las enfermedades infecciosas, y por motivos desconocidos, sólo la tos convulsa afecta con mayor intensidad al sexo femenino que al masculino; siendo esta regla válida tanto para la morbilidad como para la letalidad.

ETIOLOGIA

El bacilo de Bordet-Gengou (*Bordetella pertussis*) es el principal agente etiológico de la tos convulsa, pero también se mencionan como tales a *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* (Musser y col., 1986).

Bordetella pertussis fue aislada en 1906 por Bordet y Gengou, de allí su denominación de bacilo de Bordet-Gengou. Es un cocobacilo Gram-negativo, inmóvil, aerobio, de 1 a 2 micrómetros de longitud.

Las características microbiológicas que distinguen las tres especies del género *Bordetella*, *B. pertussis*, *B.*

parapertussis y *B. bronchiseptica*, se detallan en la siguiente tabla:

TABLA 1: Características microbiológicas de las tres especies del género *Bordetella*

Características	<i>B. pertussis</i>	<i>B. para-pertussis</i>	<i>B. bronchi-septica</i>
Movilidad	-	-	+
Reducción de NO₃⁻	-	-	+
Producción rápida de ureasa	-	-	+
Oxidasa	+	-	+
Crec. en agar Bordet-Gengou (días)	3-4	1-2	1-1.5
Crec. primario en agar-sangre	-	+	+

Bordetella parapertussis y *Bordetella bronchiseptica* son dos especies estrechamente relacionadas con *B. pertussis*, y son responsables de las formas moderadas de la enfermedad respiratoria en el hombre y en animales (Musser y col., 1986; Woolfrey y Moody, 1991). Las tres especies colonizan el tracto respiratorio adhiriéndose a las cilias de la mucosa, poseen antígenos de superficie comunes, producen sustancias tóxicas como la toxina dermonecrótica (Endoth y col., 1986;

Kume y col., 1986) y adenilato ciclasa extracelular (Kobisch y Novotny, 1990) y las tres pueden sufrir procesos de variación de fase (virulenta-avirulenta) (Ishikawa e Isayama, 1986). En los estudios de las relaciones evolutivas, un hecho distingue claramente las tres especies de *Bordetella*: la toxina pertussis no ha podido ser detectada en cultivos de *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* (Arico y Rappuoli, 1987). Se ha podido observar que esas dos especies sin embargo, contienen el gen de la toxina aunque transcripcionalmente sería inactivo. El análisis de la secuencia nucleotídica de las respectivas secuencias codificantes de PT sugiere que las de *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* derivan de un antecesor común.

CULTIVO IN VITRO DE *B. pertussis*

B. pertussis es un microorganismo de crecimiento lento aún en condiciones de cultivo favorables. Requiere glutamato y/o prolina como principales fuentes de carbono y energía, y ácido nicotínico o nicotinamida, glutatión y cisteína como factores de crecimiento. Si bien los requerimientos nutricionales parecen ser simples, este microorganismo es difícil de cultivar debido a otros aspectos tales como su sensibilidad a la inhibición ejercida por sustancias (todavía no totalmente identificadas) que están presentes en determinados medios de cultivo (Parker, 1976). En un

principio, para superar el efecto de estas sustancias, se emplearon aditivos de los medios de cultivo, como sangre, albúmina, resinas de intercambio aniónico y carbón. Uno de los medios más ampliamente empleados fue el medio descrito por Cohen y Wheeler (1946) suplementado con carbón y agar. Este medio presenta la desventaja de que el carbón, componente esencial del medio, no se distribuye uniformemente, lo cual lleva a efectos indeseables en el crecimiento de *B. pertussis*. Si bien se han propuesto otros medios de cultivo éstos también presentaron desventajas.

Un importante avance se logró en 1983 en Japón, con la incorporación de un producto derivado de las ciclodextrinas (2,6-O-dimetil- β -ciclodextrina) al medio de cultivo (Imaizumi y col., 1983_a). Este compuesto cíclico formado por siete glucosas metiladas unidas por enlace glicosídico α 1-4 (Figura 1), incrementa el desarrollo celular del microorganismo en fase virulenta y la producción de antígenos (Imaizumi y col., 1983_b; Gorringer y col., 1988; Hozbor y col., 1991).

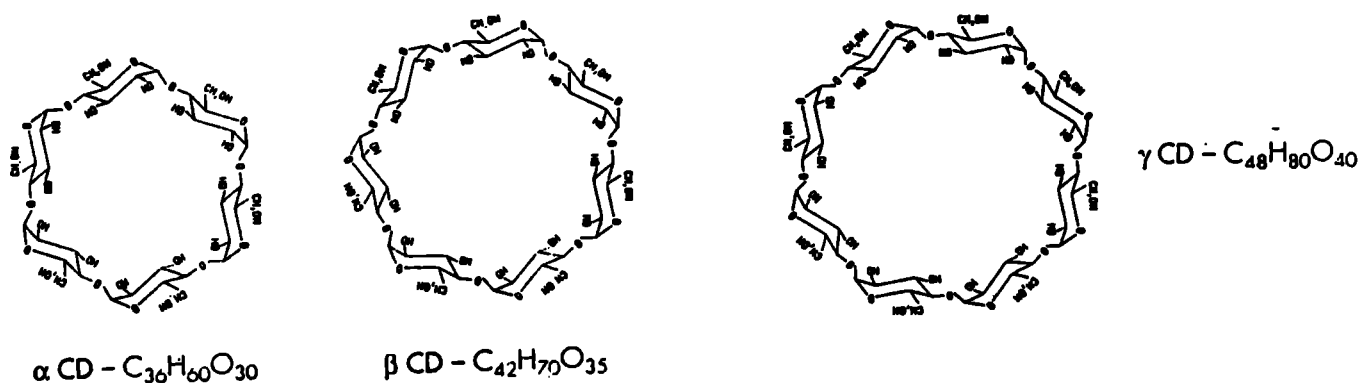


FIGURA 1: Estructura de las ciclodextrinas.

Si bien el uso de este agente ha sido ampliamente difundido, su mecanismo de acción aún no se conoce. Este aspecto resulta de gran interés, ya que su esclarecimiento permitiría el reemplazo de la ciclodextrina por otro compuesto de similar efecto, menor costo y de mayor disponibilidad en el mercado.

Es justamente debido al alto valor económico de la ciclodextrina, que los cultivos en medio sólido se realizan rutinariamente en agar Bordet-Gengou suplementado con sangre.

Para el desarrollo en medio líquido se emplea el medio de Cohen Wheeler o el medio definido de Stainer-Scholte (1971). Sin embargo, se pudo observar que ninguno de ellos soporta el crecimiento a partir de un inóculo pequeño. En este sentido, nuevamente la incorporación de ciclodextrina a los medios líquidos permite obtener mayores rendimientos celulares, incluso a partir de inóculos pequeños. Más aún, en estos medios suplementados con ciclodextrina se ven incrementados los rendimientos de dos importantes inmunógenos extracelulares (la toxina pertussis y la hemaglutinina filamentosa) (Imaizumi y col., 1983_b; Suzuki y col., 1985)

FACTORES DE VIRULENCIA DE *Bordetella pertussis*

La mayoría de las enfermedades infecciosas ocurren a través de una secuencia de eventos consistentes en: a) entrada del patógeno al hospedador e interacción con tejidos blanco específicos; b) evasión de las defensas del hospedador

y proliferación del patógeno; c) desarrollo de daño local en el sitio de la infección y d) diseminación del patógeno o de sus productos, causando una enfermedad sistémica.

Las sustancias bacterianas que promueven la patogenicidad permitiendo el desarrollo estos pasos, son denominadas **factores o determinantes de virulencia** (Weiss y Hewlett, 1986).

Para determinar si una sustancia es un factor de virulencia, primeramente se analiza si dicha sustancia cumple los siguientes requisitos: 1) que sea producida por el organismo virulento y 2) que al ser administrada a animales de experimentación produzca efectos análogos a algunas de las manifestaciones de la enfermedad clínica. Sin embargo, este último criterio sólo es aplicable en el caso de toxinas, las cuales son consideradas moléculas etiológicas importantes de una enfermedad particular y para las cuales existe generalmente un modelo animal apropiado; pero no para otros factores de virulencia que no causan un daño directo en el hospedador. En este último caso resulta necesario, entonces, emplear otras estrategias que permitan evaluar a un supuesto determinante de virulencia, entre las cuales se pueden mencionar:

1) el empleo de cepas mutantes defectivas, para determinar la contribución de genes específicos a la enfermedad.

2) estudio de la enfermedad en animales inmunizados tanto en forma activa como pasiva contra el supuesto factor

de virulencia y desafíos con el organismo virulento entero. Esta última estrategia es limitada, ya que en realidad se mide la contribución del factor como antígeno protector más que como agente en el proceso de la enfermedad. Los antígenos protectores no son necesariamente factores de virulencia.

Además de las técnicas antes mencionadas, generalmente se requiere de otras complementarias (bioquímicas, genéticas, inmunológicas) para la identificación de los factores de virulencia y para la verificación de sus roles en la enfermedad.

Considerando que pueden ser varios los factores involucrados en la patología, el daño en el hospedador y la enfermedad en sí, parecen ser consecuencia tanto de las interacciones sinérgicas entre los distintos factores bacterianos como de la subsecuente respuesta del hospedador. Esta complejidad del proceso infeccioso hace dificultosa la determinación completa de la fisiopatología del mismo.

En el caso de *B. pertussis*, a la mayoría de los componentes biológicamente activos no se les ha podido asignar todavía una función específica en el desarrollo de la enfermedad clínica. Esto es consecuencia de una serie de problemas que se presentan en este área de investigación. Hasta hace algunos años, sólo se contaba para los ensayos fisiopatológicos, con cepas virulentas y avirulentas (Lacey, 1960), lo cual impedía la realización de estudios sobre los antígenos en forma individual. Las variantes avirulentas se obtenían a partir de cepas *B. pertussis* que pasaban de un

estado virulento a uno avirulento a través de dos mecanismos: **cambio de fase** (Goldman y col. 1984) y **modulación antigénica** (Melton y Weiss, 1989), los cuales se describirán en otra sección de este trabajo. Posteriormente en 1982, Watanabe y Nakase lograron aislar y estudiar un mutante deficiente en hemaglutinina filamentosa; pero el avance más significativo se consiguió, más tarde, mediante el empleo de mutagénesis por transposición (Weiss y col. 1983; Marchitto y col., 1987; Weiss y col. 1989), que permitió obtener mutantes defectivos en los distintos factores de virulencia.

A pesar de los avances logrados, un inconveniente importante que aún se presenta en la definición de los factores de virulencia de *B. pertussis*, es la falta de un modelo animal adecuado que reproduzca la enfermedad de los niños (Weiss y Goodwin, 1989).

La mayor parte de la información que se tiene de la enfermedad, se obtuvo de los estudios realizados sobre la eficacia de las vacunas, en los cuales el modelo animal más ampliamente empleado es el desafío intracerebral en ratones (Kendrick y col. 1947). En este caso los animales son inyectados vía intracerebral, con una dosis letal de bacterias vivas de una cepa particular de *B. pertussis* (cepa 18323, la única capaz de causar la muerte por esa vía). En estos ensayos las clásicas vacunas de células enteras inoculadas por vía intraperitoneal protegen a los ratones de la muerte. Si bien este modelo sirve, aunque cuestionado, para las medidas de potencia de las vacunas, no es el modelo

más adecuado para obtener datos precisos sobre el proceso de la enfermedad. Esto se debe principalmente a que en los niños la infección se produce por vía intranasal y no por vía intracerebral.

Se han realizado varios estudios sobre la infección respiratoria de *B. pertussis* en diferentes animales: ratones, ratas, conejos, chimpancés, etc (Robinson y co., 1985; Syukuda y col. 1988). Sin embargo, no se ha podido definir un modelo animal apropiado. El chimpancé sería el modelo más real de la enfermedad, pero económicamente resulta ser prohibitivo. Los conejos pueden infectarse pero no manifiestan la enfermedad. En el caso de las ratas, los últimos resultados obtenidos fueron promisorios, pero se requiere de más investigación para definirlo como el modelo animal de pertussis.

El modelo de infección animal más ampliamente usado y mejor caracterizado hasta el momento, es el de desafío intranasal en ratones. Los ratones infantiles pueden sucumbir frente a una dosis letal, pero los ratones adultos pueden infectarse y desarrollar síntomas característicos de la enfermedad como linfocitosis, pero no mueren.

En este marco, se identificaron y caracterizaron los principales factores de virulencia de *B. pertussis*. A continuación se describirán los aspectos más importantes de los mismos.

Toxina pertussis: PT (también conocido como factor promotor de linfocitosis, pertusígeno, factor histamino sensibilizante o proteína activadora de los islotes), es una de las principales toxinas asociadas con la enfermedad en los niños (Monack y col. 1989). Produce una serie de efectos biológicos cuando es inyectada en animales de laboratorio, los cuales incluyen una marcada linfocitosis, aumento de la sensibilidad a la histamina, hiperinsulinemia, hipoglucemia, incremento de la susceptibilidad al shock anafiláctico e inducción de enfermedades autoinmunes (Munoz y col. 1981; Burns y col. 1987; Marchitto y col. 1987).

Por otra parte, se ha descrito que esta toxina, junto con la hemaglutinina filamentosa (descrita más abajo), juega un rol importante en la adhesión de *B. pertussis* a las células ciliadas del tracto respiratorio del hospedador (Locht y Cabezon, 1990).

PT es una proteína globular con un peso molecular de 117kDa, constituida por cinco subunidades diferentes (S₁-S₅). Puede aislarse tanto de células como de sobrenadantes de cultivo (Sekura y col., 1983).

Tamura y colaboradores (1982) han propuesto una estructura tipo A-B para esta proteína, similar a otras toxinas bacterianas (toxina del cólera, enterotoxina lábil al calor de *Escherichia coli*; Collier, 1975). El protómero activo A está constituido por la subunidad S₁ (28 kDa), mientras las subunidades S₂ (23 kDa), S₃ (22 kDa), S₅ (9.3 kDa) y dos subunidades S₄ (11.7 kDa) conforman el oligómero B

(pegado) (Ui y col., 1984; Arciniega y col., 1991). Recientemente se han publicado trabajos concernientes al mecanismo de acción de PT a nivel molecular (Black y col., 1988; Kaslow y col., 1989) Esta toxina cataliza la ADP ribosilación de la familia de proteínas unidoras de GTP (proteínas G) presentes en células eucarióticas (Morishita y col., 1988). La ADP ribosilación de la proteína G inhibitoria (G_i) altera la capacidad de las células de responder a hormonas que inhiben la producción de AMPc como así también la movilización de Ca^{2+} (Katada y col. 1982; Tsuchiya y col., 1990)

Varios autores han observado que la toxina pertussis requiere ATP para desarrollar la máxima ADP ribosilación de G_i y de otras proteínas regulatorias unidoras de GTP (Moss y col., 1986; Kaslow y col., 1987). Recientemente se ha demostrado que el ATP interacciona directamente con la toxina y no sobre los sustratos (Hausman y col., 1990). Sin embargo, el mecanismo por el cual el ATP estimula la actividad de la toxina aún no ha sido aclarado. La elucidación de este mecanismo permitiría avanzar en el entendimiento de la regulación de la actividad de la toxina pertussis y quizás daría información referente al comportamiento de la toxina dentro de las células eucariotas.

Adenilato ciclasa: AC, esta proteína normalmente actúa como mediador entre las señales externas y el aparato bioquímico y genético interno de las células procariotas y eucariotas. Sin

embargo dos especies de bacterias patógenas secretan adenilato ciclasa, la cual al penetrar en las células eucarióticas blanco, disrumpe el procesamiento de la información dependiente del AMPc de estas células. Estas especies son *B. pertussis* y *Bacillus anthracis* (Escuyer y col., 1988).

La adenilato ciclasa de *B. pertussis* fue descubierta en las vacunas comerciales contra la tos convulsa (Wolff y Cook, 1973). Esta proteína exhibe, además de las mencionadas, otra propiedad inusual: su estimulación por una proteína eucariótica unidora de Ca^{2+} , calmodulina (CaM), ausente en *B. pertussis* (Ladant, 1988; Masure y col., 1988).

La mayor parte del enzima se encuentra unido a la célula y el resto, prácticamente es extracelular (Hewlett y col., 1978). Esta proteína está compuesta por un solo polipéptido que posee todas las funciones necesarias para la actividad tóxica (invasión a células eucariotas e incremento del AMPc intracelular disrumpiendo las funciones celulares) (Hewlett y col., 1985; Hewlett y col., 1989).

Los enzimas intra y extracelular han sido purificados por varios grupos encontrando una gran heterogeneidad de pesos moleculares que van desde 45 a 700 kDa (Hanski y Farfel, 1985; Kessin y Franke, 1986; Rogel y col., 1988). Recientemente, Rogel y colaboradores (1988), y Masure y Storm (1989) identificaron una proteína bacteriana de 200 kDa (responsable de la actividad tóxica del enzima) que posee reacción cruzada con anticuerpos anti-AC de 45 kDa. Este

resultado indicaría que el polipéptido de 200 kDa es el precursor de las formas más pequeñas de AC. Sin embargo, el mecanismo que gobierna la secreción de AC al medio extracelular y la relación entre las diferentes formas moleculares aún no han sido aclarados.

En relación al poder protector, recientemente se ha demostrado que este antígeno protege a ratones de la infección intranasal con *B. pertussis* virulenta (Guiso y col. 1989). Además, las inmunizaciones con AC disminuyen significativamente el período de colonización bacteriana en el tracto respiratorio de ratones (Guiso y col., en prensa). Este efecto también se observó con AC de *B. parapertussis* contra la colonización de *B. parapertussis*, resultado que sugiere que AC es uno de los principales factores involucrados en la colonización bacteriana ya que *B. parapertussis* no expresa la toxina pertussis (Aricó y Rappuoli, 1987). Estos datos destacan el rol de AC en la patogénesis de *Bordetella* en el modelo animal antes mencionado (ratón). Si este factor tiene el mismo rol en la enfermedad del hombre, el empleo del mismo como antígeno protector podría reducir no sólo la incidencia de la enfermedad sino que además reduciría el número de portadores asintomáticos.

Hemolisina: (Hly) Basados en la homología de secuencia con la hemolisina de *E. coli*, Glaser y colaboradores (1988)

predijeron que la adenilato ciclasa de *B. pertussis* podría poseer actividad hemolítica. Recientes estudios demostraron que la forma tóxica de AC (es decir la que es capaz de invadir células eucariotas e incrementar los niveles de AMPc intracelular, PM: 200 kDa) es la única capaz de lisar eritrocitos (Rogel y col., 1991). La hemólisis aparece como un paso distinto y dissociado temporalmente respecto a la producción del AMPc. Mediante la manipulación de la composición del medio de incubación de los eritrocitos, es posible dissociar las dos funciones de la forma tóxica de AC. La exclusión de Ca^{+2} y la adición del agente quelante EGTA no previenen el pegado de la toxina ni la lisis celular pero inhiben la generación de AMPc. Por otra parte, la reincubación de los eritrocitos previamente tratados con la toxina AC en presencia de EGTA, con un buffer libre de toxina conteniendo Ca^{+2} provoca un aumento inmediato del nivel AMPc. Estos resultados sugieren que el Ca^{+2} se requiere para la inserción de los dominios de la toxina necesarios para la producción de AMPc, en el citosol celular (Rogel y col., 1991; Ehrmann y col., 1991).

Se ha determinado que el Ca^{+2} juega un rol importante en el pegado de la hemolisina de *E. coli* a los eritrocitos a través de una secuencia repetida en tandem consistente en nueve aminoácidos (Ludwig y col., 1988). Una secuencia similar a la antes descrita se ha podido identificar en la AC de *B. pertussis* (Glaser y col., 1988).

Si bien la tos convulsa es una enfermedad del hombre,

los eritrocitos humanos no responden a la actividad hemolítica de la toxina AC. Esta resistencia a la lisis podría estar debida a una inactivación de dicha toxina por parte de los eritrocitos. Esta inactivación se ha podido observar en linfocitos humanos y se la ha atribuido a una degradación proteolítica de AC. Parece ser que la vida media de la toxina en la membrana de los eritrocitos humanos es muy corta como para permitir la formación de lesiones efectivas pero es lo suficientemente larga para incrementar los niveles de AMPc intracelular.

Hemaglutinina filamentosa: FHA, esta proteína aparece al microscopio electrónico como un filamento de 2 nm de diámetro por 40-100 nm de longitud. FHA ha sido purificada tanto de cultivos líquidos estáticos como de extractos de células crecidas en medios con agar (Arai y Sato, 1976; Selmer y col., 1984). La proteína purificada de sobrenadantes de cultivo se presenta en forma heterogénea cuando se analiza en corridas electroforéticas (SDS-PAGE), revelándose polipéptidos de 220, 127, y 95 kDa; 160 y 126 kDa y también 115 y 90 kDa de peso molecular (Irons y col., 1983; An der Lan y col., 1986). Esta heterogeneidad depende de la cepa y de las condiciones de cultivo empleadas.

Ensayos de adhesión realizados *in vitro* con células eucariotas ciliadas y no ciliadas permitieron sugerir que FHA es una de las adhesinas de *B. pertussis* más importantes, que media la interacción bacteria-hospedador. Recientemente se ha

podido clonar y secuenciar el gen estructural completo que codifica para FHA (Relman y col., 1989). Dentro de esta secuencia se ha podido observar la presencia de dos regiones RGD (Arg-Gly-Asp), las cuales podrían intervenir en el reconocimiento del sitio en las células eucariotas y jugar un rol en la función de esta proteína como adhesina. La fibronectina es el prototipo de proteína en la cual la región RGD media las interacciones celulares con las integrinas receptoras (Relman y col., 1990).

Existen evidencias que demuestran el rol de la primer secuencia RGD en la adhesión (Relman y col., 1990): 1) la primera pero no la segunda RGD parece estar superficialmente expuesta, 2) las secuencias que flanquean la primer secuencia RGD presentan homologías con el sitio RGD de la fibronectina, y 3) la delección de una larga porción del gen que codifica para FHA y que contiene la primera RGD causa la pérdida de la actividad de adhesión. Esta actividad de la RGD no excluye que otros dominios de la proteína posean roles adicionales (Leininger y col., 1993).

En relación al poder protector de esta proteína se ha determinado que FHA estimula la respuesta inmune en el hombre después de la enfermedad clínica y actúa como antígeno inmunoprotector en el modelo animal de ratón (Sato y Sato, 1984). Si bien FHA es menos efectiva que la toxina pertussis cuando se la emplea como único antígeno, esta proteína junto con la toxina pertussis tiene un efecto sinérgico en la inmunoprotección (Robinson e Irons, 1983; Kimura y col., 1990).

Los mecanismos involucrados en la protección con estas proteínas aún deben ser aclarados.

Aglutinógenos: éstos han sido definidos como antígenos de superficie, los cuales estimulan la producción de anticuerpos que causan la aglutinación de bacterias y han sido utilizados para definir el serotipo del género *Bordetella*. Existen tres aglutinógenos principales: 1, 2 y 3. El aglutinógeno 1, es común para todas las cepas del microorganismo, pero la presencia o ausencia de los aglutinógenos 2 y 3 define los cuatro serotipos principales de *B. pertussis* (1:2:3, 1:2, 1:3, y 1). Existen reportes conflictivos respecto a los aglutinógenos en relación a su naturaleza y a sus asociaciones con estructuras de superficie. Para el caso del aglutinógeno 1 su localización no ha sido totalmente aclarada, sin embargo recientes estudios (Preston y col., 1990) sugieren que este antígeno se encuentra tanto en las fimbrias como en la superficie celular. El aglutinógeno 2 ha demostrado ser una proteína fimbrial con participación en la adhesión. En cambio el aglutinógeno 3 parece ser una proteína no fimbrial (Ashworth y col., 1982; Carter y Preston, 1984; Preston y col., 1990).

Proteínas de membrana externa: OMP, seis proteínas de membrana externa de peso molecular 90, 86, 82, 33,31 y 30 kDa son específicas de la forma virulenta de *B. pertussis*, pero el rol de las mismas en la virulencia es desconocido

(Redhead, 1983; Armstrong y Parker, 1986).

Recientemente se ha demostrado que una proteína de membrana externa de 69 kDa, denominada pertactina (P69), es un aglutinógeno que puede promover la adhesión a ciertas células eucarióticas a través de la secuencia tripeptídica Arg-Gly-Asp (RGD) (Leininger y col., 1991). Esta secuencia RGD, como se mencionó anteriormente, media la adhesión de ciertas proteínas de la matriz extracelular de las células eucarióticas, parásitos, bacterias, y virus, a la familia de integrinas, receptores de la superficie celular eucariótica.

Además, se ha observado que preparaciones purificadas de pertactina, pueden contribuir a la protección en ratones contra el desafío intracerebral o por aerosol de *B. pertussis*. En el hombre, esta proteína parece tener significancia en las respuesta mediada tanto por células T como por células B. Por todas estas razones esta proteína de membrana externa ha sido propuesta como constituyente de una vacuna acelular (Charles y col., 1989).

Citotoxina traqueal: TCT, es el componente tóxico de *B. pertussis* más recientemente descrito. Es uno de los productos bacterianos más pequeños (921 Da), que genera efectos citopatológicos (Cookson y col., 1989). Esta toxina, que deriva del peptidoglicano, altera la primera barrera de defensa de los pulmones dañando las células ciliadas. Recientemente se ha sugerido que la TCT previene la reparación de ese mecanismo de clearance a través de la

inhibición de la regeneración de células epiteliales (Goldman y col., 1990). Este efecto permitiría explicar la continuación del síndrome pertussis después de la administración de antibióticos.

El mecanismo por el cual la TCT ejerce su actividad citopatológica en el tracto respiratorio aún no ha sido aclarado. Sin embargo, el conocimiento de que esta toxina es un fragmento del peptidoglicano que ha perdido actividad enzimática ha permitido suponer que la actividad tóxica de TCT surge como consecuencia de su interacción con receptores o con sitios "blanco" (Goldman y col., 1990). Consecuentemente en la molécula de TCT debería haber porciones con una estructura precisa esencial para el pegado al epitelio respiratorio y/o para la toxicidad. Nuevos estudios se requieren para el esclarecimiento de este aspecto como así también para determinar su poder protector.

Toxina dermonecrótica: HLT, también conocida como toxina lábil al calor. Fue descrita en 1909 pero se sabe relativamente poco en relación a su química, inmunología y rol en la patogénesis. Si bien esta toxina es letal cuando se inyecta en animales por vía intravenosa o intraperitoneal, la acción más estudiada de la HLT es la inducción de lesiones en la piel cuando es inyectada intradérmicamente. La capacidad de producir necrosis hemorrágica en la piel depende tanto de la edad como de la especie animal empleada (Livey y Wardlaw, 1984).

Esta toxina también es producida por las otras especies del género *Bordetella*. Es intracelular, aunque su localización precisa no se conoce (Cowell y col., 1979). Se inactiva rápidamente por calor a 56°C y por una serie de sustancias incluyendo el formaldehído. Es por esto último que la HLT activa está ausente en las vacunas celulares. El toxoide HLT parece ser inmunogénico en conejos pero no en ratones. Su localización es citoplasmática pero se supone que para que esta toxina ejerza su actividad *in vivo* debe expresarse en la superficie celular del microorganismo. Se requieren de más estudios para determinar el rol preciso de HLT en la enfermedad, su poder inmunogénico y su efecto en la actividad de otros factores asociados a la virulencia de *B. pertussis*.

Lipopolisacáridos y componentes asociados: el lipopolisacárido (LPS) de *B. pertussis* posee características estructurales y funcionales que lo distinguen de otras endotoxinas de organismos Gram-negativos (Le Dur y col., 1980). Está compuesto de dos lípidos A y X y de dos diferentes cadenas de oligosacáridos (tipos I y II) conteniendo 12-16 monosacáridos cada una. El núcleo polisacárido se encuentra unido al lípido A mediante una molécula de ácido 2-deoxi-D-mano-octulosónico (KDO), considerado componente ubicuo del LPS (Chaby y Szabo, 1975).

El lipopolisacárido intacto tiene las actividades que se atribuyen a la mayoría de las endotoxinas, (pirogenicidad).

Es comparable a la endotoxina de *Salmonella* o *Escherichia coli* en los ensayos de *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL test) y en promover la hipersensibilidad a la histamina. Es inusual en su capacidad de inducir resistencia a infecciones virales en ratones normales y atímicos. El lípido X posee las actividades clásicas de endotoxinas, no así el lípido A que tiene baja pirogenicidad y baja toxicidad (Ayme y col., 1980). Por otra parte, el lípido A presenta actividad adyuvante y antiviral. La fracción oligosacárida es mitogénica para linfocitos de ratón y estimula la secreción de interleukina-1 de monocitos humanos.

Sultzer y colaboradores (1972) han identificado proteínas asociadas a la endotoxina que tienen efectos inmuno moduladores en ratones endotoxina-resistentes (C3H/HeJ). Estas proteínas han sido coextraídas con el lipopolisacárido y consisten en tres polipéptidos de 68, 65 y 30 kDa. Este complejo puede estimular la diferenciación policlonal de anticuerpos producidos por linfocitos en ratones C3H/HeJ (Girard y col., 1981).

REGULACION DE LA EXPRESION DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA

La síntesis de los determinantes de virulencia de *B. pertussis* descritos anteriormente, a excepción de la citotoxina traqueal, que es un producto de la síntesis del peptidoglicano, se encuentra bajo el control del locus

denominado *Bordetella virulent gene* (*bvg* o también designado *vir*). El locus *bvg* fue identificado por Weiss y colaboradores (1984) cuando observaron que la inserción del transposón Tn5 dentro del mismo, abolía simultáneamente la síntesis de PT, FHA, AC y HLT. Posteriormente se demostró que la proteína de 69 kDa (p69 kDa o pertactina) también es una proteína *bvg*-regulada (Charles y col., 1989). Las bacterias que contienen mutaciones que eliminan la expresión de los genes *bvg*-activados poseen menor capacidad para causar la enfermedad y son designadas fenotípicamente *Vir*⁻. Estas mutaciones pueden complementarse mediante la introducción de la región *bvg* salvaje en un plásmido capaz de replicarse en *B. pertussis*, demostrándose de esta manera que los genes *bvg* actúan en trans (Knapp y Mekalanos, 1988).

Las mutaciones a nivel del locus *bvg* llevan a un fenómeno denominado **cambio de fase**. Este término se refiere a la aparición de variantes genéticamente estables a través de los subcultivos, que han perdido la expresión de los factores *bvg*-regulados. Hasta el momento se han podido caracterizar dos tipos de mutaciones espontáneas que llevan a dichas variantes de fase: una es un corrimiento del marco de lectura dentro de una cadena de citosinas, alteración que puede revertir a *Vir*⁺; la otra corresponde a pequeñas deleciones internas del locus *bvg*, las cuales presumiblemente no son reversibles (Stibitz y col., 1989).

El significado de estas mutaciones en relación con la biología y la evolución de *B. pertussis* y de las otras

especies de *Bordetella* aún no se ha esclarecido.

La secuencia de DNA del locus *bvg* predice la presencia de dos marcos de lectura denominados *bvgA* y *bvgS* (Arico y col., 1989). Los productos de estos genes, BvgA (23 kDa) y BvgS (135 kDa), muestran una secuencia similar a una familia de proteínas regulatorias bacterianas conocidas colectivamente como **sistema de dos componentes** (Ronson y col., 1987). Uno de estos componentes llamado sensor, es una proteína de transmembrana capaz de sentir señales del medio externo y transmitir las al interior celular. La porción que se conserva dentro de la clase de sensores es la porción carboxilo terminal de la proteína. En la mayoría de los casos el sensor es una quinasa capaz de autofosforilarse a nivel de histidinas muy conservadas. El paso subsiguiente es el traspaso del grupo fosfato a un aceptor denominado proteína reguladora (segundo componente del sistema). Dentro de los miembros de esta clase, la porción amino terminal de la proteína es la más conservada y es el lugar donde el grupo fosfato es aceptado a nivel de residuos de aspartato (Bourret y col., 1989). Estas proteínas fosforiladas se unen a sitios específicos de DNA regulando en forma positiva o negativa la expresión de determinados genes en respuesta a las señales traducidas por la proteína sensora.

En el sistema *bvg*, la proteína BvgA tiene una secuencia amino-terminal similar a la de las proteínas reguladoras y la BvgS posee homologías con las proteínas pertenecientes a la clase sensora. Determinadas señales del medio externo,

percibidas por la proteína BvgS, inducen a una fina autoregulación del sistema *bvg* que llevan a cambios considerables en los niveles de la proteína citoplasmática BvgA. En condiciones de inducción la concentración intracelular de BvgA aumenta unas 50 veces, y se dimeriza o forma complejos con una proteína de similar tamaño (Scarlato y col., 1993). En este estado, es capaz de unirse a ciertos promotores en el ADN de *B. pertussis*, activando la transcripción (Figura 2).

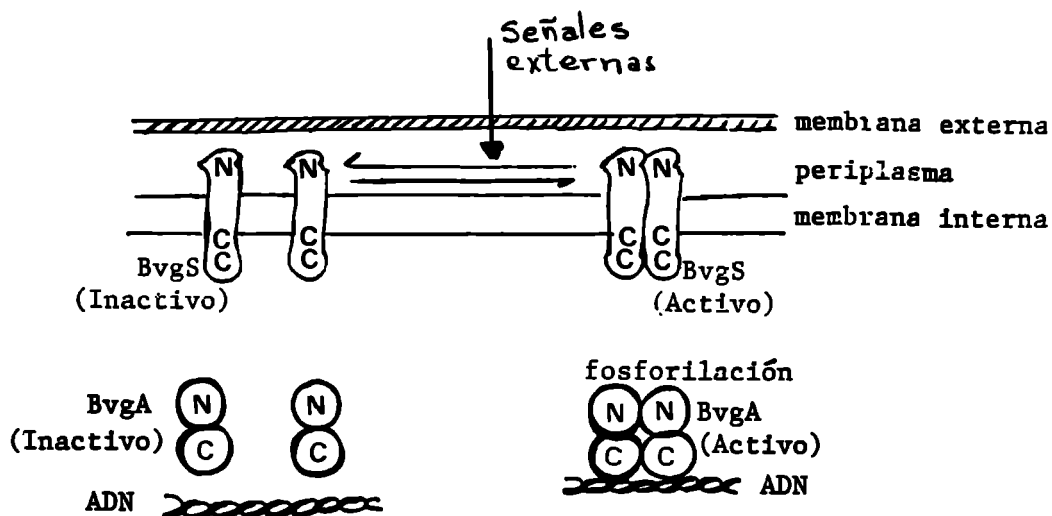


FIGURA 2: Modelo de la activación del sistema *bvg* AS. La proteína BvgS, en respuesta a determinadas señales del medio externo, puede adoptar un forma monomérica o dimérica. En la forma dimérica BvgS es activa como quinasa y promueve la formación de BvgA activa en forma de dímero en el citoplasma. La proteína BvgA activa puede interactuar con las regiones promotoras de un loci apropiado dentro del regulón *bvg*. N y C representan los dominios amino terminal y carboxilo terminal de las proteínas. BvgS posee un modulo receptor inusual (C₂, 947 a 1064 residuos) fusionado a un modulo transmisor típico (C₁, 698 a 930 residuos), el cual presenta homologías con los dominios C-terminal de otras proteínas sensoras. El N-terminal de BvgA presenta homologías con dominios de las proteínas reguladoras.

Este sistema de dos componentes sensor-regulador parece estar involucrado en el fenómeno denominado **modulación fenotípica**, el cual consiste en la reducción de la expresión de los genes *bvg*-activados. Esta regulación coordinada de *B. pertussis* ocurre en respuesta a determinados estímulos químicos y físicos, tales como determinadas concentraciones de $MgSO_4$, ácido nicotínico, y bajas temperaturas (Schneider y Parker, 1982; Melton y Weiss, 1989). *In vivo*, si bien no está aclarado a qué señales responde *B. pertussis*, se ha comprobado que la modulación fenotípica por sales requiere de la presencia de iones SO_4^{2-} y de la represión de la transcripción del gen *vir* por sí mismo, implicando así una autoregulación. Esta falta de acumulación de *vir*-transcriptos resulta en un estado que es fenotípicamente equivalente a un estado Vir^- , en el cual ningún factor de virulencia es expresado. Se ha descrito que varios miembros de la familia de reguladores de dos componentes actúa a través de mecanismos de fosforilación-defosforilación, en el cual el sensor de membrana frente a una condición apropiada fosforila al regulador activando la síntesis de RNA. Es probable entonces que un exceso de iones SO_4^{2-} , anión de estructura similar a los iones fosfatos, interfiera con ese mecanismo de forma tal de obtener un fenotipo Vir^- (Melton y Weiss, 1989).

Esta influencia de los factores externos sobre la expresión de los determinantes de virulencia, muestra la capacidad de los microorganismos infecciosos de responder al entorno que le presenta el hospedador. Dicho de otra manera,

en un proceso de infección la expresión de los genes microbianos se encuentra regulada por interacciones con el hospedador. Cambios del entorno en el hospedador provocan alteraciones correspondientes en la expresión de los genes patógenos, de manera tal que la colonización lleve a la infección y la infección a la enfermedad.

En adición a esta regulación coordinada de la mayoría de los genes de virulencia de *B. pertussis*, los genes de las fimbrias están sujetos a otro tipo de control que ocurre independientemente de los otros genes de virulencia (Willems y col., 1990). Una cepa particular de *B. pertussis* puede producir dos tipos de fimbrias, serológicamente diferentes, designadas serotipo 2 y serotipo 3, solamente un tipo o ninguno de ellos. El mecanismo de esta variación fímbrica probablemente involucra cambios a nivel del DNA, ya que la capacidad de producir una fimbria en particular en niveles altos o bajos es una característica relativamente estable que incluso se transfiere a la progenie. *In vivo*, posiblemente bajo una presión inmunológica, esta variación de fase fímbrica podría observarse.

Estudios recientes indican que una región localizada a 100 pb upstream del gen *fim3* (codifica para fimbria) está involucrada tanto en la regulación coordinada a través del locus *bvg* como en la regulación de la variación fímbrica. Análisis del mRNA específico del gen *fim3*, en fase + o -, revela que inserciones o deleciones de 1-5 pb en una zona de citosinas son responsables de la variación de fase fímbrica.

Estas mutaciones afectan la distancia entre la caja -10 y una secuencia de DNA, tentativamente designada región AB (por activator binding), la cual está bien conservada en todas las secuencias *fim*. La distancia entre la región AB y la caja -10 parece ser importante para el correcto posicionamiento de la molécula de RNA polimerasa. El promotor del gen *fim*, que se asemeja a otros promotores de otros genes regulados positivamente, no contienen la región consenso de -35 y por lo tanto requieren de una proteína activadora para un reconocimiento eficiente de la RNA polimerasa. Esta proteína activadora, que aparentemente se uniría a la región AB, todavía no ha sido identificada. Sin embargo, un posible candidato es un polipéptido *bvg*-codificado.

El promotor *fim* muestra algunas homologías con el promotor de la toxina pertussis, la cual es también regulada por el locus *bvg* (Nicosia y Rappuoli, 1987). Es significativo que el promotor de la toxina pertussis contiene seis citosinas consecutivas en una posición aproximadamente similar a la correspondiente del promotor *fim*. Cuando cuatro de estas seis Cs son deletadas, el promotor de la toxina resulta inactivo (Gross y Rappuoli, 1989), sugiriendo un rol similar para las citosinas en ambos promotores.

B. pertussis posee además de los genes *fim2* y *fim3*, otro gen fímbrico denominado *fimX* (Mooi y col., 1987). Este último gen representa un gen silenciado, ya que para *B. pertussis* no se ha descrito una tercer subunidad fimbrial. Recientemente este aspecto fue confirmado a través de la observación de la

distancia entre la región AB y la caja de -10 del gen *fimX*. En este caso, dicha distancia es 9 a 10 pb más corta que la de los promotores *fim* altamente expresados. La frecuencia de inserciones y deleciones en una región con bases repetidas disminuye con la longitud del DNA repetido. Esta frecuencia en la región de las citosinas de gen *fimX*, es probablemente más baja que las correspondientes a los genes *fim2* y *fim3*.

Esta variabilidad de los factores de virulencia de *B. pertussis* recién descrita, producida ya sea por un cambio genético o por el fenómeno de modulación fenotípica, representa un grave problema desde el punto de vista de la producción de vacunas. Un proceso de selección ocurre continuamente, ya que las cepas degradadas, que surgen como consecuencia de dichos fenómenos, crecen con más facilidad en los medios de cultivo sintéticos que las cepas virulentas provenientes de aislamientos frescos. Esta selección tiende a producir variantes que no tienen valor para la producción de vacunas.

El entendimiento y el consiguiente control de estos fenómenos posibilitará no solo la obtención de cepas adecuadas para la producción de vacunas, sino que además permitirá erradicar la enfermedad eliminando el reservorio de *B. pertussis*, ya que no existirían portadores asintomáticos.

SECUENCIA FISIOPATOLOGICA

La patogénesis de la tos convulsa involucra como se mencionó anteriormente los siguientes estadios: (i) entrada del microorganismo por aerosol a un hospedador susceptible, (ii) adhesión de las bacterias a las células ciliadas del epitelio respiratorio, (iii) disminución o alteración de la defensa inmune del hospedador, (iv) multiplicación y colonización de la mucosa del tracto respiratorio, y (v) secreción de múltiples toxinas, las cuales producen daño local de la mucosa e intoxicación sistémica. En la siguiente sección se describirán los roles de los principales factores de virulencia para cada etapa del proceso infeccioso.

Adhesión: la adhesión específica de células de *B. pertussis* a las cilias ha sido demostrada en varios animales incluyendo hamsters, ratones, conejos, etc (Matsuyama, 1977; Opremcak y Rheins, 1983). Para determinar qué componentes bacterianos actúan como adhesinas se han realizado numerosos estudios *in vitro*. Se ha observado que los microorganismos en fase virulenta se adhieren a una variedad de líneas celulares, incluyendo las células HeLa, Vero y WiDr (Redhead, 1985; Urisu y col., 1985). Si bien en otras bacterias las fimbrias juegan un rol importante en la adhesión a los respectivos tejidos blanco, en *B. pertussis* no existen evidencias claras de que éstas participen en el proceso de adhesión (Steven y col., 1986). Más bien es la hemaglutinina filamentosa la que

ejerce un rol preponderante en este proceso ya que anticuerpos anti-hemaglutinina filamentosa inhiben la adhesión de *B. pertussis* a células HeLa, Vero y WiDr (Urisu y col., 1986). Si bien dicha técnica destaca el rol de FHA en la adhesión, el empleo de estas células no ciliadas no permitió extrapolar estos resultados a la adhesión específica durante la enfermedad. Es así que se realizaron estudios empleando células ciliadas del tracto respiratorio de humanos, los cuales permitieron establecer que tanto la FHA como la toxina pertussis son esenciales en el proceso de adhesión (Tuomanen, 1986). Estas proteínas actuarían como puentes bivalentes entre la bacteria y uno o más receptores de la cilia. Este receptor parecería ser un carbohidrato, ya que la adhesión es inhibida por glicoconjugados conteniendo galactosa-N-acetilglucosamina.

Si bien FHA y PT son esenciales en la adhesión a las cilias (Kimura y col., 1990), parecen no ser suficientes. Se ha observado que otros factores tales como lípidos hemaglutinantes son requeridos para la adhesión (Kawai, 1985).

Evasión de las defensas del hospedador: estudios previos sugirieron que *B. pertussis* produce factores que alteran mecanismos endógenos de defensa. Por ejemplo, se ha observado que niños con pertussis tienen una mayor prevalencia de tuberculina positiva que el resto de la población. Recientemente, Hewlett y colaboradores han demostrado que

niños con cultivo de pertussis probado, tienen un deterioro reversible en la respuesta de hipersensibilidad retardada contra una batería de antígenos, la cual no es observada en otras infecciones bacterianas.

Varios componentes de *B. pertussis* exhiben *in vitro* actividades que podrían explicar las alteraciones del sistema inmune del hospedador infectado. Por ejemplo, la adenilato ciclasa puede inhibir: a) quimiotaxis, fagocitosis, generación de superóxido, y muerte microbiana por parte de los leucocitos polimorfonucleares, b) actividad oxidativa de los macrófagos alveolares y c) actividad oxidativa y muerte bacteriana por los monocitos (Confer y Eaton, 1982; Pearson y col., 1987; Friedman y col., 1987). La persistencia de estos efectos inhibitorios requiere de la presencia continua de la adenilato ciclasa en el medio.

Otro componente de *B. pertussis* que produce efectos profundos en las células inmunes es la toxina pertussis. Meade y colaboradores (1984) encontraron que dicha toxina inhibe tanto *in vivo* como *in vitro* la migración de los monocitos. Se ha demostrado también que la respuesta oxidativa y la liberación de enzimas lisosomales de varios tipos de células fagocíticas son inhibidas por PT (Morse y Morse, 1976; Okajima y Ui, 1984). Las funciones de otros tipos de células, tales como la degranulación de los mastocitos inducida por el compuesto 48/80 y los efectos citolíticos de los linfocitos asesinos también se ve afectada (Nakamura y Ui, 1985).

Otros componentes del microorganismo que podrían afectar la defensa del hospedador son la citotoxina traqueal y la endotoxina (LPS) (Collier y col., 1977; Ayme y col., 1980). La citotoxina traqueal disrumpe el clearance mucociliar, considerado la primer línea de protección del hospedador frente a materiales extraños (Goldman y col., 1982). Esta disrupción resulta en un daño local, el cual será discutido en la siguiente sección.

En relación a la endotoxina existen datos que indican que este componente afecta al sistema inmune (Girard y col., 1981). Sin embargo, ninguna de las alteraciones observadas puede interpretarse directamente como un ventaja para el patógeno y tampoco existen evidencias de que este producto bacteriano juegue un rol en el establecimiento de la enfermedad.

Daño local: el daño local en las ciliias y en las células ciliadas ha sido estudiado extensivamente en el modelo de anillo traqueal de hamster. En este sistema, microorganismos virulentos (pero no avirulentos) se adhieren específicamente a las ciliias. Dentro de las 24 horas de la infección, las ciliias dejan de batirse y después de varios días las células mueren y el tejido comienza a necrosarse (Opremcak y Rheims, 1983).

B. pertussis también provoca en ratones ciliostasis, congestión con mucus y despojos celulares, pero en este caso no se observa ni expulsión de células ciliadas ni necrosis de

tejidos. Este cuadro se asemeja a lo que ocurre en la enfermedad del hombre (Tuomanen y Hendley, 1983).

La citotoxina traqueal es específicamente tóxica para las células ciliadas sobre las cuales ejerce una serie de cambios patológicos incluyendo la muerte y extrusión de estas células de la mucosa (Tuomanen y col., 1983). Sin embargo, aún no está aclarado si esta toxina es responsable de la ciliostasis. Se ha observado que la pérdida del movimiento ciliar ocurre en las primeras 6-12 hs de la infección en hamsters y ratones, pero en cultivos tratados con la toxina purificada dicha pérdida se produce tardíamente en conjunción con la muerte celular. Este resultado sugiere que otros componentes son responsables de dicha función. En este sentido, Goldman y colaboradores (1982) evaluaron en cultivos de órgano traqueal, los efectos patológicos de la toxina dermonecrótica, la toxina pertussis y el sobrenadante de cultivo conteniendo adenilato ciclasa. En ningún caso se observó daño, lo cual indicaría que estos componentes no contribuyen a la patología local.

Una información adicional sobre el daño local se logró mediante el empleo de mutantes por transposición con Tn5, los cuales se inyectaron en la tráquea de conejos (Weiss y Goodwin, 1989). En estas experiencias se empleó como control cepas virulentas salvajes con las cuales se observó adhesión a las cilias y restos proteicos en los alvéolos. En el caso de mutantes deficientes en FHA, la adhesión a las células ciliadas no ocurrió y consecuentemente el microorganismo

pasó a los pulmones los cuales se presentaron hemorrágicos. Los mutantes deficientes en PT tampoco se adhirieron a las células ciliadas y en este caso se observó puntos de hemorragia en la superficie de los pulmones. Desafortunadamente mutantes de adenilato ciclasa no pudieron ser evaluados en este sistema. Estos resultados sugieren que mutantes deficientes en la adhesión entran en los pulmones donde la toxina pertussis contribuye a provocar lesiones hemorrágicas.

Enfermedad sistémica: una de las más notables anormalidades sistémicas observadas en pertussis es la leucocitosis con predominancia de linfocitos, los cuales generalmente exceden los $2 \times 10^4 \text{ mm}^{-3}$ en sangre periférica.

Existen resultados que aunque no sean directos permiten por lo menos sugerir que el perfil de la infección con *B. pertussis* en animales corre paralelo al que ocurre con la administración de toxina pertussis (Morse y Morse, 1976; Pittman y col., 1980). Estudios realizados en niños con la enfermedad clínica avalan el rol de la toxina pertussis en la patología sistémica. Badr-El-Din y colaboradores (1976) realizaron estudios comparativos entre niños considerados control, niños con otras infecciones y niños con pertussis analizando el incremento de glucosa en sangre en respuesta a la administración subcutánea de epinefrina. Ellos observaron que los niños con pertussis presentaban un defecto significativo en la respuesta glicémica, lo cual concidía con

lo hallado en animales experimentales administrados sólo con toxina pertussis.

La tos paroxística característica de pertussis no ha sido bien estudiada debido a la falta de un modelo animal adecuado. Sin embargo, se ha podido establecer que la toxina pertussis no es responsable directa de la tos. De hecho, pacientes infectados con *B. parapertussis*, microorganismo que no produce la toxina, presentan tos. La toxina probablemente intensifique la tos interfiriendo en los mecanismos regulatorios tanto localmente en el tracto respiratorio como centralmente en el sistema nervioso.

Una seria pero no común complicación de la enfermedad es el desarrollo de encefalopatías (Redhead y col., 1987). Esta secuela ha sido atribuída a la hipoxia, hipoglucemia, hemorragia local secundaria a la tos vigorosa o a la toxina pertussis. Sin embargo, en estos pacientes los únicos hallazgos patológicos consistentes son: edema, hemorragias y tapones linfocíticos vasculares en el cerebro.

Una encefalopatía similar se asocia con la administración de la vacuna pertussis lo cual lleva a la pregunta de si el mecanismo etiológico de la enfermedad es similar al de la inmunidad (Hewlett y Cowell, 1989).

La toxina pertussis ha demostrado ser uno de los componentes de las vacunas responsable de esta importante complicación (Munoz y col., 1987). Sin embargo, esta secuela de la enfermedad parece tener una etiología multifactorial.

En resumen, la toxina pertussis se disemina

sistémicamente durante la enfermedad provocando una serie de anomalías no respiratorias.

El nivel de la toxina liberada probablemente depende de factores locales dentro del tracto respiratorio y de la acción de otros componentes bacterianos tales como la adenilato ciclasa y la citotoxina traqueal. Como en otras infecciones respiratorias, la tos es sin duda alguna debida a efectos locales provocados por productos bacterianos. La inusual tos paroxística como así también su extensa duración son probablemente consecuencia de la acción de la toxina pertussis sola o en conjunción con otros factores.

CONTROL DE LA ENFERMEDAD

Sobre la base del conocimiento de que el único reservorio conocido de *B. pertussis* es el hombre, la enfermedad podría erradicarse mediante una inmunización masiva, continua y eficaz.

El primer intento de inmunizar a los niños contra la tos convulsa comienza casi inmediatamente después del aislamiento e identificación del agente causal en 1906 por Bordet y Gengou. Durante las siguientes décadas se produjeron y ensayaron muchas preparaciones de vacunas, las cuales estaban constituidas por microorganismos crecidos en agar Bordet-Gengou o modificaciones del mismo, y posteriormente muertos e

inactivados por una variedad de métodos químicos o físicos. En aquella época no existían métodos capaces de cuantificar con precisión la potencia y la toxicidad de las preparaciones, antes que las mismas fueran administradas a los niños. A pesar de este hecho, tanto la morbilidad como la mortalidad se redujeron notablemente desde que se comenzó con la inmunización.

Tres tipos básicos de vacunas han sido empleados desde entonces en las inmunizaciones rutinarias, las cuales incluyen: 1) vacunas de células enteras inactivadas, conteniendo *B. pertussis* obtenidas de cultivos en medio sólido; 2) vacunas de células enteras inactivadas provenientes de cultivos líquidos; y 3) vacunas preparadas a partir de extractos de microorganismos parcialmente purificados, provenientes de medios líquidos.

Las distintas vacunas de células enteras provenientes de medios sólidos y líquidos presentan diferencias en: a) método de inactivación (calor o químico), b) tipo de medio empleado para el crecimiento del microorganismo (medios agarizados suplementados con sangre de animales, medios semisintéticos o medios químicamente definidos), c) cepas utilizadas en la producción, y d) adición o no de un adyuvante en la formulación final. Las ventajas y desventajas del empleo de cada una de estas vacunas son descriptas en la tabla 2.

TABLA 2: Ventajas y desventajas de las vacunas pertussis celulares

Tipo de vacuna	Ventajas	Desventajas
provenientes de medios sólidos agar-sangre de animal.	Las sustancias tóxicas son absorbidas o difundidas dentro del agar.	Altos costos de producción. Pueden contener proteínas animales residuales. Potencial efecto sensibilizante.
provenientes de medios sólidos semisintéticos.	No contiene proteínas animales residuales. Las sustancias tóxicas liberadas son absorbidas o difundidas dentro del agar	Altos costos de producción. Pueden contener aditivos (carbón) de difícil remoción
provenientes de medios líquidos semisintéticos.	No contiene proteínas animales residuales. Más eficiencia en la producción y menor costo que las provenientes de medios sólidos.	Gran variabilidad de lote a lote. Difícil detoxificación. Contienen aditivos de difícil remoción.
provenientes de medios líquidos químicamente definidos.	Se emplea grandes vol. en el proceso de producción, lo que implica menores costos. No contienen proteínas ni aditivos indeseables. Gran reproducibilidad lote a lote	Más difícil de detoxificar que las provenientes de medios sólidos.
extractos celulares provenientes de medios líquidos semisintéticos.	Baja toxicidad en ratones y menor reactividad en humanos en relación a cualquier vacuna de organismos enteros	En estudios en animales estas vacunas tienen el mismo nivel de reactogenicidad que las vacunas de cél. enteras.

Si se considera que hace veinte años los procesos de producción de vacunas eran muy laboriosos y discontinuos y se los compara con los actuales, realizados en fermentadores

(con el control de variables físicas y químicas), con medios químicamente definidos, libres de proteínas animales, carbón, etc se puede admitir que se ha alcanzado un progreso considerable en la tecnología de producción de vacunas. Sin embargo, estas mejoras en las técnicas de producción no responden a la demanda de una vacuna mejorada en relación a su eficacia y reactogenicidad, aspectos que se discutirán a continuación.

En relación a la eficacia de las vacunas celulares de *B. pertussis*, ésta ha estado bajo análisis a partir de 1950. En 1987, Fine y Clarckson establecieron que dichas vacunas son más efectivas en la protección contra la sintomatología de la enfermedad que contra la infección. Ellos basaron sus afirmaciones en varias observaciones: 1) la enfermedad clínica de pertussis es menos severa en individuos vacunados que en los no vacunados, 2) la respuesta inmunológica a la vacuna tradicional involucra predominantemente IgG y poca IgA (lo cual es consistente con una mejor protección contra los estadios asociados con la morbilidad, posteriores a la infección, que contra los primeros estadios de colonización) y 3) las epidemias de pertussis ocurren cíclicamente dependiendo de la acumulación de individuos susceptibles en la población. Si realmente la vacunación protegiese más contra la enfermedad que contra la infección, la frecuencia de los ciclos no debería afectarse por la vacunación, y efectivamente, en varios países se pudo observar una constancia en los ciclos de epidemias aún después de la

introducción de la vacunación.

Por otra parte y en relación a la reactogenicidad, se ha reportado una alta proporción de complicaciones menores y efectos colaterales, que se producen como consecuencia de la vacunación (Cody y col., 1981). Este hecho no resulta sorprendente si se tiene en cuenta la compleja naturaleza de la vacunas de células enteras, las cuales contienen lipopolisacáridos (endotoxina) (Steinman y col., 1982) y toxina pertussis biológicamente activa (Munoz y col., 1987). Dentro de las reacciones observadas, que oscilan de leves a moderadas, pueden citarse: enrojecimiento, edema, induración y sensibilidad anormal en el lugar de la inyección, somnolencia, mal humor, anoréxia, vómitos y fiebre. Estas reacciones se presentan varias horas después de la inmunización y disminuyen en forma espontánea sin dejar secuelas. La frecuencia de estas reacciones tiende a aumentar con las dosis posteriores de vacuna triple (DTP).

Se han asociado también a la inmunización contra la tos convulsa, efectos adversos más graves, los cuales incluyen fiebre elevada (más de 40.5 °C), convulsiones, llanto persistente o poco usual (durante tres o más horas), colapso con estado semejante al choque hipotónico-hiporresponsivo, y manifestaciones encefalopáticas (Wardlaw y Parton, 1983; Robinson y col., 1985). Como consecuencia de los casos reportados, en algunos países los beneficios de la vacunación en comparación con los riesgos de la misma han sido cuestionados y como resultado, la aceptación de la vacuna ha

disminuído con el consiguiente incremento de la enfermedad.

Es por todo ello que si bien es aceptado que las vacunas celulares de *B. pertussis* han sido útiles en el control de la enfermedad, existe un acuerdo general sobre la necesidad de desarrollar una vacuna más efectiva y menos reactogénica. En este sentido, en los últimos años las investigaciones se han orientado hacia la identificación de antígenos protectores, de forma tal de administrar sólo los más significativos y disminuir de esta manera la toxicidad de las vacunas (Robinson y col., 1985; Manclark y Burns, 1985). Estas **vacunas acelulares** (o de componentes) deberán no sólo proteger a los individuos de la infección y de la enfermedad, sino además reducir el número de portadores asintomáticos.

La incorporación de un antígeno en particular dependerá de su rol en la patogénesis y de la demostración de su potencia protectora en un modelo animal relevante de infección con pertussis.

Los primeros y principales candidatos propuestos para constituir dichas vacunas fueron FHA y PT (Sato y col., 1984). FHA se seleccionó porque no presenta propiedades tóxicas y porque además interviene en la adhesión de *B. pertussis* al tracto respiratorio del hospedador (Kimura y col., 1990). La toxina pertussis se ha seleccionado por su importante rol tóxico durante el desarrollo de la enfermedad (García-Sainz y col., 1987). De hecho, las dos primeras generaciones de vacunas acelulares están constituidas respectivamente por PT sola o en conjunción con FHA, en

diferentes relaciones de concentración. Estas vacunas se preparan a partir de sobrenadantes de cultivo a los cuales se les ha removido LPS, a través de una centrifugación en gradientes de sacarosa (Sato y col., 1984). Los antígenos son detoxificados con formaldehído y absorbidos en hidróxido de aluminio. Si bien estas vacunas resultan ser seguras, no producen el nivel de inmunidad deseado (Mortimer, 1990), circunstancia que sugiere que otros componentes antigénicos deberán ser incluidos en las nuevas formulaciones. En este sentido, se han propuesto como potenciales antígenos protectores a la toxina lábil al calor (HLT), citotoxina traqueal y algunas proteínas de membrana externa, en particular la proteína pertactina (Cookson y col., 1989; Charles y col., 1989).

Recientemente se ha demostrado que la adenilato ciclasa (AC) es un antígeno protector contra la enfermedad, en los dos modelos de desafío animal (intracerebral y respiratorio) que se emplean al presente, para ensayar la eficacia protectora de un factor dado (Guiso y col., 1989). Se ha podido observar además, que inmunizaciones con AC inducen protección contra la colonización bacteriana (Goodwin y Weiss, 1990). La eficacia de esta protección es menor que la correspondiente a las vacunas celulares, lo cual indicaría que otros factores además de AC intervienen en la colonización.

La adenilato ciclasa de *B. parapertussis* también protege contra la colonización bacteriana por *B. parapertussis*. En

este caso la eficacia protectora es equivalente a la de las vacunas celulares (Goodwin y Weiss, 1990; Guiso y col., en prensa). Este hecho, sumado a que *B. parapertussis* no expresa el otro antígeno importante PT, sugiere que la adenilato ciclasa juega un rol principal como factor responsable de la colonización.

Como consecuencia de esta actividad, las inmunizaciones con AC podrían contribuir a reducir el número de portadores asintomáticos, no solo de *B. pertussis*, sino también de las otras especies de *Bordetella* patógenas para el hombre.

A pesar de los adelantos logrados en relación a la identificación de antígenos protectores, en la actualidad la composición definitiva de una vacuna acelular más efectiva y menos reactogénica aún no ha sido establecida y continúa en estudio.

EFFECTOS DE LA COMPOSICION DEL MEDIO Y LAS CONDICIONES DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCION DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA DE *B. PERTUSSIS*

Desde el punto de vista biotecnológico de producción de vacunas, todo procedimiento tendiente a incrementar el rendimiento y la estabilidad de los inmunógenos resulta ser altamente deseable. Tradicionalmente, la dependencia de los rendimientos de biomasa de *B. pertussis* con las condiciones de cultivo preocupaba a los productores de vacunas pertussis.

En un principio los diferentes procedimientos de producción de vacunas celulares, se orientaron a optimizar la obtención de un número máximo de microorganismos, los cuales debían responder a las exigencias establecidas para este tipo de inmunógeno: 1) un correcto serotipo, 2) una adecuada respuesta a los requerimientos del test intracerebral de potencia en ratones (actualmente cuestionado), y 3) una toxicidad baja, la cual era y es evaluada por el test de ganancia de peso en ratones (Cameron, 1976).

Luego, bajo la orientación mundial dirigida hacia las vacunas acelulares, los esfuerzos se enfocaron hacia la obtención de altos rendimientos de los antígenos deseados, para lo cual se deben elegir cuidadosamente las condiciones de cultivo. Existen una serie de estudios sistemáticos referidos a los efectos de la composición del medio y de las condiciones de cultivo en la producción de varios antígenos de *B. pertussis*. Uno de los primeros trabajos sobre la modulación fenotípica (Lacey, 1960) hace referencia a los efectos del cambio en la concentración iónica y en el contenido de vitaminas del medio sobre la composición antigénica de las células. Otras publicaciones (Warldaw y col., 1976; Parton y Durham, 1978; Wardlaw y Parton, 1983; Idigbe y col., 1981; Brownlie y col., 1985) extendieron estos estudios y mostraron que pequeñas modificaciones en la composición del medio de cultivo provocan cambios profundos en la patogenicidad e inmunogenicidad de *B. pertussis*.

En la siguiente sección se describen algunos efectos de

la manipulación de las condiciones de cultivo sobre la producción de factores de virulencia de *B. pertussis*.

Toxina lábil al calor (HLT): la producción de esta toxina es afectada por la variación de fase y la modulación fenotípica (fenómenos descritos en secciones anteriores). Es por ello que la presencia de $MgSO_4$ (43 mM) y las bajas temperaturas (temperaturas más bajas que 30°C) reducen la actividad de la toxina (Livey y col., 1978; Robinson y col., 1983; Melton y Weiss, 1989). Por otra parte, alteraciones en la concentración de hierro no afectan la producción de HLT, pero altas concentraciones de ácido nicotínico reducen los niveles de la misma. Elevados niveles de glutamato o de prolina llevan a una alta producción de la toxina. Lane (1968) demostró que la producción de HLT se asocia al crecimiento activo de las células y no a la lisis celular. Además, Cowell y colaboradores (1979) encontraron que el máximo rendimiento de la toxina precede a la fase estacionaria.

Hemaglutinina filamentosa: FHA se puede obtener tanto de cultivo líquidos estáticos (Ashworth y col., 1982) como de extractos celulares provenientes de medios sólidos (Irons y col., 1983). Arai y Munoz (1979) observaron diferencias en los niveles de FHA cuando se empleaban diferentes condiciones de cultivo. Por ejemplo, si el glutatión y el $FeSO_4$ se autoclavan junto con los otros componentes del medio, el

nivel de FHA que se obtiene es bajo. También se observaron diferencias en los niveles de FHA entre los cultivos de *B. pertussis* realizados en medios estáticos y en medios agitados, ya que la producción de esta proteína se ve inhibida por la aereación (Arai y Munoz, 1979).

Por otra parte, diferentes cepas producen distintos niveles de FHA, en particular cepas moduladas o avirulentas producen muy poca FHA (Weiss y Falkow, 1984; Melton y Weiss, 1989).

Se pudo observar que incrementando el contenido de prolina en el medio sintético de Stainer-Scholte (1971) (SS) se puede aumentar el rendimiento de FHA en cultivos en fermentadores; dicho incremento se hace más pronunciado cuando se controlan los niveles de oxígeno. La incorporación de un producto derivado de las ciclodextrinas (2,6-O-dimetil- β -ciclodextrina, Me β CD) al medio de cultivo incrementa y estabiliza los niveles de FHA en comparación con los correspondientes al medio SS sólo (Suzuki y col., 1985). El alcohol polivinílico también es un agente estimulador de la producción de FHA (Nikolajewski y col., 1990).

Toxina pertussis: Sato y colaboradores (1983) obtuvieron altos niveles de PT y FHA de cultivos estáticos en el medio SS reduciendo el contenido de buffer Tris a una concentración de 1.525 g/l.

Estudios preliminares permiten especular que el incremento de la concentración de prolina en el medio SS

provocaría un aumento en la producción de PT. Si bien se ha observado que concentraciones altas de prolina afectan los niveles de otros importantes antígenos de *B. pertussis*, en el caso de la toxina pertussis esta dependencia debe ser estudiada con más profundidad.

El empleo de ciclodextrina de acuerdo a Imaizumi y col. (1983_b) y Suzuki y col. (1985) también incrementa la producción de PT, permitiendo obtener un máximo de concentración de 50 mg de la toxina por litro de medio de cultivo. Estos resultados fueron confirmados por otros autores, pero con rendimientos más bajos. Los polivinilalcoholes de diferente peso molecular incrementan los niveles de PT tanto en el medio de Cohen Weeler como en el medio SS (Nikolajewski y col., 1990).

Aglutinógenos: estos fueron aislados de células crecidas en medios líquidos por Onoue y colaboradores (1963). Para la obtención del aglutinógeno 3 se empleó el medio SS con glicerofosfato en lugar del buffer Tris (Ragnhild y col., 1985). No existen estudios detallados sobre las condiciones de cultivo que se requieren para la máxima producción de aglutinógenos sino que en general están referidos a la purificación de los mismos.

Citotoxina traqueal: Goldman y colaboradores (1982) obtuvieron buenos rendimientos de esta toxina en condiciones cuidadosamente definidas. Observaron que era importante

adicionar al medio de cultivo SS, suero fetal bovino y realizar las dos primeras horas de incubación en 95% de aire y 5% de CO₂. La cosecha final del medio líquido se realiza en la fase logarítmica tardía, indicando que la liberación de TCT está asociada al crecimiento celular de *B. pertussis* (Goldman y col., 1990).

Adenilato ciclasa: Hewlett y Wolff (1976) mostraron que una significativa proporción de AC de *B. pertussis* es extracelular y se acumula en el medio de cultivo durante la fase logarítmica del crecimiento celular. La producción de AC está influenciada por las condiciones del entorno (Melton y Weiss, 1989). El reemplazo de NaCl del medio SS por MgSO₄ o por la adición de ácido nicotínico provoca una disminución de la actividad de AC tanto del sobrenadante de cultivo como la extracitoplasmática asociada a las células y la citoplasmática (Brownlie y col., 1984).

Endotoxina: no se han realizado trabajos relacionados con la manipulación de las condiciones de cultivo para la modificación de los niveles de endotoxina (LPS). Sin embargo, sí existe un acuerdo general en que las futuras vacunas deberán contener la menor cantidad posible de estos potenciales materiales reactogénicos y pirogénicos.

La tos convulsa (pertussis) es una enfermedad infecciosa aguda, que afecta preferentemente a niños menores de cuatro años de edad. Se caracteriza por presentar tos paroxística, leucocitosis, hipoglucemia y ocasionalmente, complicaciones neurológicas (Cherry y col., 1988). Su principal agente etiológico es *Bordetella pertussis*, pero también se han reportado casos donde el agente causal es *B. parapertussis*.

Para la prevención de esta enfermedad se emplean en muchos países, incluyendo Argentina, vacunas consistentes en suspensiones bacterianas del agente causal muerto por calor y detoxificado (Griffiths y Kreenftenber, 1985). Estas vacunas han demostrado ser efectivas en la protección contra la enfermedad y en la disminución de la morbilidad y la mortalidad de los niños. Sin embargo, desde hace algunos años la aceptación de las mismas ha disminuído debido a la aparición en número creciente de reportes referidos al desarrollo de reacciones adversas post-vacunación de pertussis (Robinson y col., 1985_b). Estas reacciones como se indicó anteriormente van desde moderadas hasta reacciones neurológicas severas que pueden ocasionar la muerte en una proporción de 1 310000 vacunaciones.

Consecuentemente, en los últimos años la incidencia de la enfermedad en la población ha aumentado.

El consenso de la opinión es que estas vacunas

celulares complejas incluyen componentes, tales como los lipopolisacáridos (LPS) de membrana externa, que son innecesarios para la protección contra la enfermedad y que pueden contribuir al desarrollo de reacciones adversas indeseables (Griffiths y Kreenftenber, 1985).

Es así que surge la necesidad de obtener una nueva vacuna de tipo acelular constituida por componentes bien caracterizados de *B. pertussis*, que resulte más eficaz y menos reactogénica (Manclark y Burns, 1985). Estas vacunas no sólo deberán proteger a los niños de la enfermedad sino que además deberán reducir el número de portadores asintomáticos de *B. pertussis*.

Entre los problemas que se presentan en el desarrollo de dicha vacuna, uno de los más importantes es la determinación de los inmunógenos que la constituirán.

Dos componentes de *B. pertussis*, la toxina pertussis (PT) (Weiss y col., 1984) y la hemaglutinina filamentosa (FHA) (Kimura y col., 1990) han recibido considerable atención como potenciales candidatos vacunales.

Si bien se han desarrollado vacunas con estos dos importantes inmunógenos en diferentes proporciones, éstas no satisfacen los niveles de inmunogenicidad deseados (Mortimer, 1990). Además, se ha demostrado que la toxina pertussis no es la única toxina importante ya que *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* provocan una enfermedad símil-pertussis en humanos y en ratones respectivamente, pero no expresan PT funcional (Aricó y Rappuoli, 1987). Estos resultados

indicarían que otros inmunógenos de *B. pertussis* deberán incluirse en la nueva vacuna acelular (Shahin y col., 1990).

Dentro de los factores de virulencia expresados por las tres especies de *Bordetella* que pueden contribuir por un lado al desarrollo de la enfermedad y por otro a la protección, la adenilato ciclasa (AC) merece especial consideración (Guiso y col., 1989). Este antígeno ha sido recientemente propuesto como futuro componente de una vacuna acelular ya que: 1) mutantes deficientes en la expresión de esta proteína pierden la capacidad de causar una infección letal en ratones (Weiss y col., 1985), 2) la reincorporación del gen que codifica para AC en estos mutantes restituye la capacidad virulenta (Weiss y col., 1985), 3) derivados altamente virulentos de *B. pertussis* y *B. parapertussis* expresan altos niveles de AC (Guiso y col., 1989), 4) AC actúa como antígeno protector tanto en el modelo animal de desafío intracerebral como en el de desafío respiratorio (Guiso y col., en prensa), y 5) anticuerpos anti-AC protegen a ratones de una infección con *pertussis* (Guiso y col., 1989).

Otro de los problemas que se presenta en el desarrollo de la vacuna acelular, lo constituye la producción de los inmunógenos. Esto se debe a que los rendimientos que se obtienen de los mismos en sobrenadantes de cultivo son bajos, lo cual es necesario revertir desde el punto de vista de su producción industrial. Más aún, en el medio sintético de Stainer-Scholte (SS) recomendado para la producción de *B. pertussis* en fase virulenta, la actividad biológica de la

toxina pertussis y de la hemaglutinina filamentosa decaen marcadamente al finalizar la fase logarítmica de crecimiento (Bellalou y Relyveld, 1984).

En 1983 un importante avance en la producción a gran escala se logró mediante el uso de un producto derivado de las ciclodextrinas (2,6-O-dimetil- β -ciclodextrina, Me β CD), que incorporado al medio de cultivo provoca un incremento en el rendimiento celular y en los niveles de PT y FHA (Imaizumi y col., 1983_a; Imaizumi y col., 1983_b; Gorringe y col., 1988). Los resultados publicados hasta el presente no explican el mecanismo de acción de este componente ni su efecto sobre otros importantes inmunógenos.

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes sobre la problemática de obtención de una nueva vacuna acelular, los trabajos de esta Tesis se enfocaron hacia el esclarecimiento de los factores (no conocidos al presente) que afectan la producción y la estabilidad de uno de los potenciales constituyentes vacunales: la adenilato ciclasa (AC) extracelular (Hanski, 1989).

En este sentido primeramente se estudió la cinética de producción y estabilidad de AC en el medio base de Stainer-Scholte. En las experiencias desarrolladas con ese fin, se pudo observar que la actividad biológica de dicho antígeno presenta un máximo en la fase de desaceleración del desarrollo celular que luego decae al alcanzar la fase estacionaria (Hozbor y col., 1991).

Seguidamente y teniendo en cuenta la premisa de que todo

procedimiento tendiente a incrementar los rendimientos y la estabilidad de los inmunógenos es altamente deseable desde el punto de vista de la producción de una vacuna, se analizó las posibles causas de la caída de actividad observada. Entre las mismas se consideraron y estudiaron las siguientes:

- 1- actividad proteolítica.
- 2- cambio de fase virulenta a avirulenta.
- 3- formación de agregados moleculares del enzima, con diferente actividad específica.
- 4- presencia de inhibidores.

En base a los resultados obtenidos y recordando la acción de la ciclodextrina sobre la toxina pertussis y la hemaglutinina filamentosa, se decidió estudiar primeramente el efecto de este agente sobre la cinética de producción de la adenilato ciclasa extracelular.

Luego de observar un efecto estimulatorio de la ciclodextrina sobre la producción de AC, se comenzó a analizar el mecanismo de acción de dicho agente (Hozbor y col., 1991). Este conocimiento en primera instancia, permitiría avanzar en el esclarecimiento de la o las causas de la pérdida de actividad observada. En este sentido se analizaron los siguientes aspectos:

- a- acción secuestrante de la ciclodextrina.
- b- acción desagregante de la ciclodextrina.

c- acción desestabilizante de la membrana externa y su relación con liberación de antígenos.

Finalmente, todos los resultados obtenidos en este trabajo se incluyen en un modelo que trata de explicar el comportamiento de la adenilato ciclasa extracelular frente a los diferentes efectores del entorno, permitiendo así el diseño de futuras estrategias tendientes a optimizar la producción de dicho antígeno.

Capítulo 2

Cepas bacterianas utilizadas

B. pertussis Tohama (CIP 8132) fase I virulenta, *B. parapertussis* (CIP 64.11 T) y *B. bronchiseptica* (CIP 55110 T) provenientes del Instituto Pasteur de París. Los stock bacterianos se conservan como liofilizados y a -70°C como una densa suspensión en el medio de Stainer-Scholte conteniendo 15 % de glicerol.

Medios de cultivo líquido empleados

Medio base de Stainer-Scholte (SS) (Tabla 3) sin y con las siguientes modificaciones:

- SS+Me β CD: el medio SS es suplementado con ciclodextrina en distintas concentraciones (1 g/l y 3 g/l).

- SS-Mg: el NaCl del medio SS es reemplazado por el agente modulador MgSO₄ a igual concentración (43 mM).

- SS-HEPES: el buffer Tris del medio SS es reemplazado por el buffer HEPES (N-2-hidroximetilpirazina N-2 ácido etansulfónico) en una concentración de 0.05 M.

Tabla 3: Composición del medio base de Stainer-Scholte

COMPONENTES	CONCENTRACION
Glutamato monosódico	10.70 g/l
L-Prolina	0.24 g/l
KH ₂ PO ₄	0.50 g/l
KCl	0.20 g/l
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.10 g/l
CaCl ₂ (solución al 1%)	20.00 ml
Tris-HCl	1.52 g/l
NaCl	2.50 g/l

Se lleva a pH 7.2 con una solución concentrada de HCl y se esteriliza 15 min. en autoclave. A este medio se le adiciona los siguientes componentes (complemento) esterilizados por filtración a través de una membrana de 0.22 μ de diámetro de poro:

Composición del complemento 10X (10 ml)

COMPONENTES	CANTIDAD
FeSO ₄ 7H ₂ O	100 mg
Cisteína	400 mg
HCl	1 ml
Nicotinamida	40 mg
Acido ascórbico	200 mg
Glutati6n reducido	10 mg

In6culo y condiciones de cultivo

Los liofilizados bacterianos se resuspenden en una solución al 1% de casaminoácidos y se siembran en placas con agar Bordet Gengou (Difco) suplementado con 15% de sangre

desfibrinada de carnero (ABGs). Las células se crecen por 48 hs para *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis* y 72 hs para *B. pertussis*. Luego se subcultivan por 24 hs en ABGs a 36°C. El crecimiento de estas placas se transfiere a un erlenmeyer de 1 l de capacidad conteniendo 250 ml del medio SS, el cual se incuba por 24 hs a 36°C con agitación rotatoria a 160 rpm ($DO_{650nm}:1$). Veinticinco mililitros de esta suspensión se utilizan como inóculo para los siguientes medios: SS y SS+Me β CD. Para el caso de *B. pertussis* en particular se emplean los medios: a) SS, b) SS-Mg, c) SS+Me β CD, d) SS-HEPES; y para *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*: los medios SS y SS+Me β CD.

Los cultivos se siguen hasta las 48 hs del desarrollo celular, tomando muestras a diferentes tiempos.

Para obtener una variante avirulenta se siembra la cepa Tohama de *B. pertussis* fase I en placas de agar Bordet-Gengou suplementadas con MgSO₄ 0.02 mM (AGBs-Mg) efectuándose ocho pasajes sucesivos cada 30 hs. El crecimiento de las mismas se transfieren a un erlenmeyer de 1 l de capacidad conteniendo 250 ml del medio SS suplementado con MgSO₄ 43 mM (SS-Mg). El seguimiento del cultivo se realiza de la misma manera que para los cultivos anteriormente descritos.

Crecimiento celular

El desarrollo celular en los distintos medios de cultivo y para cada una de las cepas es seguido por medidas de densidad óptica a 650 nm.

Determinación de la actividad hemaglutinante de FHA

Este ensayo de hemaglutinación se realiza a partir de sobrenadantes de cultivo libres de células correspondientes a distintas horas del desarrollo celular. Se hacen diluciones seriadas en base dos de 100 μ l de dichos sobrenadantes en suero inactivado de conejo (0.5% en solución fisiológica). Luego se les adiciona 50 μ l de una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 0.7% en buffer fosfatos (PBS) pH: 7.2. Después de 15 minutos de agitación suave, las mezclas se incuban durante dos horas a 37°C en cámara húmeda.

Las unidades de hemaglutinación se expresan como la recíproca de la máxima dilución en la cual se observa una aglutinación completa.

Determinación de la actividad de AC extracelular

Este ensayo se realiza de acuerdo al método de Flawiá y colaboradores (1972). La composición de la mezcla de incubación es la siguiente: 50 μ L de sobrenadante de cultivo

correspondiente a una hora determinada del desarrollo celular, solución buffer Tris-HCl 500 mM pH:7,5; 3-isobutil-1-metil xantina 0,2 mM; AMPc 1 mM; MnCl₂ 2,5mM; α [³²P]ATP 1 mM (con una actividad específica que varía entre 100 y 600 cpm por pmol); fosfocreatinina kinasa 0,2 mg/mL. El volumen total es de 0,1 ml. Las incubaciones fueron realizadas a 37°C durante 15 minutos. La reacción fue detenida por el agregado de una solución que contiene ATP 40 mM, [³H] AMPc 12,5 mM (actividad específica 3.800 cpm por umol) y por calentamiento en un baño de agua a ebullición durante tres minutos (Rodbell, 1967).

El AMPc formado se purifica siguiendo el proceso de cromatografía secuencial en columnas DOWEX 50W-X4 y alúmina. La base del método consiste en separar el AMPc radiactivo de los fosfatos radiactivos o no (ATP, ADP, AMP, P_{Pi}, P_i) a través de una resina intercambiadora de cationes DOWEX 50W-X4 donde los protones de la resina se intercambian con los -NH₂⁺ de la adenina de los nucleótidos. El AMPc es el único compuesto retenido en la resina, pues su carga positiva (adenosina) no es totalmente contrarrestada por la única carga negativa del grupo fosfato. Luego del pasaje por esta resina, el AMPc fue adecuadamente purificado en una columna de alúmina que retiene los compuestos fosforilados aún presentes, excepto el AMPc, que no se retiene a pH neutro.

Los pasos de purificación se detallan a continuación: una vez detenida la reacción se agrega 1 ml de agua a las muestras y se siembra en la columna de resina DOWEX-50W-X4

forma protónica de 4 cm de largo por 0,5 cm de diámetro interno. Después del pasaje de la muestra, se lava con 5 ml de agua en dos etapas, una de 1 ml y la otra de 4 ml; descartándose los eluidos. Luego se pasan los 6 ml por la columna de alúmina y habiéndose desechado el eluido correspondiente, se lava esta columna con 1 ml de buffer imidazol-HCl y luego con 4 ml del mismo buffer recogiendo el eluido en frascos de centelleo líquido. La radiactividad se mide según el método de Bray (1960). Las lecturas se realizan en un contador de centelleo marca Beckman LS 1801. Se utilizan los siguientes parámetros: para el ^3H ventana entre 0 y 200 y para el ^{32}P ventana entre 500 y 1.000.

Determinación de la actividad hemolítica (Hemolisina)

La actividad hemolítica se informa positiva o negativa de acuerdo a la presencia o no de un halo de hemólisis en placas de agar Bordet-Gengou suplementadas con 15 % de sangre de carnero desfibrinada.

Resistencia a antibióticos

Este es uno de los ensayos que se emplean para diferenciar una variante virulenta de una avirulenta. El antibiótico utilizado es la eritromicina, el cual es adicionado a las placas de agar Bordet Gengou sangre en una concentración de 25 μg por ml de medio de cultivo.

Determinación de proteínas

El dosaje de proteínas se realiza de acuerdo al método de Lowry y colaboradores (1951) empleando seroalbúmina bovina (Sigma Chemical Co., USA) como estándar.

Polipéptidos de membrana externa

Los polipéptidos se preparan empleando el método de Shnaitman (1971_a) con pequeñas modificaciones. Las células provenientes de 10 ml de cultivo se concentran por centrifugación, se lavan y se resuspenden en 5 ml de buffer HEPES (N-2-hidroximetilpirazina N-2 ácido etansulfónico) pH 7,4 10 mM Después de una sonicación refrigerada de 10 minutos (fraccionada en pulsos de 2 min.) las células enteras y los grandes fragmentos se remueven por centrifugación (3.000 x g 10 min. a 4°C). La cubierta de las células se sedimenta por centrifugación del sobrenadante (16.000 x g 60 min. a 4°C). El pellet se resuspende en HEPES 10 mM conteniendo 2% de Tritón X-100 y se incuba a temperatura ambiente durante 30 min. El material insoluble que queda se sedimenta por centrifugación (16.000 x g 60 min. a 4°C) y se repite la extracción con Tritón X-100. El pellet final es resuspendido en 20 µl de agua más 20 µl de buffer de carga. Se centrifuga y se siembra el sobrenadante (20-40 µl) en

geles de SDS-PAGE.

Aislamiento de lipopolisacáridos (LPS)

El procedimiento empleado es una modificación del método de Westphal y Jann (1965). Al pellet celular resuspendido en agua se le agrega fenol previamente calentado a 75°C en baño de agua (concentración final de fenol: 50%). La mezcla es calentada a 68-70°C con agitación constante. Dicha temperatura es mantenida durante 5 min. La mezcla se coloca en un baño de agua-hielo y se enfría hasta 10°C agitando. La emulsión se centrifuga 15 min. a 12.000 x g a 4°C. La fase acuosa queda en la parte superior y la fenólica en la inferior con una interfase que contiene un precipitado gomoso. La fase acuosa opalescente que contiene el LPS es separada y dejada a 0-4°C. La fase fenólica y el material de interfase se someten a una segunda extracción con un volumen de agua igual al que se utiliza en la primera extracción. El agua es precalentada a 75°C y la mezcla se calienta a 68 - 70°C de la manera anteriormente descrita. Luego de 5 min. a esa temperatura, la emulsión es enfriada y centrifugada. Las capas acuosas de ambas extracciones se juntan y se dializan contra cuatro litros de agua a 4°C durante toda la noche. Luego se centrifuga a 30.000 x g 20 min. Estas preparaciones son sometidas a una corrida electroforética en SDS-PAGE (12.5% de acrilamida).

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se preparan geles de 1,5 mm de espesor conteniendo 15%, 12.5% y 10% de poliacrilamida según Laemmli (1970). Las electroforesis se realizan a pH 8,6 y a voltaje constante.

Los geles para electroforésis de proteínas se fijan con metanol: ácido acético: agua (50:12:38) y se tiñen con plata según la técnica de Blume y colaboradores (1987). Los lipopolisacáridos se fijan con una solución consistente en 25% (v/v) de isopropanol en 7% (v/v) de ácido acético y se visualizan mediante la técnica de tinción con plata de Hitchcock y Brown (1983).

Determinación del ácido 2-ceto-3-deoxioctulosónico (KDO) en lipopolisacáridos

La determinación del ácido 2-ceto-3-deoxioctulosónico, presente en lipopolisacáridos de bacterias gram negativas, se realiza empleando el método de Karkhanis y colaboradores (1978). Brevemente, dicho ensayo consiste en el tratamiento del lipopolisacárido con H_2SO_4 0.2 N, a $100^\circ C$ por 30 min., seguido de una reacción con HIO_4 , $NaAsO_2$ y ácido tiobarbitúrico. El cromóforo rojo formado se estabiliza mediante el agregado de dimetilsulfóxido a la mezcla de

reacción. El color final es estable durante varios días. La lectura se realiza a 548 nm y la concentración de KDO se determina por comparación con una curva estándar de KDO (Sigma Chemical Co., USA).

Extracción y análisis de lípidos en sobrenadantes de cultivo

Los lípidos totales se extraen con cloroformo-metanol (2:1 v\v), según el método de Folch y colaboradores (1957). Alícuotas de los extractos se analizaron por cromatografía en capa fina (TLC) en placas de sílica gel G. Se utiliza una mezcla de éter de petróleo-éter etílico-ácido acético (80:20:1.5 v\v) para separar lípidos neutros; y de cloroformo-metanol-ácido acético-agua (65:25:4:4 v\v) para separar fosfolípidos. Otras alícuotas de extractos de lípidos se saponifican con KOH alcohólico durante 1 hora a 80°C. Los materiales insaponificables se extraen con éter de petróleo en medio alcalino y los ácidos grasos en medio ácido. Ambos se analizan por TLC. Los lípidos separados se identificaron por comparación con standards y mediante reacciones específicas realizadas sobre las placas (Christie, 1973). Para la cuantificación se emplea densitometría previa carbonización sulfocrómica (Blank y col., 1964).

Derivatización y análisis de ácidos grasos

Los ácidos grasos libres se esterifican con metanol-HCl 3 N durante una hora a 64°C. Como ésteres metílicos se analizan por cromatografía gas-líquido (GLC) en una columna SP-2330 sobre chromosorb w. a. w. con temperatura programada.

Ensayo de fluorescencia para la ciclodextrina

El contenido de ciclodextrina en solución se determina de acuerdo a la técnica descrita por Kondo y colaboradores (1976). Este método se basa en la capacidad de la ciclodextrina de incrementar la fluorescencia del colorante 2-p-toluidinilnaftalen-6-sulfato (TNS). A las muestras llevadas a 5 ml con H₂O destilada se les adiciona 0.1 ml de la solución de colorante fresca (10 mg de TNS en 10 ml de metanol). La fluorescencia es medida en un espectrofluorómetro Perkin LS 2000, a una longitud de onda de excitación de 366 nm y de emisión de 460 nm. La concentración de ciclodextrina es determinada por comparación con una curva estándar de dicho agente. El background de fluorescencia es restado a cada una de las muestras ensayadas.

Para analizar la distribución de la ciclodextrina en el medio de cultivo se empleó un sistema de ultrafiltración de bajo pegado proteico de corte 30 kDa. La concentración de ciclodextrina libre se determina en el ultrafiltrado mientras

que el porcentaje asociado a la fracción soluble de peso molecular ≥ 30 kDa, se calculó a partir de la reducción de la concentración de ciclodextrina en el ultrafiltrado en relación a la ciclodextrina control (es decir la correspondiente al medio de cultivo SS+Me β CD sin sembrar).

En tanto que la proporción de ciclodextrina unida a las células se calculó por lectura directa a partir de organismos provenientes del medio SS+Me β CD a los que se restó un blanco correspondiente a células cosechadas del medio SS.

Anisotropía de fluorescencia (medida de la fluidez de membranas)

Las determinaciones de anisotropía de fluorescencia se realizan siguiendo la técnica de Shinitzky y Barenholz (1976) utilizando como marcador el difenilhexatrieno (DPH).

Las mediciones se realizan en un espectrofluorómetro Aminco Bowman, equipado con dos prismas de Nicoll, un analizador y un polarizador. La longitud de onda de excitación fue 360 nm y la emisión se registró a 444 nm.

El fluoróforo en solución de tetrahidrofurano se añade a las suspensiones celulares de *B. pertussis*, las cuales son crecidas en los medios SS y SS+Me β CD y cosechadas en distintos períodos del desarrollo celular. Todas estas suspensiones celulares son llevadas a la misma densidad óptica previo a la realización de las determinaciones.

La concentración final del DPH es de 1 μ M. Las mezclas son incubadas por una hora a 25°C en la oscuridad con el objeto de permitir la completa incorporación del marcador a la membrana.

El parámetro calculado es la anisotropía de fluorescencia (r)

$$r = \frac{I_{//} - I_{\perp} G}{I_{//} + 2I_{\perp} G}$$

donde $I_{//}$ e I_{\perp} son las intensidades de luz emitidas cuando el marcador se encuentra orientado paralelo o perpendicular a la dirección excitadora respectivamente.

$I_{//} + 2I_{\perp}$ es la fluorescencia total y G es un factor de corrección debido a la diferente sensibilidad del fototubo frente a la luz polarizada horizontal o verticalmente; este factor se obtiene con luz polarizada horizontalmente y midiendo la emisión de fluorescencia. En condiciones ideales $G=1$ (G experimental = 0.89).

En todos los casos la temperatura se mantuvo constante. El desvío estándar de estas determinaciones varió entre ± 0.002 y ± 0.004 .

Aislamiento de vesículas de membrana externa (VME)

a) de sobrenadantes de cultivo (Perera y col., 1987): las bacterias crecidas en el medio SS se sedimentan

por centrifugación a 10000 x g a 4°C durante 30 min. El sobrenadante resultante es filtrado a través de una membrana de policarbonato de 0.22 µ de diámetro de poro. Este filtrado es ultracentrifugado a 105000 x g a 4°C durante 2 hs. El sedimento conteniendo las VME crudas es resuspendido en 1 ml del buffer: 0.01 M de fosfato de sodio, 0.15 M NaCl, pH:7.4 (PBS)

b) de células (Poolman y col., 1990): las bacterias crecidas en el medio SS se sedimentan a 10000 x g a 4°C durante 30 min. El pellet celular es resuspendido en 10 mM Tris-HCl pH:8.0 y 2 mM EDTA. Se emplea aproximadamente 10 ml de buffer Tris-EDTA para resuspender las bacterias provenientes de 1500 ml de cultivo de 100 unidades de opacidad. La suspensión celular así obtenida es sonicada en frío durante 10 min. Luego es centrifugada a 10000 x g a 4°C y el sobrenadante es pelleteado a 50000 x g durante 1 h. El sedimento se resuspende en Sarcosyl 1% (p/v) en el buffer 10 mM Tris-HCl. Después de una centrifugación a 10000 x g, las VME se sedimentan a 50000 x g durante 1 h. El pellet es resuspendido en el buffer 10 mM Tris-HCl pH:8. Las muestras así obtenidas se conservan a -20°C.

Las preparaciones a y b son sometidas a una corrida electroforética a voltaje constante y posteriormente son transferidas a una membrana de polivinildifluoruro (PVDF)

Inmunodetección de la Adenilato ciclasa (Western blot)

Las distintas preparaciones, ya sea de VME como de sobrenadantes de cultivo concentrados, luego de ser sometidas a una corrida electroforética en SDS-PAGE se transfieren a membranas de polivinildifluoruro (PVDF) de acuerdo al método de Towbin y colaboradores (1979). La eficiencia de este proceso se comprueba por tinción con plata del gel transferido. Posteriormente, la membrana de PVDF con las proteínas transferidas se bloquea en buffer TBS (10 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, pH:7.0) conteniendo 5% de leche descremada en polvo (Difco). Seguidamente, la membrana se trata con anti-AC monoespecífico (proporcionado por el Instituto Pasteur de Francia), como primer anticuerpo y como segundo anticuerpo, se emplea un conjugado anti-IgG-fosfatasa alcalina. Entre cada uno de estos pasos se realizan lavados en TBS conteniendo 0.5% Tween 20.

El revelado se lleva a cabo con Nitroblue Tetrazolium Chloride (NBT) y 5-Bromo-4-Chloro-3-indolylphosphate p-toluidine (BCIP) en buffer PA (100 mM Tris-HCl, 100 mM, 5 mM MgCl₂ pH: 9.5).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los estudios descriptos anteriormente, fueron sometidos a un análisis de varianza, de acuerdo al método de Stell y Torrie (1980).

Capítulo 3

Cinética de producción de células y del antígeno adenilato ciclasa extracelular

Como se mencionó anteriormente, la adenilato ciclasa de *B. pertussis* ha sido propuesta por varios autores como componente esencial de una nueva vacuna acelular contra la tos convulsa (Guiso y col., 1989; Goodwin y Weiss, 1990). La idea de emplear a AC como determinante de virulencia y antígeno protector es reciente (Weiss y col., 1984; Hanski, 1989; Guiso y col., 1989; Goodwin y Weiss, 1990; Guiso y col., en prensa).

Para avanzar en el conocimiento del rol de AC en la virulencia y sobrevivencia de *B. pertussis* *in vivo*, resulta necesario efectuar más y nuevos estudios. Para la realización de los mismos, e incluso desde el punto de vista de la inclusión de AC en una nueva vacuna acelular, se requiere disponer de cantidades importantes de este antígeno en los medios líquidos de cultivo. Como fuente de obtención de AC se emplean los sobrenadantes del cultivo de *B. pertussis* en fase virulenta.

Teniendo en cuenta esta premisa, en este trabajo se estudió, a escala de erlenmeyer, la cinética de producción y estabilidad de AC en el medio base de Stainer-Scholte (SS) (1971), el cual fue recomendado para la producción de vacunas celulares de baja reactogenicidad. Este medio químicamente

definido, libre de materiales complejos como agar o almidón, soporta el crecimiento seriado de *B. pertussis*, siempre y cuando el cultivo se inicie a partir de un inóculo de tamaño considerable. Contiene solamente sales, aminoácidos, vitaminas, glutatión reducido y buffer Tris-HCl (la composición del medio SS está detallada en la sección Materiales y Métodos).

En la figura 3 se muestra una curva típica del crecimiento de *B. pertussis* en el medio líquido SS a 36°C con agitación rotatoria de 160 rpm y con una relación volúmen del erlenmeyer: volúmen de medio de cultivo de 4: 1. En dicha figura se observa que la fase logarítmica se extiende hasta aproximadamente las 18-20 hs del cultivo, con una fase lag de 5.70 hs. La velocidad específica de crecimiento resultó ser de 0.135 hs^{-1} , en tanto que el tiempo de generación fue de aproximadamente 5 hs.

Durante el cultivo se extrajeron muestras a distintas horas, y en cada sobrenadante obtenido se dosó la actividad biológica de AC y la actividad hemaglutinante de FHA (esta última para corroborar datos de trabajos previos de otros laboratorios; Arai y Munoz, 1979; Suzuki y col., 1985) (Figura 3). Los dos antígenos presentaron un máximo de actividad biológica durante la fase de desaceleración del desarrollo celular, con una posterior caída en la fase estacionaria (Hozbor y col., 1991). Esta marcada pérdida de actividad indicaría en principio, que el tiempo óptimo de cosecha para la obtención de estos importantes inmunógenos es

durante la fase de desaceleración del crecimiento celular.

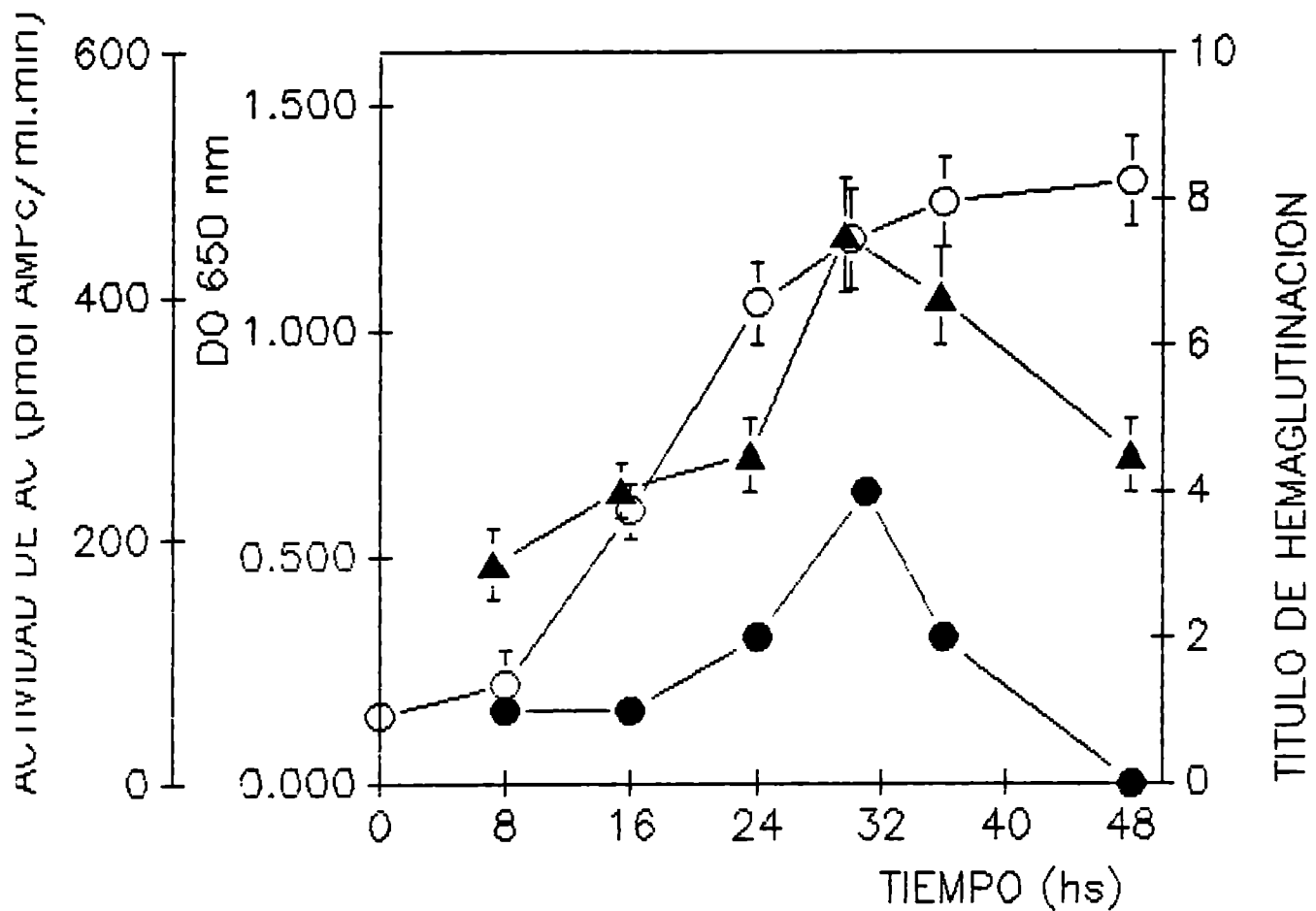


FIGURA 3: Cinética de producción de células y antígenos solubles de *B. pertussis* en el medio SS. Crecimiento celular (○); actividad de AC (▲); y actividad hemaglutinante de FHA (●). Los resultados mostrados corresponden a la media de cuatro experiencias.

Con el objeto de estabilizar e incluso incrementar el rendimiento de AC extracelular, se estudiaron las posibles

causas de la caída de actividad observada. A este respecto, se evaluó en primer lugar, la hipótesis de que la misma pudiese ser consecuencia de cierta actividad proteolítica presente en los sobrenadantes de cultivo. Se ensayó entonces, la actividad proteolítica en sobrenadantes correspondientes a diferentes horas del desarrollo celular. Se emplearon diferentes sustratos: caseína, sero albúmina bovina, e IgG purificada; y diferentes técnicas de revelado: fluorescencia, absorción a 275nm o bien a 660nm empleando en este último caso como reactivo el de Folin-Ciocalteu. En todos los casos ensayados los resultados obtenidos fueron negativos, lo cual indica que la pérdida de actividad de AC observada anteriormente se debe a otro fenómeno.

Una explicación alternativa consistió en considerar un posible cambio en las características de la población bacteriana, desde una variante virulenta a una avirulenta durante el cultivo (Brownlie y col., 1985; Knapp y Mekalanos, 1988). La prevalencia progresiva de la variante avirulenta explicaría los bajos niveles de actividad observados a medida que se alcanza la fase estacionaria del desarrollo celular. Dicha variante que no produce AC extracelular y que presenta diferencias con la variante virulenta, tales como mayor velocidad específica de crecimiento, mayor rendimiento celular (ambos en el medio SS), distinta sensibilidad a inhibidores de crecimiento, resistencia a antibióticos y producción de antígenos, podría secretar sustancias al medio de cultivo que reduzcan la actividad de la AC presente.

B. pertussis puede sufrir dos tipos de variaciones: **"cambio de fase"** y **"modulación fenotípica"** (fenómenos que fueron descritos en la Introducción). Brevemente, **el cambio de fase** involucra la pérdida simultánea de la expresión de los factores de virulencia (toxina pertussis, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclasa, hemolisina, toxina dermonecrótica y aglutinógenos), la pérdida del citocromo d629 y cambios en el perfil proteico de las cubiertas celulares (Weiss y Falkow, 1984).

El segundo tipo de variación, **la modulación fenotípica**, consiste en la pérdida reversible de la capacidad del microorganismo de producir los determinantes de virulencia, en respuesta a ciertos estímulos químicos y físicos. Las células fenotípicamente moduladas se asemejan a las de fase avirulenta (Melton y Weiss, 1989).

Se ha observado que la variación espontánea de fase ocurre con una frecuencia de 10^{-6} a 10^{-7} por bacteria y por generación (Goldman y col., 1984), por lo tanto, en las cuatro a seis generaciones que ocurren durante el cultivo no se puede esperar que este sea el mecanismo responsable de la pérdida de actividad observada. Para estudiar entonces si **la modulación fenotípica** tiene lugar durante el desarrollo celular, se analizaron los perfiles polipeptídicos de membrana externa de la población a distintos estadios del crecimiento con el fin de observar si se modificaban los caracteres asociados a la fase virulenta. Como control se emplearon células moduladas avirulentas obtenidas a través de

pasajes sucesivos de la cepa virulenta en el medio agar Bordet-Gengou-sangre suplementado con $MgSO_4$ 0.02 M (Robinson y col., 1983). En las corridas electroforéticas realizadas en SDS-PAGE (Figura 4), no se observaron diferencias entre los perfiles polipeptídicos correspondientes a células cosechadas en distintos estadios del crecimiento en el medio SS. Además, estos perfiles presentaron ciertas proteínas de cubierta en las regiones de peso molecular de 30 y 67 a 200 kDa, descritos como marcadores de fase virulenta (Redhead, 1983), los cuales están ausentes en las células avirulentas.

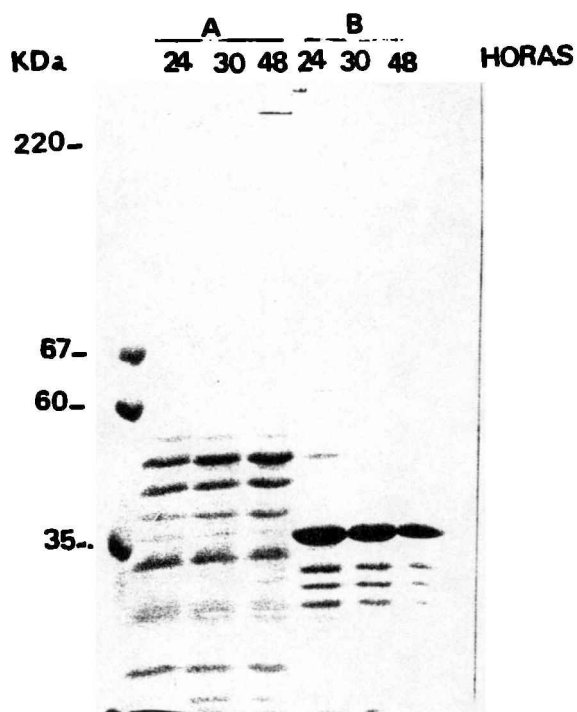


FIGURA 4: SDS-PAGE (12.5 %) de polipéptidos de membrana externa de *B. pertussis* fase virulenta y su derivada modulada. Las células fueron cosechadas del medio SS a diferentes tiempos de incubación. Líneas A - variante avirulenta; líneas B - variante virulenta. Los pesos moleculares en kDa son indicados en la figura.

Se analizaron además otras características que permiten diferenciar categóricamente una variante de otra, entre ellas: morfología de las células (la variante avirulenta se presenta más bacilar que la avirulenta, al microscopio óptico), presencia de halo de hemólisis en las placas de agar Bordet-Gengou-sangre (la variante avirulenta es hemolisina⁻) y resistencia a antibióticos (sólo la variante avirulenta es resistente a la eritromicina en una concentración de 25 µg por ml de medio de cultivo) (Lacey, 1960; Schneider y Parker, 1982; Robinson y col., 1986).

Todos estos ensayos, que se realizaron comparativamente empleando la variante avirulenta como control, permitieron descartar al fenómeno de modulación como causal de la pérdida de actividad biológica.

Efecto de la (2,6-O-dimetil)- β -ciclodextrina en la actividad de adenilato ciclasa

En 1983 se describieron en Japón los efectos de un producto derivado de las ciclodextrinas: 2,6-O-dimetil- β -ciclodextrina (Me β CD), que incorporado a los medios de cultivo sólidos permitía incrementar el desarrollo celular de *B. pertussis* en fase virulenta, a partir de inóculos pequeños (Imaizumi y col., 1983_a). Estos resultados estimularon la realización de nuevos estudios sobre el crecimiento de *B. pertussis* en medios de cultivo líquidos, en relación a la producción de vacunas. Imaizumi y colaboradores (1983_b) observaron que efectivamente, la adición de ciclodextrina (1 g/l) a los medios líquidos provoca un incremento en el rendimiento celular, y lo que es más llamativo, en los niveles de la toxina pertussis (PT) extracelular, los cuales se mantienen constante aún en la fase estacionaria del crecimiento. Posteriormente, se observó un efecto similar de la Me β CD sobre otro importante inmunógeno de *B. pertussis*, la hemaglutinina filamentosa (FHA) (Suzuki y col., 1985). En ambos casos el incremento de actividad observado es dependiente de la concentración de ciclodextrina empleada.

En relación al mecanismo de acción de la ciclodextrina son varias las hipótesis que se manejan desde entonces, y entre otras se pueden citar las siguientes: a) la

ciclodextrina puede actuar absorbiendo inhibidores del crecimiento celular derivados del medio de cultivo o del metabolismo de *B. pertussis*, o de ambos, de esta forma se alcanzaría el máximo crecimiento celular y consecuentemente se incrementaría la producción de PT y FHA. Esta posibilidad está avalada en parte por los ensayos realizados por Imaizumi y colaboradores (1983_a) en medios sólidos de cultivo. Estos autores observaron que ciertos ácidos grasos inhiben el crecimiento de *B. pertussis* y que la incorporación de ciclodextrina al medio de cultivo revierte dicho efecto inhibitorio. Además, estos autores constataron la presencia de ácidos grasos en el interior de la molécula de ciclodextrina (Imaizumi y col., 1983_b). Sin embargo se requiere (los mismos autores lo sugieren) de más estudios para confirmar esta hipótesis; y b) la ciclodextrina podría actuar como estabilizante de las proteínas PT y FHA.

Estas y otras posibilidades se encuentran hoy bajo estudio y por lo tanto el mecanismo de acción aún debe ser aclarado. Al presente no se han reportado trabajos en relación al efecto de dicho agente sobre el otro importante inmunógeno de *B. pertussis*, la adenilato ciclasa.

Para avanzar en estos aspectos se realizaron una serie de experiencias en nuestro laboratorio con el medio de Stainer-Scholte (SS) sin y con el agregado de ciclodextrina (SS+Me β CD).

En esta primera etapa se adicionó Me β CD a una concentración final de 1 g/l, de acuerdo a Imaizumi y

colaboradores (1983_b). En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos.

En relación a la cinética de crecimiento, cuando se comparan los datos obtenidos en el medio SS con los correspondientes al medio SS+Me β CD, se observa que en este último caso el desarrollo celular se incrementa (21 %) y la duración de la fase lag se reduce. Sin embargo, la velocidad específica de crecimiento es prácticamente la misma para los dos medios de cultivos (Tabla 4) (Hozbor y col., 1991). Estos resultados apoyarían la hipótesis (a) referida a la existencia de sustancias inhibidoras del crecimiento celular, las cuales serían secuestradas por la ciclodextrina presente en el medio de cultivo (aspecto que se analizará en las siguientes secciones).

TABLA 4: Parámetros de crecimiento y niveles de actividad biológica de AC extracelular de *B. pertussis* en medios de cultivo líquidos.

Medios de cultivo	μ^a (h ⁻¹)	t_{lag}^b (h)	DO _{650nm} ^c .	Proteína ^d mg/ml	ACmáx ^e pmolAMPc/min. mg prot.total
SS	0.135	5.7	1.28	0.100	4300
SS+Me β CD	0.135	3.4	1.40	0.119	6866

^a μ : velocidad específica de crecimiento.

^b t_{lag} : duración en horas de la fase lag del crecimiento.

^c DO_{650nm}: densidad óptica a 650 nm correspondiente a las 30 hs de cultivo (fase de desaceleración)

d corresponden a los niveles de proteínas hallados en los sobrenadantes de cultivo en donde la actividad de AC es máxima (30 hs de cultivo, fase de desaceleración).

• $AC_{m\acute{a}x}$: actividad de la adenilato ciclasa extracelular máxima (fase de desaceleración).

Los datos presentados en esta tabla son las medias de cuatro experiencias.

En estas experiencias se observó que la adición de $Me\beta CD$ (1 g/l) produce (en relación al medio SS) un incremento significativo de 1,9 veces en la actividad volumétrica de AC extracelular (Figura 5) y de 1,6 veces en la actividad específica de AC (Tabla 4). Se observó, además, un incremento por unidad de biomasa del 10% de las proteínas extracelulares, con lo cual parece favorecerse la liberación de proteínas al medio extracelular.

El máximo de actividad de AC en el medio $SS+Me\beta CD$ se produce también en la fase de desaceleración del desarrollo celular (aproximadamente a las 30 h de cultivo), pero la caída detectada durante la fase estacionaria (a las 48 hs) es de sólo el 20%, en tanto que en el medio SS la caída de actividad es de 37% respecto del máximo (Figura 5).

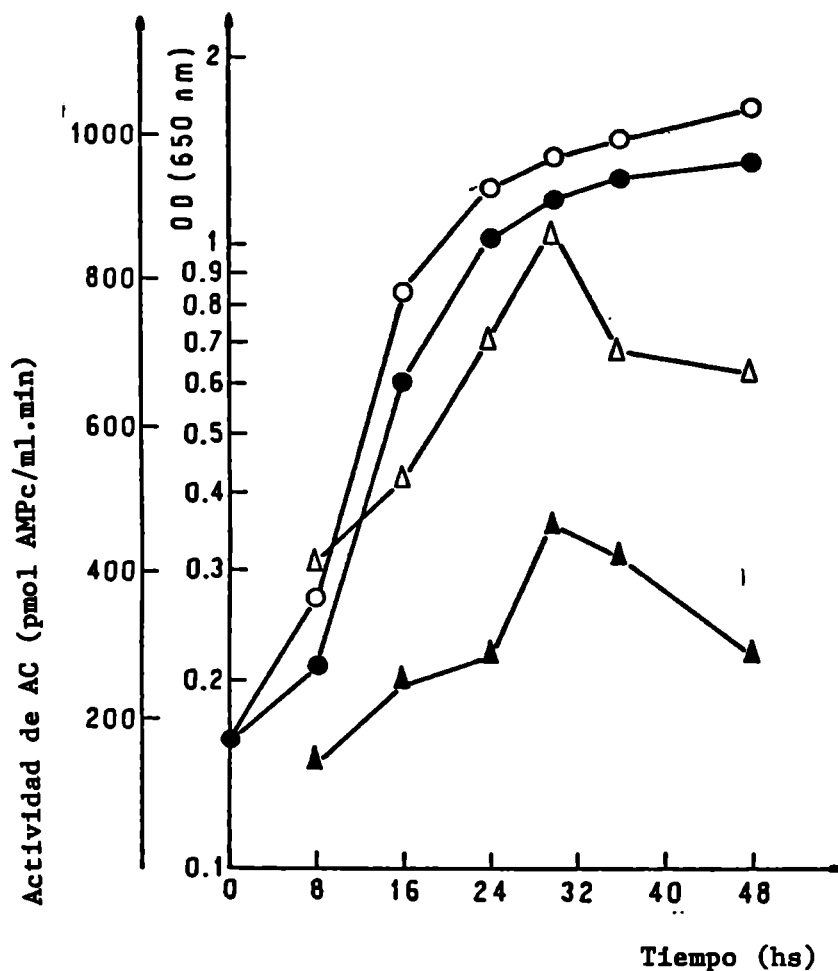


FIGURA 5: Efecto de la incorporación de Me β CD (1 g/l) al medio Stainer-Scholte sobre el crecimiento celular y la actividad de AC extracelular de *B. pertussis*. Crecimiento celular (●) y actividad de AC (▲) en el medio SS libre de Me β CD; crecimiento celular (○) y actividad de AC (Δ) en el medio SS+Me β CD. Los resultados presentados corresponden a las medias de cuatro experiencias.

En un experimento donde se utilizaron diferentes concentraciones de ciclodextrina, se observó que su efecto estimulador sobre la actividad de AC fue mayor y más

estable (no se observó pérdida de actividad en la fase estacionaria de cultivo) cuando se utilizaron 3 g de Me β CD por litro de medio de cultivo que cuando se utilizó 1 g/l (figura 6).

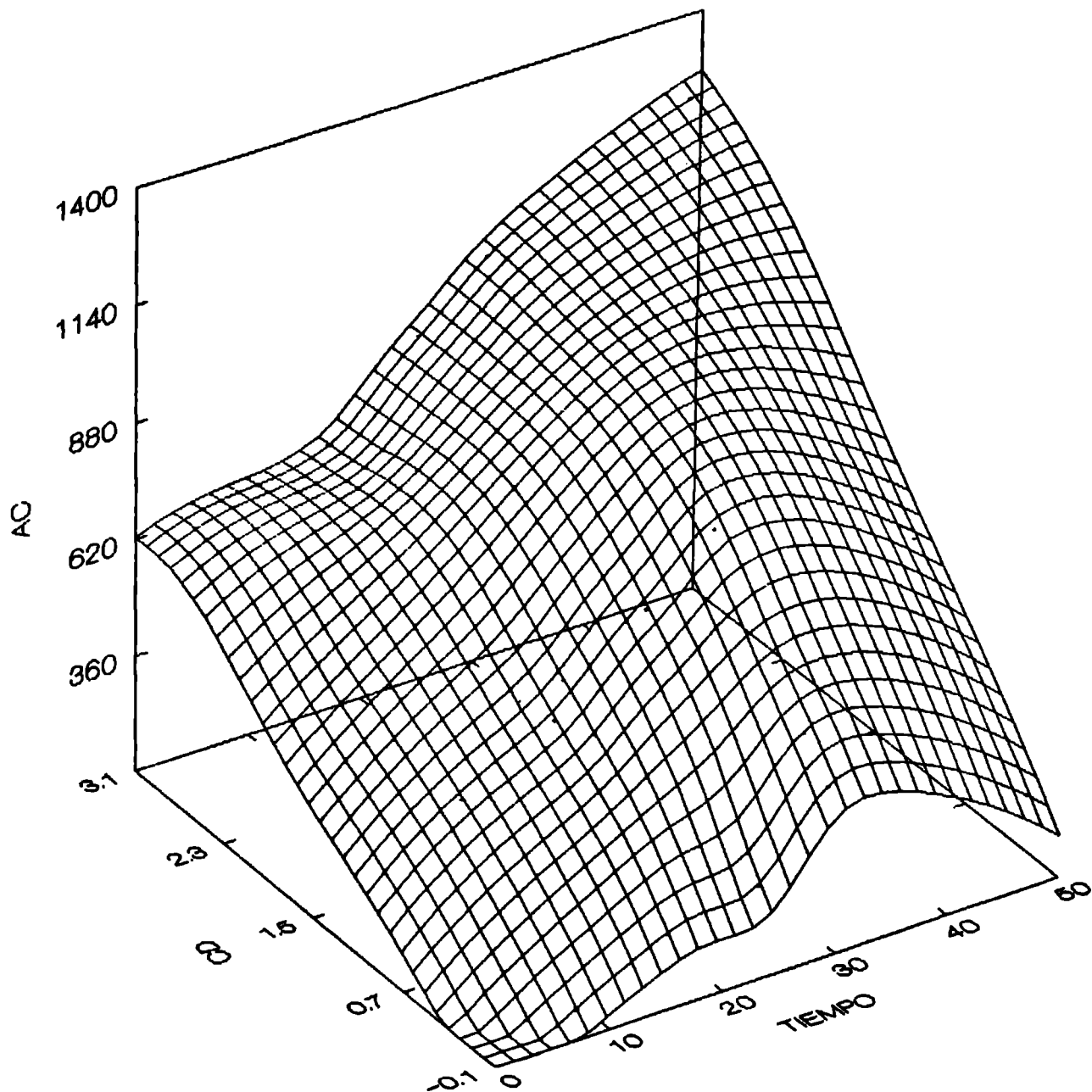


FIGURA 6: Efecto de la adición de diferentes concentraciones de Me β CD (0, 1 y 3 g/l) al medio Stainer-Scholte sobre la actividad de la adenilato ciclasa extracelular de *B. pertussis*.

Teniendo en cuenta este efecto de la ciclodextrina sobre AC y recordando su acción sobre PT y FHA (Imaizumi y col., 1983_b; Suzuki y col., 1985), es posible suponer que el conocimiento del mecanismo de acción de este agente permita conocer las causas de la pérdida de actividad observada en el medio SS.

En este sentido, se analizó primeramente el efecto de la ciclodextrina sobre la actividad de AC extracelular, para lo cual se trabajó con sobrenadantes de cultivo del medio SS libres de células (de acuerdo a observaciones realizadas al microscopio óptico) provenientes de distintos períodos del desarrollo celular: fase de desaceleración (período donde se obtiene el máximo de actividad de AC) y fase estacionaria (período donde se observa la caída de actividad). A cada uno de estos sobrenadantes se les adicionó Me β CD llevando la concentración final de ésta a 1, 3 y 5 g/l, manteniéndose como control un sobrenadante sin agregado de Me β CD (Tabla 5). Las mezclas se incubaron durante seis horas con agitación constante y a 36°C. La actividad de AC se evaluó tanto en el inicio como al final de la incubación.

TABLA 5: Efecto de la Me β CD sobre la actividad de la adenilato ciclasa de *B. pertussis* en sobrenadantes de fase de desaceleración y estacionaria.

CICLODEXTRINA (g/l)	ACTIVIDAD DE AC EXTRACELULAR* EN			
	SOBRENADANTE DE FASE DE DESACELARACION		SOBRENADANTE DE FASE ESTACIONARIA	
	TIEMPO DE INCUBACION (hs)			
	0	6	0	6
0	424(1.00)	430(1.01)	181(1.00)	105(0.58)
1.00	570(1.34)	595(1.40)	309(1.71)	260(1.43)
3.00	595(1.40)	590(1.40)	348(1.92)	292(1.63)
5.00	530(1.25)	546(1.27)	277(1.53)	270(1.49)

* Actividad de AC extracelular: pmol AMPc/min. ml de sobrenadante de cultivo.

Todos los resultados mostrados en la tabla 5 corresponden a promedios de cuatro experiencias. Los números entre paréntesis representan actividades relativas.

La tabla 5 muestra que la actividad de AC en el sobrenadante libre de ciclodextrina, sólo decayó durante la incubación cuando el mismo provenía de la fase estacionaria del desarrollo celular. En sobrenadantes provenientes de cultivos en fase de desaceleración, la actividad de AC permaneció constante durante las seis horas de incubación.

La incorporación de Me β CD a ambos sobrenadantes provocó un incremento de la actividad de AC, en las distintas concentraciones analizadas siendo más efectivo a 3 g/l. En el sobrenadante de fase de desaceleración este incremento fue inmediato y persistió durante las seis horas de incubación, mientras que en el de fase estacionaria se

observó una pequeña caída durante las incubaciones realizadas con 1 y 3 g/l de ciclodextrina, pero no con 5 g/l de Me β CD. El efecto de la ciclodextrina sobre la actividad de AC fue más pronunciado en el caso de los sobrenadantes de fase estacionaria, como lo indican los incrementos relativos especificados en la Tabla 5.

Tanto en el sobrenadante correspondiente a la fase de desaceleración como en el de fase estacionaria del crecimiento, la adición de Me β CD a una concentración final de 5 g/l provocó un incremento en la actividad de AC menor que los obtenidos con 1 y 3 g/l de Me β CD (Hozbor y col., 1991). Estos resultados podrían explicarse de diferentes maneras, entre otras 1) la actividad de la adenilato ciclasa se estimularía por acción directa de la ciclodextrina sobre AC. Consecuentemente, esta estimulación dependería de las posibles distintas formas moleculares en que se encuentra la AC en los sobrenadantes de cultivo ensayados y de la concentración de ciclodextrina empleada; 2) en los sobrenadantes de cultivo podrían estar presentes sustancias que inhiban la actividad de AC. La concentración de las mismas dependería del desarrollo celular. En este caso la ciclodextrina ejercería una acción complejante de los inhibidores (como se ha postulado en varios trabajos) incrementando así la actividad de AC. El efecto final observado dependerá de la relación entre las concentraciones de AC-inhibidor-ciclodextrina.

Con el fin de avanzar en el conocimiento de la

acción de la ciclodextrina sobre la actividad de AC, se incubaron mezclas de sobrenadantes de cultivo del medio SS, provenientes de la fase de desaceleración y de la fase estacionaria del desarrollo celular, con y sin la adición de ciclodextrina (Tabla 6). Se dosó la actividad de AC extracelular en cada una de las mezclas y en cada sobrenadante individual, al inicio y después de las seis horas de incubación. En la Tabla 6 se observa que el agregado de sobrenadante de fase estacionaria al de fase de desaceleración en una relación 1 1, provocó una reducción en el valor de la actividad de AC, el cual fue inferior al esperado como consecuencia de la dilución realizada al mezclar los sobrenadantes. Esa reducción de la actividad de AC fue totalmente revertida mediante la incorporación de Me β CD a la mezcla de incubación.

TABLA 6: Actividad biológica de la adenilato ciclasa de *B. pertussis* en sobrenadantes de cultivo.

FASE DE CRECIMIENTO CELULAR EN EL MEDIO STAINER-SCHOLTE	ACTIVIDAD DE AC* EXTRACELULAR	
	TIEMPO DE INCUBACION	
	0 hs	6 hs
Desaceleración	420	430
Estacionaria	181	105
Desaceleración+Estacionaria (1 1)	210	180
Desaceleración+Estacionaria (1:1) + ciclodextrina (1g/1)	487	495

* Actividad de AC extracelular: pmol AMPC/min. ml de sobrenadante de cultivo.

Estos datos sugieren que el sobrenadante de fase estacionaria contiene sustancias que afectan la actividad de AC, de forma tal que al adicionar este sobrenadante a uno proveniente de fase de desaceleración provoca una disminución de la actividad de total de AC. Este efecto se revierte mediante el agregado de ciclodextrina a la mezcla de incubación. Así, la ciclodextrina ejercería su acción adsorbiendo esas sustancias (Brewster y col., 1989), incrementando de esta manera la actividad biológica de AC. La actividad final observada dependería de la relación antígeno-interferente-ciclodextrina.

Sobre la base de esta hipótesis y con el fin de analizar si la ciclodextrina está actuando en este caso como complejante, se decidió estudiar los espectros de resonancia magnética nuclear de la ciclodextrina extraída de sobrenadantes de cultivo. Para la extracción se empleó una solución de tricloroetileno en una concentración final de 10% (v/v). Se analizaron:

a) sobrenadantes de fase estacionaria del medio SS+Me β CD (Figura 7), ya que sería en este sobrenadante donde supuestamente se encuentran presentes una mayor cantidad de sustancias interferentes de la actividad de AC. Dichos espectros se los compararon con los obtenidos de las siguientes muestras:

b) ciclodextrina disuelta en tricloroetileno (Figura 8).

- c) ciclodextrina extraída del medio de cultivo sin sembrar y sin incubar (Figura 9).
- d) medio de cultivo sin sembrar y sin incubar (Figura 10)
- e) sobrenadante de un cultivo en fase estacionaria en el medio SS (Figura 11).

Tanto d) como e) no contienen ciclodextrina y son extraídos con la solución de tricloroetileno.

De la comparación de los espectros surge que: 1) el tricloroetileno extrae sustancias del medio de cultivo libre de ciclodextrina que aparecen tanto en el medio sin sembrar como en el sembrado (d y e), 2) los espectros correspondientes a los medios sembrados (sobrenadante) y sin sembrar, extraídos con tricloroetileno (d y e) son superponibles, 3) uno de los picos que aparece en los dos espectros mencionados anteriormente coincide con uno que aparece en el espectro correspondiente a la ciclodextrina extraída del medio sin sembrar. En este último se observan además los picos del medio de cultivo y los propios de la ciclodextrina. Pero en la zona de menor desplazamiento químico, los picos correspondientes al medio de cultivo sin sembrar y a la ciclodextrina en la solución de tricloroetileno fueron reemplazados por un pico más ancho. Esta modificación podría indicar una actividad complejante de la ciclodextrina sobre sustancias presentes en el medio de

cultivo sin sembrar. Si estas sustancias tienen actividad inhibitoria, la mencionada actividad complejante podría ser responsable del incremento del desarrollo celular y de la reducción de la fase lag observada en el medio suplementado con ciclodextrina.

En el análisis de los datos obtenidos por RMN, se puede observar en el espectro correspondiente a la ciclodextrina extraída del medio de cultivo sembrado, un pico en la zona de menor desplazamiento químico desplazado respecto al observado tanto en el caso del medio de cultivo como en el de la ciclodextrina pura.

Estos resultados indican que, en efecto, la ciclodextrina secuestra sustancias del medio de cultivo. El nivel de dichas sustancias depende del período del desarrollo celular, como lo indica la altura de los picos de la muestra (a) en relación a la (c).

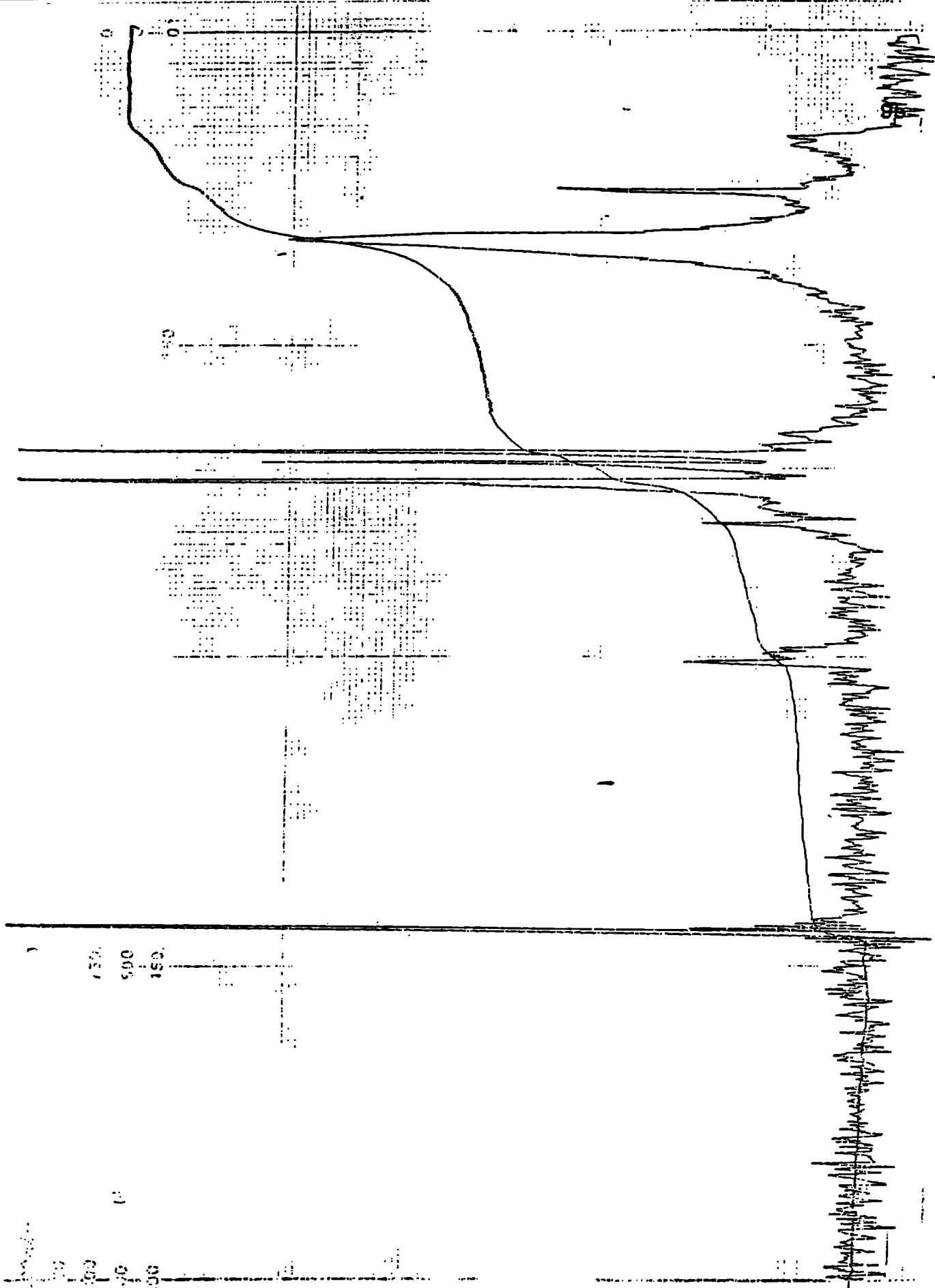


Figura 7 : Espectro de resonancia magnética nuclear correspondiente a sobrenadante de fase estacionaria del medio SS suplementado con Ciclodextrina.

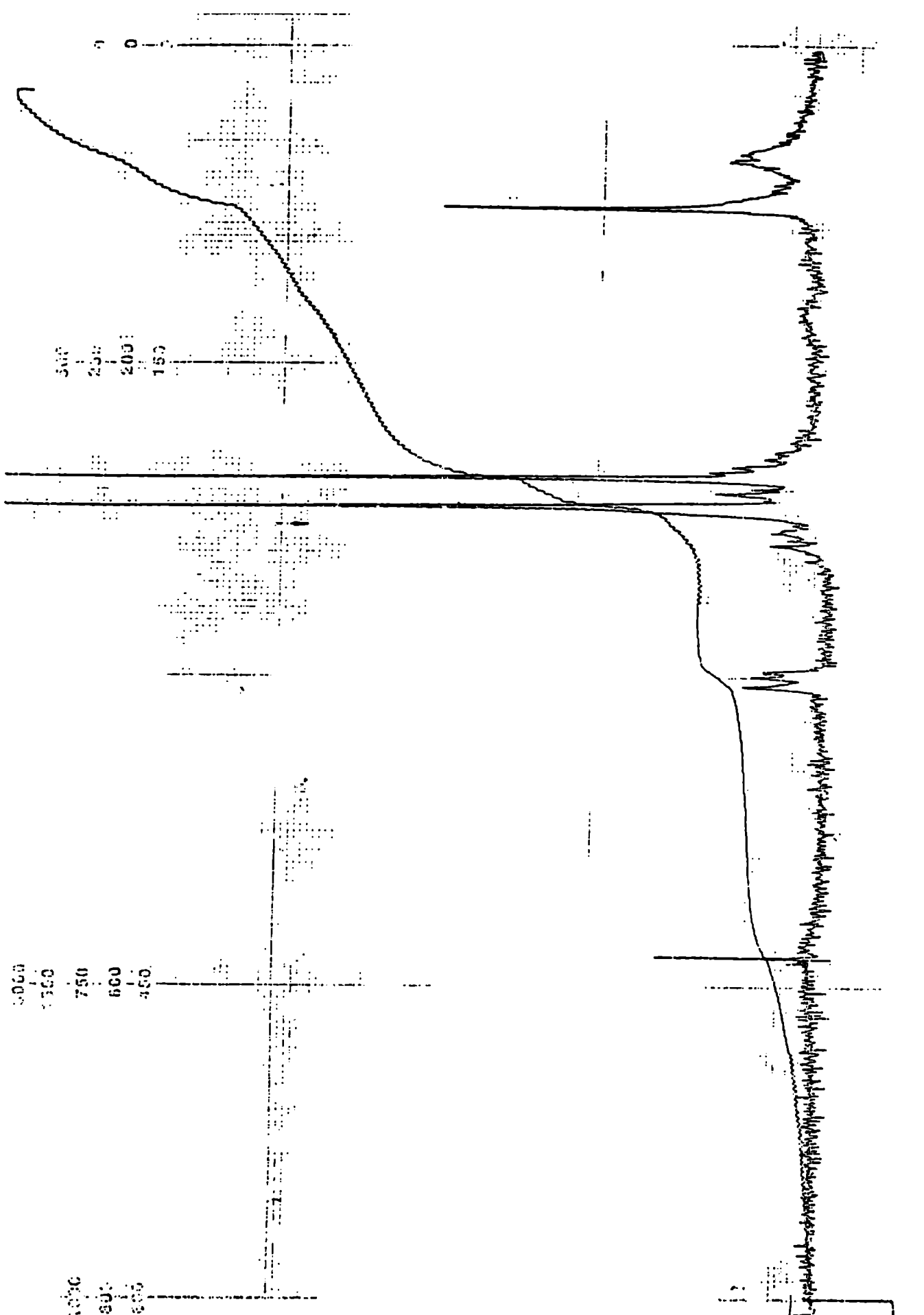


Figura 8: Espectro de resonancia magnético nuclear de la Ciclodextrina disuelta en Tricloroetileno.

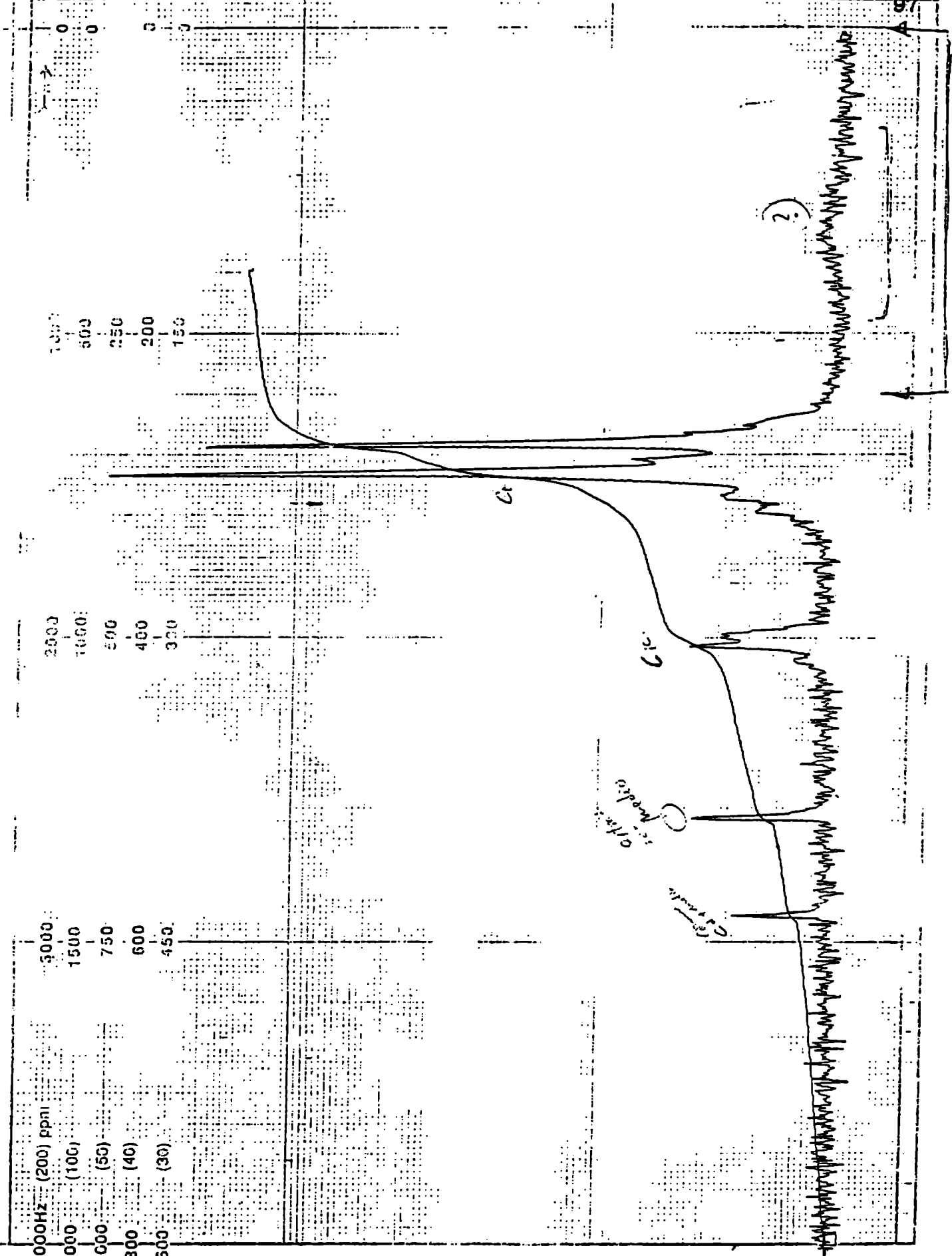


Figura 9: Espectro de resonancia magnética nuclear de la Ciclodextrina extraída del medio de cultivo sin sembrar y sin incubar.

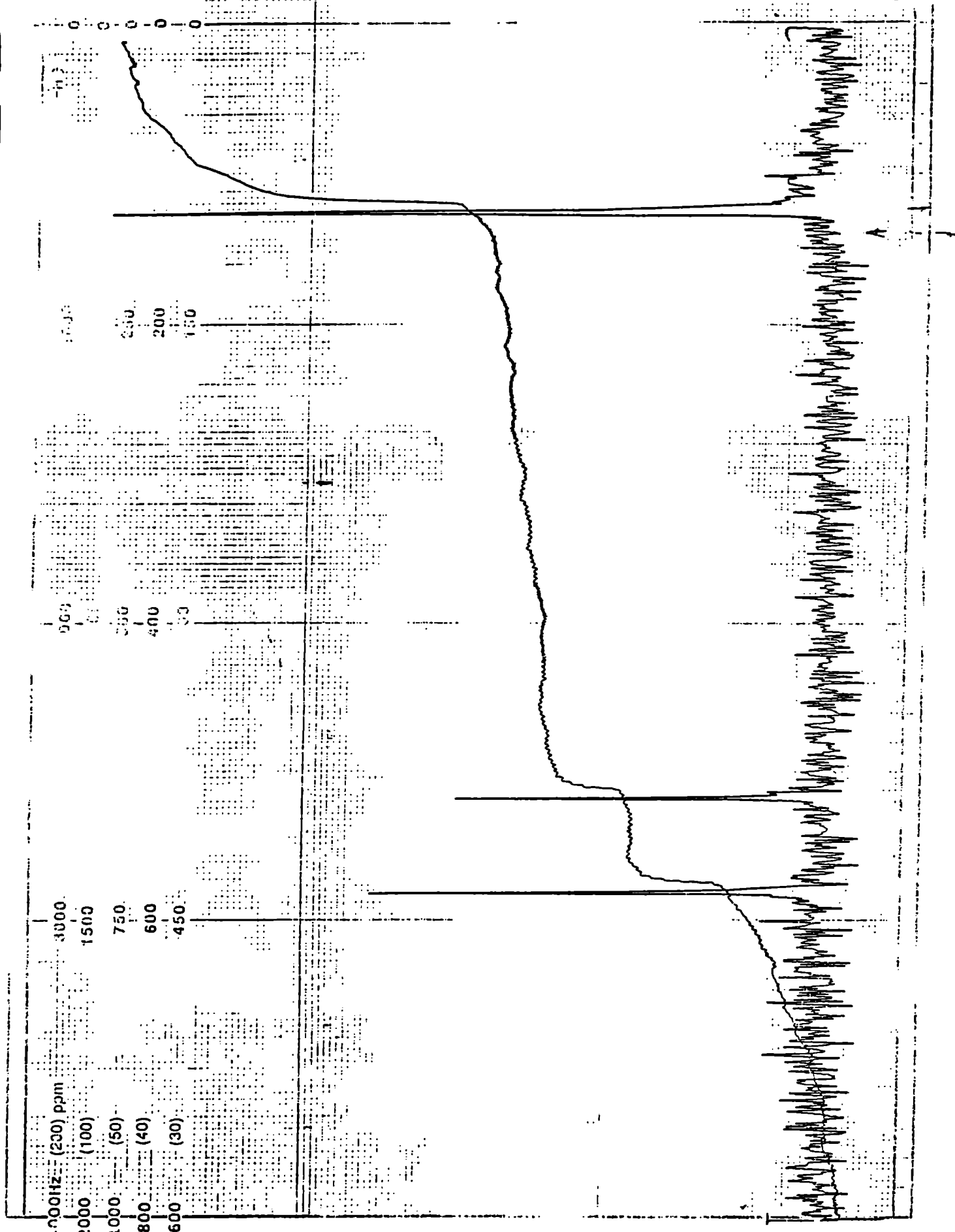


Figura 10 : Espectro de resonancia magnético nuclear del medio de cultivo sin sembrar y sin incubar.

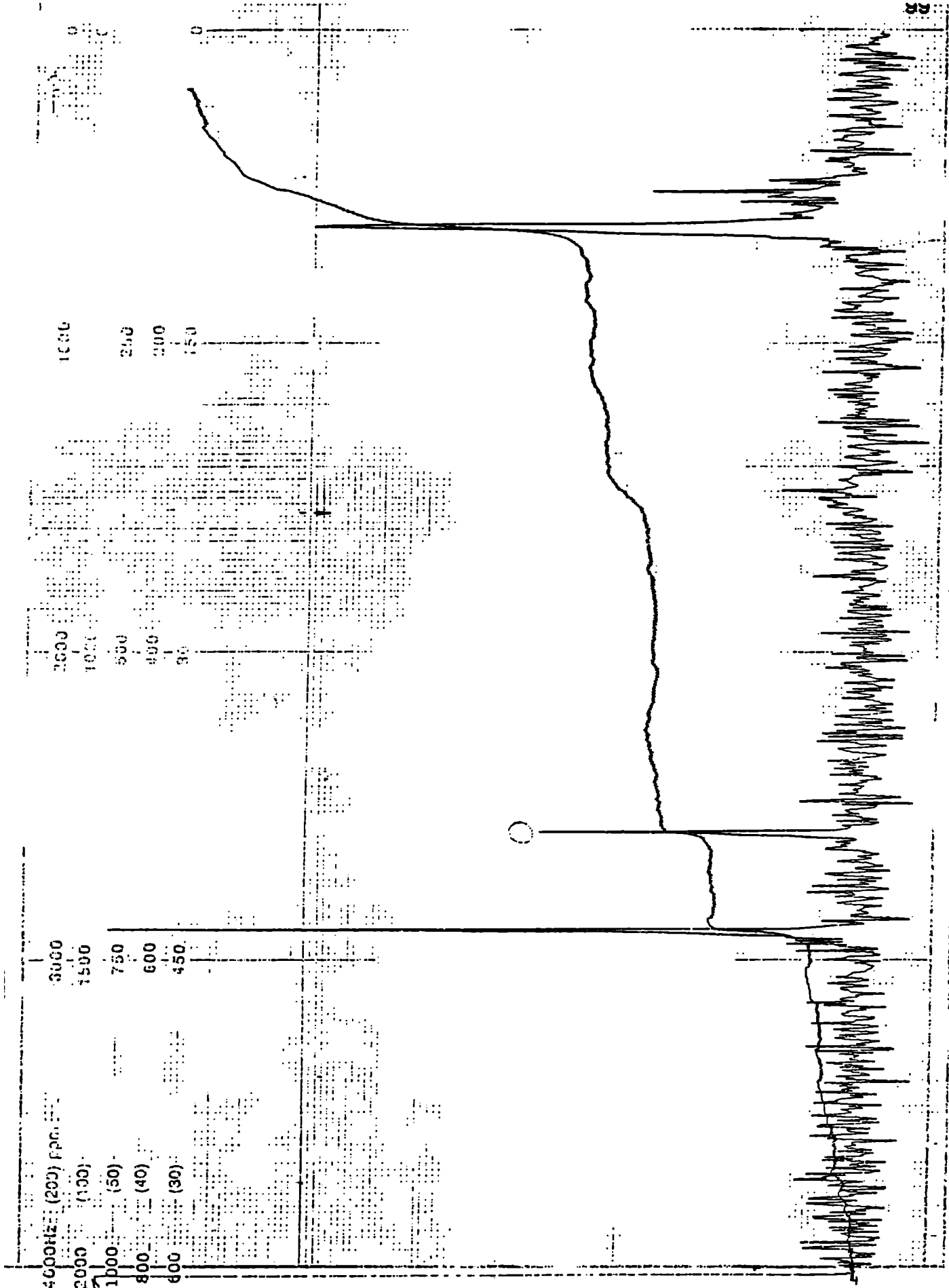


Figura 11. Espectro de resonancia magnética nuclear de sobrenadante de cultivo en fase estacionaria del medio SS.

Acción de ácidos grasos sobre la actividad de adenilato ciclasa

La ciclodextrina es capaz de complejar determinadas sustancias, acción que se vió manifestada en la sección anterior a través de los espectros de resonancia magnético nuclear. Se ha reportado que dicho agente forma complejos de inclusión con residuos hidrofóbicos tales como ácidos grasos (Imaizumi y col., 1983_b). También se ha establecido que la adenilato ciclasa posee importantes dominios hidrofóbicos (Glasser y col., 1991). Según el modelo propuesto en la sección anterior, sustancias de naturaleza hidrofóbica podrían interaccionar con los dominios hidrofóbicos de AC afectando su actividad. Este efecto sería revertido mediante la supuesta acción secuestrante de la ciclodextrina.

En base a esta hipótesis se decidió analizar el efecto de la adición de ácidos grasos sobre la actividad de AC extracelular con y sin el agregado de ciclodextrina. Los ácidos grasos empleados se seleccionaron de acuerdo a la composición de la endotoxina de *B. pertussis* (LPS) la cual está presente en el medio de cultivo (Starkloff y Szabó, 1986; Perera y col., 1987).

Se realizaron incubaciones de sobrenadantes de cultivo correspondientes a la fase de desaceleración del desarrollo

celular con ácidos grasos, en ausencia y en presencia de ciclodextrina. Las mismas se realizaron a 36°C con agitación constante. Los resultados de la Tabla 7. muestran que efectivamente los ácidos grasos palmítico y oleico inhiben la actividad biológica de AC en diferente grado y la ciclodextrina revierte dicho efecto también en diferente grado de acuerdo al ácido graso empleado (Hozbor y col., 1991).

TABLA 7: Efecto de la adición de ácidos grasos y Me β CD sobre la actividad de la AC extracelular de *B. pertussis* de sobrenadantes de cultivo de fase de desaceleración.

COMPONENTE(S) AGREGADO(S)	ACTIVIDAD RELATIVA DE AC EXTRACELULAR (%)	
	TIEMPO DE INCUBACION (hs)	
	0	6
ninguno	100	100
ác. palmítico (80 μ g/ml)	27	0
ác. oleico (50 μ g/ml)	78	25
ciclodextrina (1g/l)	134	140
ác. palmítico (80 μ g/ml) + ciclodextrina (1g/l)	100	120
ác. oleico (50 μ g/ml) + ciclodextrina (1g/l)	100	125

Los ácidos grasos y la ciclodextrina se agregaron al sobrenadante de cultivo del medio Stainer-Scholte al inicio de la incubación, la cual se realiza a 36°C con agitación constante. El 100 % de la actividad de AC corresponde a 420 pmol AMPc/min. ml de sobrenadante. Todos los resultados presentados son el promedio de cuatro experiencias.

Seguidamente, y con el objeto de establecer si dicha inhibición podría tener lugar durante el desarrollo celular de *B. pertussis*, se analizó el contenido y la composición de lípidos en sobrenadantes de cultivo de los medios SS y SS+Me β CD. Los sobrenadantes ensayados provenían de distintos estadios del desarrollo celular.

En el medio de cultivo libre de ciclodextrina (SS) se halló un pequeño contenido de lípidos, el cual prácticamente no aumenta con el desarrollo celular. Contrariamente a lo esperado, dicho nivel (por unidad de biomasa) fue en todos los tiempos analizados inferior al obtenido en el medio suplementado con ciclodextrina (Tabla 8), resultado que hace pensar que la ciclodextrina contribuye a la liberación de lípidos por parte de las bacterias durante el desarrollo celular.

TABLA 8: Contenido lipídico en sobrenadantes de cultivos de *B. pertussis* en los medios SS y SS+Me β CD

SOBRENADANTES DE MEDIO DE CULTIVO	LIPIDOS TOTALES $\mu\text{g/ml}$	
	TIEMPO DEL DESARROLLO CELULAR 15 hs	48 hs
SS	61,0	68,0
SS+Me β CD	512,0	529,2

Los resultados presentados en esta tabla son los que resultan de sustraer los blancos de medio de cultivo.

Sumado al alto contenido lípidico hallado en los sobrenadantes de bacterias cultivadas en el medio SS+Me β CD en relación al medio SS, la determinación de la composición de ácidos grasos en dichos sobrenadantes, por cromatografía gas-líquido, reveló la presencia de los ácidos grasos 16:0, 16:1, 18:0 y 18:1 en elevada proporción. De éstos, el 16:0 y el 18:0, como se demostró anteriormente (Tabla 7) son inhibidores de la actividad catalítica de AC *in vitro*.

Estos resultados son bastante llamativos ya que en principio se esperaba obtener un nivel de lípidos por unidad de biomasa similar para ambos medios de cultivo (SS y SS+Me β CD). En vista de los mismos es evidente que la ciclodextrina ejerce una acción que no se remite al simple secuestro de inhibidores. La mayor cantidad de lípidos hallada en el medio suplementado con ciclodextrina sugiere un rol de este agente sobre la liberación de lípidos, quizás modificando alguna propiedad de membrana. Este aspecto será analizado en las siguientes secciones de este trabajo.

Capítulo 4

Desestabilización de la membrana externa y su relación con la liberación de antígenos (I)

Cuando se incorpora ciclodextrina a un sobrenadante de cultivo de fase de desaceleración, el incremento de actividad de AC extracelular es de un 55%, respecto al obtenido en el sobrenadante del mismo período sin la adición de Me β CD. En cambio si la ciclodextrina está presente desde el inicio del cultivo, el incremento de la actividad de AC observado es de un 112 % respecto al de un cultivo sin ciclodextrina, (Tabla 9). En esta condición el incremento de biomasa es de solo el 21%.

TABLA 9: Efecto de la adición de Me β CD sobre la actividad de la adenilato ciclasa de *B. pertussis* de sobrenadantes de cultivo de fase de desaceleración.

ADICION DE MeβCD AL MEDIO DE CULTIVO	ACTIVIDAD DE AC EXTRACELULAR (pmol AMPC/min.ml)
SIN ADICION	235
DESDE EL INICIO DE LA INCUBACION ^a	500
AL MOMENTO DE LA COSECHA ^b	365

^aLa Me β CD se incorpora al medio SS desde el comienzo del desarrollo celular.

^bLa Me β CD se agrega al sobrenadante del cultivo crecido en el medio SS después de centrifugar las células a 10000 x g durante 15 min. a 4 °C.

Se puede sugerir entonces, que este agente no sólo actuaría activando a AC de alguna manera, sino además provocando un aumento de la concentración extracelular de dicho antígeno. En base a estos datos se podría plantear entonces que la ciclodextrina favorecería la secreción de esta proteína al medio extracelular o incrementaría su producción por unidad de biomasa.

La capacidad de secretar proteínas al medio de cultivo ha sido reconocida como el hecho más importante y aprovechable de las bacterias Gram-positivas (Felmlee y col., 1985). Sin embargo, las bacterias Gram-negativas también liberan al medio de cultivo proteínas, pero sólo algunas de éstas han sido caracterizadas en detalle, y además es poco lo que se conoce sobre los mecanismos por los cuales son secretadas (Ito y col., 1981; Howard y col., 1985).

Uno de los aspectos más interesantes de la secreción en bacterias Gram-negativas es la manera por la cual la proteína es transportada a través de la membrana externa, ya que éste constituye un paso adicional que no existe en las bacterias gram-positivas. Esta membrana consiste en una bicapa asimétrica, de las cuales la interna está constituida por lípidos, en particular fosfolípidos y la externa contiene fundamentalmente lipopolisacáridos (LPS). Las características químicas de este último componente y su distribución asimétrica confieren a la membrana externa su propiedad única de barrera. A este respecto es crítica la asociación de las moléculas de LPS con proteínas y entre sí, a través de

cationes divalentes.

Entre los mecanismos conocidos de secreción de proteínas en bacterias Gram-negativas, se pueden citar: 1) transporte de proteínas a través de vesículas de membrana externa (Gankema y col., 1980); 2) liberación a través de cambios de permeabilidad de dicha membrana (Fernández y Smith, 1977); 3) liberación al medio extracelular como lipoproteína, para lo cual primeramente la proteína en cuestión debió ser exportada hasta la membrana externa (Pugsley y col., 1986); 4) transporte con la intervención de varias proteínas adicionales (Salmond y Reeves, 1993), etc.

Dado que, como se mencionó anteriormente, en el medio donde se ve aumentado el nivel de AC extracelular, mediante la adición de ciclodextrina al medio de cultivo, también se ve incrementado el contenido lipídico en los sobrenadantes de cultivo, se decidió estudiar en primer lugar, la desestabilización de la membrana externa como probable mecanismo de liberación de antígenos de *B. pertussis* (bacteria Gram-negativa). Para ello, se analizó comparativamente entre los medios SS y SS+Me β CD, el contenido de lipopolisacáridos (principal componente de membrana externa) en células y en sobrenadantes de cultivo, el cual es tomado como medida de la desestabilización-vesicularización de membrana externa. La concentración de ciclodextrina empleada para este y los siguientes estudios fue de 3 g/l. Dicha concentración se eligió por ser la óptima para el incremento del nivel de AC extracelular, como se demostró en

las experiencias anteriores.

Las preparaciones de lipopolisacáridos extraídos de células crecidas en los medios SS y SS+Me β CD (condición en donde el nivel de antígenos se ve incrementada) exhiben un perfil similar en geles de poliacrilamida. Estos perfiles consisten en dos bandas, una superior dominante (LPS a), y otra más pequeña (LPS b), los cuales se asemejan a los reportados por Pepller (1984) (Figura 12).

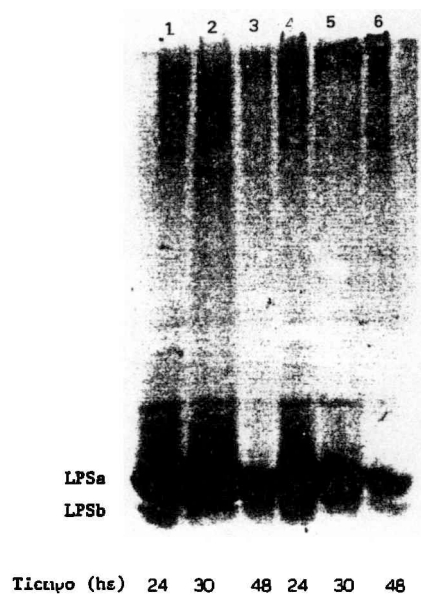


FIGURA 12: (a) SDS-PAGE (12.5%) de lipopolisacáridos celulares de *B. pertussis* provenientes de los medios SS (líneas 1,2,3) y SS+Me β CD (líneas 4,5,6). Las células fueron cosechadas en diferentes períodos del crecimiento y ajustadas a una misma densidad óptica a 650 nm antes de realizar los aislamientos de LPS. LPS a y LPS b son indicados en la figura.

(b) densitométríacorrespondiente a (a)

Este bandeo es característico del denominado LPS tipo "rugoso" el cual contiene el lípido A unido al núcleo oligosacarídico mediante una molécula de ácido 2-ceto-3-deoxi octulosónico (KDO) (Moreau y col., 1984), pero carece de la larga cadena de oligosacáridos denominada antígeno-O (Figura 13).

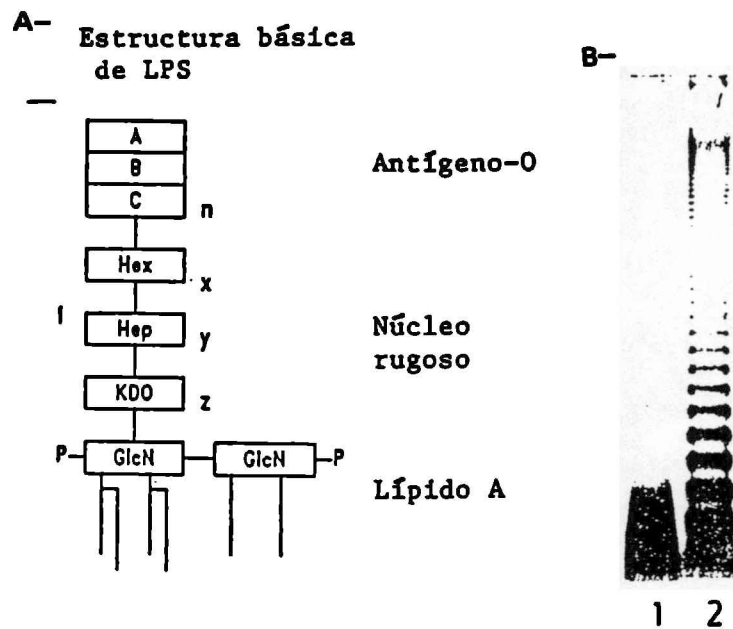


FIGURA 13: Representación esquemática y SDS-PAGE de un LPS típico. (A) sustituyentes básicos y variables de las tres regiones del LPS. n indica que el número de repeticiones del antígeno-O varía desde 0 hasta 50 para cada molécula de LPS individual. A, B y C representan los azúcares del antígeno-O, los cuales pueden ser hexosas, metil pentosas, ácido hexurónico, o hexosaminas. Hex, representa a las hexosas del núcleo rugoso del LPS (x indica que el número de azúcares varía, usualmente son 5 por molécula de LPS), Hep, heptosa (con y variando entre 2 y 3 por molécula de LPS); KDO, ácido 2-ceto-3-deoxioctulosónico (con z variando entre 1 y 4 por molécula de LPS), GlcN, glucosamina del lípido A (las líneas apuntando hacia abajo representan ácidos grasos); P, fosfatos; Ac, acetyl; EtN, etanolamina; HexN, hexosamina; PP, pirofosfato; AA, aminoácidos, FA, ácidos grasos. (B) SDS-PAGE de *Salmonella typhimurium*. Línea 1, "LPS rugoso": comprende el núcleo rugoso y el lípido A; línea 2, "LPS liso": comprende el lípido A, el núcleo rugoso y el antígeno-O.

Estos resultados indican que la adición de ciclodextrina al medio SS no modifica el perfil de LPS. La figura 12 muestra además que el contenido total de LPS de las células (estimado por densitometría) decrece en ambos medios de cultivo durante el crecimiento celular. Sin embargo, los niveles de LPS/DO_{650nm} correspondientes a diferentes tiempos del crecimiento celular en el medio SS+Me β CD son más bajos que los obtenidos en los mismos tiempos en el medio SS libre de ciclodextrina. Estos datos son de importancia desde el punto de vista de la producción de una vacuna menos reactogénica, ya que la opinión más consensuada es que el lipopolisacárido (endotoxina) presente en las vacunas celulares clásicas es un componente no protector, y contribuye a la toxicidad y a las reacciones secundarias descritas (Amano y col., 1990; Watanabe y col., 1990).

Teniendo en cuenta que el contenido de LPS en la célula disminuye durante el desarrollo celular, es esperable que dicho componente sea liberado al medio de cultivo. Se analizó entonces la cinética de liberación del LPS en los medios SS y SS+Me β CD mediante la determinación del ácido 2-ceto-3-deoxi-octulosónico (KDO), el cual es considerado un componente ubicuo de las endotoxinas (LPS) de las bacterias Gram-negativas (Figura 14).

La figura 14b muestra que el nivel de KDO en sobrenadantes de ambos medios de cultivo se incrementa durante el crecimiento celular. En el medio SS la velocidad de liberación del LPS permanece constante durante el

crecimiento de *B. pertussis*. Si bien en el medio suplementado con ciclodextrina, la velocidad de liberación de LPS es similar a la del medio SS hasta las 24 horas del desarrollo celular, entre las 24 y 32 horas presenta un marcado incremento, y finalmente alcanza en la fase estacionaria la misma velocidad que la correspondiente en el medio SS (Hozbor y col. 1993)

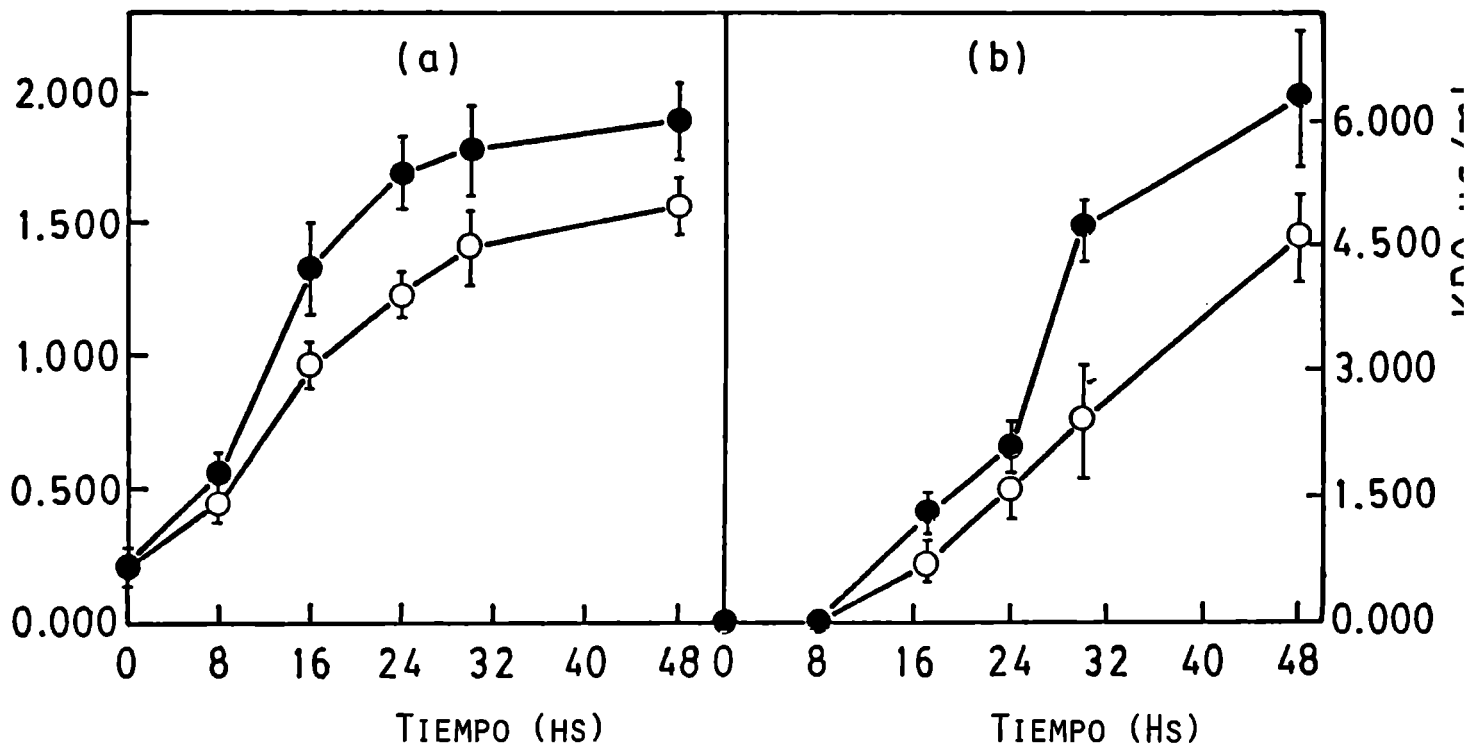


FIGURA 14: Cinética de producción de células y KDO en medios líquidos de cultivo de *B. pertussis*.

(a) Crecimiento celular en el medio SS (o) y en el medio SS+MeβCD (●).

(b) Nivel de KDO en sobrenadantes de cultivo de los medios SS (o) y SS+MeβCD (●).

Todos los resultados son el promedio de seis experiencias. Las barras verticales indican el error estándar de las medias.

La incrementada liberación de LPS por unidad de biomasa observada durante la fase estacionaria en ambos medios de cultivo, podría deberse o a una parcial muerte celular y lisis como lo sugieren Cadieux y colaboradores (1983) o a una desintegración parcial de la membrana externa.

En la figura 14 se puede observar además, que el nivel de KDO es mayor en el medio suplementado con ciclodextrina. Esta diferencia en el nivel de KDO entre ambos medios se hace significativa al inicio de la fase estacionaria del crecimiento celular ($p < 0.05$). Comparando los resultados obtenidos en los dos medios, el máximo crecimiento celular en el medio SS+Me β CD es 24% mayor que el del medio SS (Figura 14a), mientras que el nivel de KDO es aproximadamente 37% mayor que el correspondiente al medio libre de ciclodextrina (Figura 14b).

Estos resultados se correlacionan directamente con los perfiles en SDS-PAGE de LPS de sobrenadantes de los medio SS y SS+Me β CD (Figura 15), los cuales son similares para los dos medios ya que ambos presentan las dos bandas (LPS a y LPS b) y similares a los descritos anteriormente para el LPS celular.

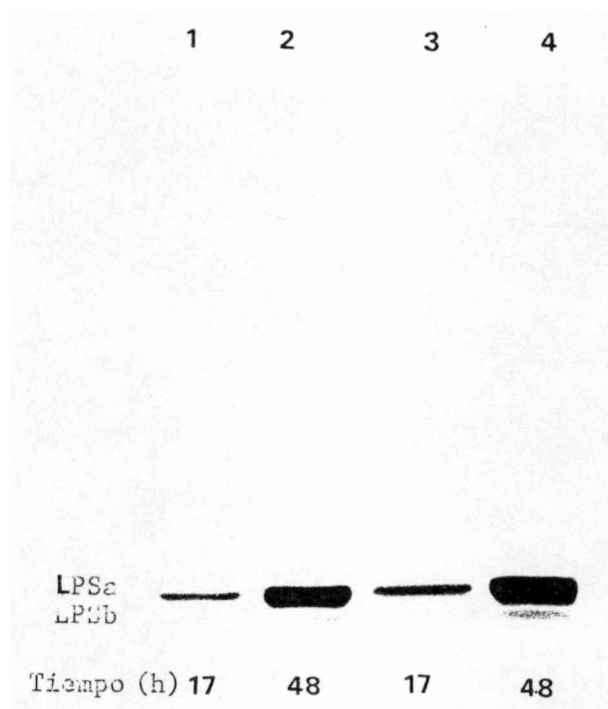


FIGURA 15: SDS-PAGE (15%) de lipopolisacáridos de sobrenadantes de cultivo de *B. pertussis* de los medios SS (líneas 1,2) y SS+Me β CD (líneas 3,4).

Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Perera y colaboradores (1987), quienes demostraron que la adición de (1 g/l) de ciclodextrina al medio de cultivo causa un pequeño pero consistente incremento en la liberación de LPS.

Por otra parte, otros autores determinaron que la adición de ciclodextrina al medio de cultivo provoca una reducción o directamente no afecta los niveles de LPS del

sobrenadante en relación al obtenido en el medio SS (Ibsen y col., 1989). Esta diferencia con nuestros resultados podría explicarse si se considera que en aquel trabajo se emplea seis veces menos ciclodextrina que el usado por nosotros (0.5 g/l vs 3 g/l empleado por nosotros); la relación entre el volumen del erlenmeyer: volumen de medio de cultivo también es menor, con lo cual la transferencia de O₂ y por consiguiente la cinética de crecimiento resultan diferentes; y finalmente la técnica de detección es distinta.

El aumento en los niveles de LPS en los sobrenadantes de cultivo descrito más arriba, parece deberse a un proceso de liberación más que a uno de producción, como lo muestra la figura 12, con la disminución del contenido celular de LPS. Sin embargo, para avanzar en este aspecto se realizaron una serie de experiencias empleando agentes de acción conocida sobre la liberación de LPS (Vaara, 1992). Para ello, se sedimentaron por centrifugación células provenientes del medio SS libre de ciclodextrina, las cuales fueron lavadas y llevadas a la misma densidad óptica con las siguientes soluciones: a) buffer Tris-HCl 100 mM, b) buffer Tris-HCl 100 mM + EDTA 20 mM (Tris-EDTA) y c) buffer Tris-HCl 100 mM + Me β CD 3 g por l. Cada una de estas suspensiones fue incubada a temperatura ambiente con agitación constante durante dos horas.

En relación a las sustancias seleccionadas para esta experiencia, se ha reportado que el buffer Tris es una amina primaria que a altas concentraciones incrementa la

permeabilidad de la membrana externa. Se ha sugerido que dicho buffer se une al LPS reemplazando a los cationes estabilizantes Ca^{+2} y Mg^{+2} y reduciendo la interacción entre moléculas de LPS (Vaara, 1992). El buffer Tris actúa sinérgicamente con el EDTA en la liberación del LPS de bacterias entéricas, es así que una solución de Tris 100 mM sin EDTA libera 20% del LPS de la *S. typhimurium* tipo "liso", mientras que con EDTA libera entre un 30% y 50% del LPS de *E. coli* y *S. typhimurium* (Schnaitman, 1971_b; Hancock, 1991; Vaara, 1992).

En base a estos datos, se quiso comparar el efecto de estas sustancias con el de la ciclodextrina, y es así que luego de transcurrido el tiempo de incubación, cada una de las mezclas antes descritas fueron centrifugadas a 10000 x g durante 15 min. a 4°C. Con los sobrenadantes obtenidos se realizaron corridas electroforéticas en geles desnaturalizantes (Figura 16). En la Figura 16 se observa que el contenido de LPS en el sobrenadante Tris-ciclodextrina es comparable, o un poco menor, que el obtenido en el sobrenadante Tris-EDTA, pero mayor que el correspondiente al sobrenadante Tris sólo. Estos resultados muestran que la ciclodextrina favorece la liberación de LPS al medio extracelular.



FIGURA 16: SDS-PAGE (15%) de lipopolisacáridos de sobrenadantes provenientes de tres mezclas de incubación: células de *B. pertussis* + buffer Tris-HCl 100 mM (línea 1); células de *B. pertussis* + buffer Tris-HCl 100 mM y EDTA 20 mM (línea 2) y células de *B. pertussis* + buffer Tris-HCl 100 mM y Me β CD 3 g/l (línea 3).

También se pudo descartar un efecto solubilizante de la ciclodextrina sobre el LPS, ya que el agregado de este agente a un sobrenadante del medio SS con nivel conocido de KDO no provoca, luego de una incubación, un incremento en dicho valor de KDO.

Con el fin de determinar si el efecto de la ciclodextrina es un fenómeno generalizable para las otras

especies de género *Bordetella*, la liberación de LPS se analizó también en cultivos de *B. parapertussis* (*Bpp*) y *B. bronchiseptica* (*Bb*) (Figura 17). El perfil de LPS de *Bpp* presenta un bandeo tipo "escalera" de alto peso molecular, característico de los LPS tipo "liso" y una banda simple de migración rápida de bajo peso molecular (Figura 17, líneas 7, 8, 9, 10). Esta última banda es similar en peso molecular al LPS b de *B. pertussis*. Las preparaciones de LPS de *Bb* presentan dos bandas (Figura 17, líneas 3,4,5,6), de las cuales la de migración más lenta corresponde a un peso molecular un poco más alto que la de mayor peso molecular de *B. pertussis* (LPSa).

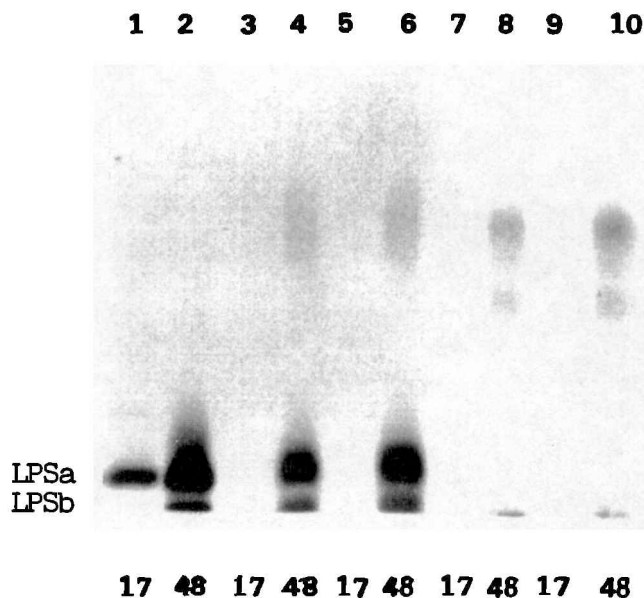


FIGURA 17: SDS-PAGE (15%) de lipopolisacáridos de sobrenadantes de cultivo de tres cepas diferentes de *Bordetella* crecidas en los medios SS (líneas 1,2,3,4,7 y 8) y SS+Me β CD (líneas 5,6,9 y 10). Líneas 1,2, *B. pertussis* 8132; líneas 3,4,5,6, *B. bronchiseptica* CIP 55110T; líneas 7,8,9,10, *B. parapertussis* CIP 6400T.
KDO ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}/\text{Do}_{650 \text{ nm}}$): línea 1, 0.75; línea 2, 2.94; línea 3, 0.00; línea 4, 0.22; línea 5, 0.00, línea 6, 0.54; línea 7, 0.00; línea 8, 0.98; línea 9, 0.00; línea 10, 1.35.

En todos los sobrenadantes suplementados con ciclodextrina ensayados, los perfiles de LPS fueron similares a los correspondientes del medio SS, pero los niveles por unidad de biomasa estimados por DO_{650nm} , a las 48 horas de cultivo fueron superiores. La adición de ciclodextrina (3g/l) produce un incremento de 2.43 veces en los valores de KDO de *B. bronchiseptica* y de 1.37 veces para *B. parapertussis*. Sin embargo, para ambas especies el nivel de KDO/DO_{650nm} en cada uno de los tiempos de cultivo ensayados fueron menores que los correspondientes de *B. pertussis* (Hozbor y col., 1993).

La liberación espontánea de LPS por parte de otras bacterias Gram-negativas durante el desarrollo celular ha sido reportado por otros autores, sin embargo la causa de la misma aún no se conoce (Devoe y Gilchrist, 1973; Cadieux y col., 1983).

El incremento en la liberación de LPS por parte de la ciclodextrina podría deberse a una desestabilización de la membrana como lo sugirió Perera y colaboradores (1987). Es sabido que la ciclodextrina forma complejos de inclusión con residuos hidrofóbicos, tales como ácidos grasos (Imaizumi y col., 1983_b; Brewster y col., 1989). Según la hipótesis de Perera y colaboradores, la ciclodextrina podría interactuar entonces, de alguna manera con la endotoxina (LPS) de *B. pertussis* ya que este componente de membrana externa está constituido por una serie de ácidos grasos (Starkloff y Szabó, 1986).

Para avanzar en este aspecto, se determinó la

distribución de la ciclodextrina en el cultivo mediante una técnica basada en la capacidad de la ciclodextrina de incrementar la fluorescencia del colorante 2-p-toluidinilnaftalen-6-sulfato (Kondo y col., 1976). Dicha técnica fue descrita en Materiales y Métodos. En nuestras condiciones de trabajo el mayor porcentaje de ciclodextrina se encuentra en el sobrenadante de cultivo, del cual un 5 % parece estar asociado a una fracción soluble de peso molecular >30 kDa. Este último resultado se obtuvo mediante el empleo de un sistema de ultrafiltración-partición de corte molecular de 30 kDa y de bajo pegado proteico. Del total de ciclodextrina un 2 % se encuentra unido a células enteras. Esta unión a las células podría desorganizar la membrana externa y de esta manera, favorecer la liberación de LPS al medio extracelular.

Teniendo en cuenta estos resultados se decidió estudiar qué propiedades de la membrana externa se ven afectadas por la adición de ciclodextrina, y de existir modificaciones en las mismas, analizar su relación con la producción de antígenos. Estos aspectos se describirán en la siguiente sección

Desestabilización de la membrana externa (II)

El incremento observado en la liberación de LPS durante el crecimiento de *B. pertussis* en el medio SS suplementado con ciclodextrina (Figura 14b), permitió sugerir que dicho agente desestabiliza de alguna manera la membrana externa. En primer lugar, y para avanzar en este aspecto, se analizaron comparativamente los perfiles polipeptídicos de membrana externa de células crecidas en el medio SS y SS+Me β CD. Las corridas electroforéticas en SDS-PAGE revelaron diferencias cuali y cuantitativas entre ambos perfiles. Las mismas se muestran en la figura 18.

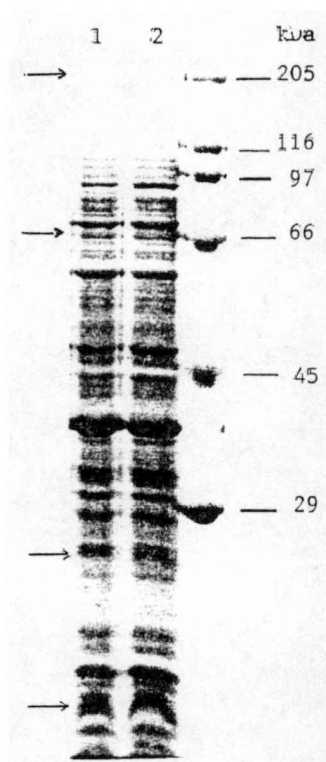


FIGURA 18: SDS-PAGE (12.5%) de polipéptidos de membrana externa de *B. pertussis* de los medios SS+Me β CD (línea 1) y SS (línea 2). Las células fueron cosechadas a las 48 hs de cultivo. Los pesos moleculares en KDa están indicados.

Las modificaciones de la membrana externa descritas más arriba (niveles de LPS y perfiles polipeptídicos) indujeron a estudiar otras propiedades de dicha membrana, tales como fluidez (Tsuchiya y col., 1987). Esta propiedad es entendida como la mayor o menor movilidad de las moléculas componentes de la membrana (lípidos, proteínas intrínsecas) para difundirse por la bicapa. La mayoría de los lípidos de las biomembranas contienen cadenas hidrocarbonadas largas; predominando los casos de 16 y 22 átomos de carbonos. Estas cadenas constituyen la matriz de la bicapa; la fluidez de la misma depende de las características de estas cadenas hidrocarbonadas: su longitud, ramificación, insaturación, etc.

La conformación más estable para dos carbonos contiguos es la llamada *trans*, es decir, aquella en la que los sustituyentes alquílicos de estos carbonos se hallan en las posiciones lo más alejadas posible. Para la totalidad de la cadena, la conformación más estable es aquella en que cada carbono se encuentra en conformación alternada *trans* con respecto a sus contiguos; se dice entonces que la cadena se halla en conformación *todo-trans*. Aunque se trata de la conformación más estable, las cadenas hidrocarbonadas que forman parte de las biomembranas suelen adoptar conformaciones menos estables con parejas de carbonos contiguos en conformación eclipsada o también llamada alternada *izquierda* o *gauche*.

La conformación de las cadenas hidrocarbonadas adquiere una significación especial cuando se considera la ordenación o empaquetamiento de los lípidos anfipáticos en la bicapa. Una bicapa lipídica integrada por cadenas en conformación *todo-trans* posee el grado máximo de ordenamiento; sus cabezas polares se disponen hexagonalmente. Cualquier causa que determine la aparición de conformeros *izquierdos* u otros aumentará el desorden de la matriz lipídica.

La temperatura condiciona el equilibrio conformacional de las cadenas hidrocarbonadas. Su aumento favorece múltiples estados conformacionales distintos del alternado *trans*. Cuando se suministra calor a una bicapa con las cadenas *todo-trans*, el cambio que se registra en la morfología es altamente cooperativo: se da una transición de fase en la que todas las cadenas, al alcanzar una temperatura determinada, absorben calor para pasar a un estado menos ordenado. Las fases ordenada y menos ordenada separadas por esta transición se denominan, respectivamente, gel y cristal líquido. La transición es reversible. Si bajamos la temperatura, la fase cristal líquido se vuelve a ordenar para producir la fase gel con liberación de calor. Por encima de la transición de fase, las cadenas hidrocarbonadas pierden su simetría hexagonal y se disponen al azar. Además, en una bicapa desordenada los fosfolípidos rotan en torno a un eje perpendicular al plano de la bicapa y difunden lateralmente por moción térmica.

Hasta aquí se ha distinguido dos estados: líquido

cristalino y gel. Sin embargo, cuando tratamos con mezclas complejas de lípidos, como las membranas celulares, no hay transiciones cooperativas sino graduales, para las cuales resulta conveniente aplicar una técnica que proporcione una información fácilmente relacionable con la fluidez a cada temperatura. La espectroscopía de fluorescencia cumple este requisito (Shinitzky y Barenholtz, 1976). Esta técnica exige la introducción en la bicapa de una molécula hidrofóbica fluorescente que actúa como sonda. Al incidir sobre la sonda una radiación de excitación, polarizada en un plano, el mantenimiento de esta polarización en la radiación emitida indicará que la sonda tiene escasa libertad de movimiento. Por el contrario la despolarización de la radiación fluorescente emitida indicará que la sonda, en el tiempo transcurrido entre la excitación y la emisión, ha variado su orientación. El grado de despolarización de la señal refleja de este modo la microviscosidad de la membrana.

El concepto de viscosidad no puede ser aplicado a bicapas lipídicas ya que ésta no puede ser considerada como un medio isotrópico. Por eso se define microviscosidad como la media geométrica de las viscosidades aparentes a lo largo de cada eje de simetría.

El efecto de las proteínas sobre las transiciones de fase de las bicapas lipídicas difiere según el tipo de proteína de que se trate. Dentro de las proteínas extrínsecas algunas se unen a la superficie de la bicapa sin penetrar en la región de las cadenas hidrocarbonadas, y otras por el

contrario se unen a la bicapa produciendo cierta deformación o penetrando parcialmente en la misma.

Las proteínas intrínsecas actúan disminuyendo y suprimiendo la transición de fase y no variando la temperatura de transición.

En el caso de los organismos Gram-negativos la situación es más compleja debido a la existencia de dos membranas, la citoplasmática y la externa. Sin embargo, se ha podido describir la fluidez de ambas y más aún, se ha estudiado la influencia de la temperatura de crecimiento tanto en la fluidez como en la composición de cada una de dichas membranas (Janoff y col., 1980). Es así, que se ha determinado que la membrana externa y no la citoplasmática sufre ciertos cambios que permiten a las células adaptarse a distintas condiciones del entorno.

Considerando esta capacidad adaptativa de la membrana externa, se decidió analizar si *B. pertussis* modificaba la fluidez de su membrana en el medio suplementado con ciclodextrina.

Para este estudio se utilizó la espectroscopía de fluorescencia empleando como sonda el difenilhexatrieno (DPH) en una concentración de 1 μM (Shinitzky y Barenholtz, 1976). El fluoróforo en solución de tetrahidrofurano fue adicionado a suspensiones celulares de igual densidad óptica provenientes de los medios SS y SS+Me β CD, cosechadas a distintos períodos del desarrollo celular (fase logarítmica y fase estacionaria). Se analizó la variación de la

polarización en función de la temperatura. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 19a y 19b.

En estas figuras se puede observar que los perfiles de las curvas de polarización en función de la temperatura son similares para ambos medios de cultivo, resultado que sugiere que la adición de Me β CD al medio SS no provoca un cambio significativo en la fluidez de la membrana.

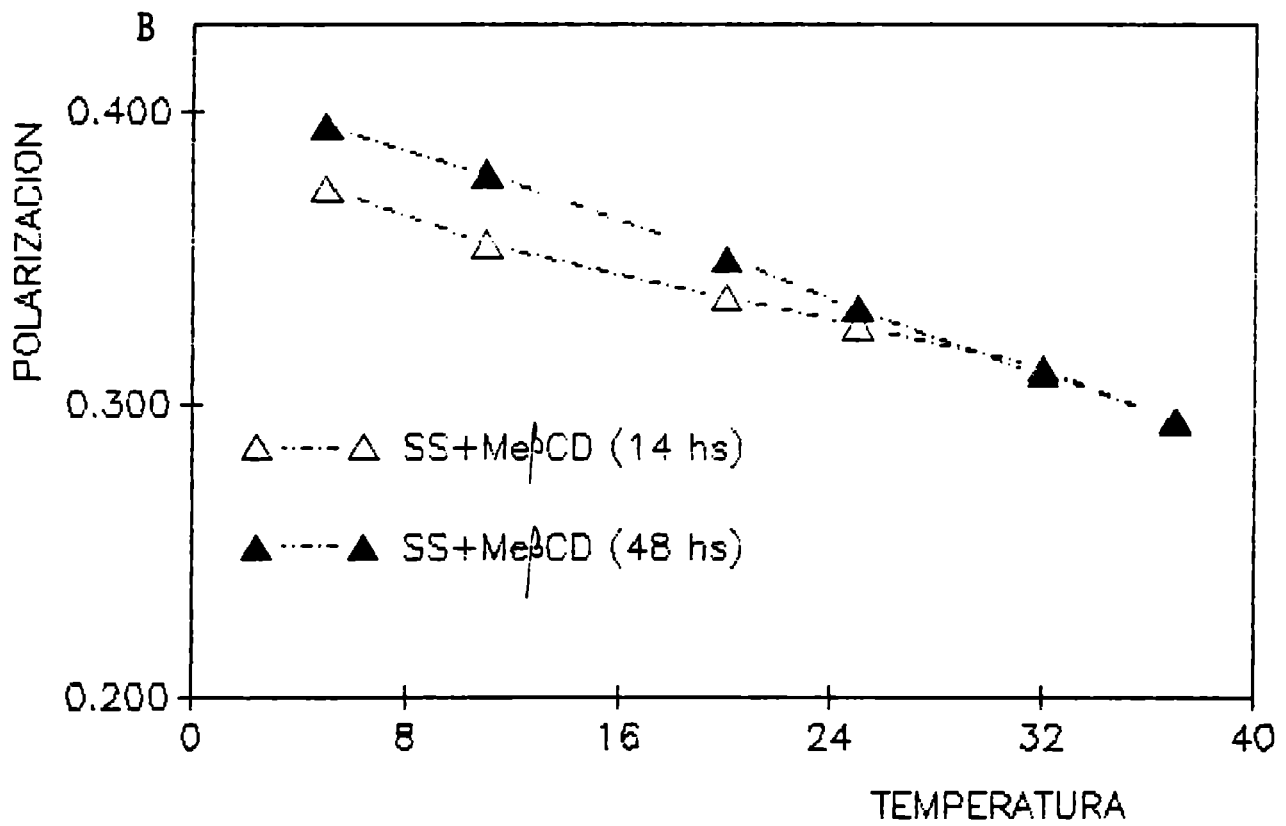
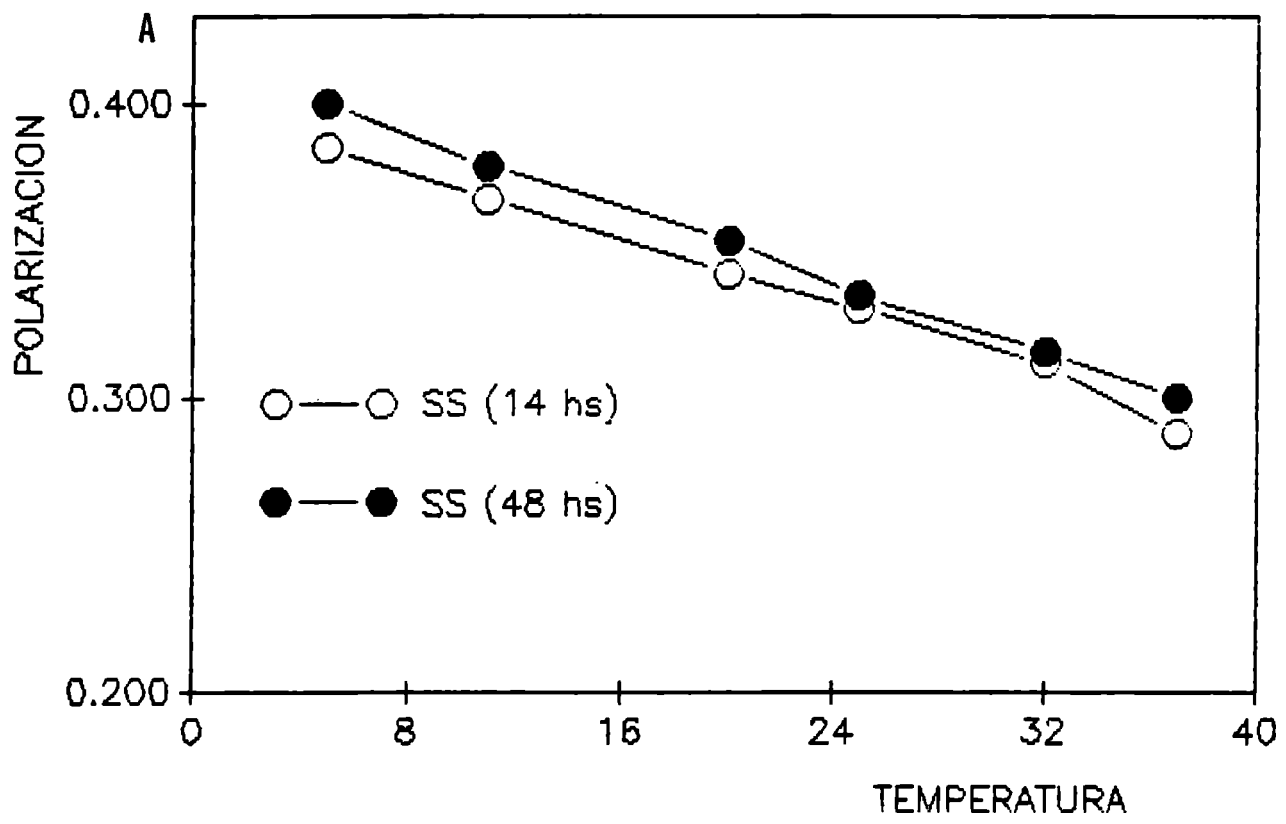


FIGURA 19

Capítulo 5

Relación entre la secreción de la adenilato ciclasa y los componentes de membrana externa

Uno de los posibles mecanismos de secreción de proteínas al medio extracelular por parte de bacterias Gram-negativas es mediante la liberación de vesículas de membrana externa (VME) (Gankema y col., 1980).

En condiciones donde el nivel de adenilato ciclasa extracelular se ve incrementado por la adición de ciclodextrina, se pudo observar paralelamente un aumento en el nivel de LPS en los sobrenadantes, (como se discutió anteriormente). Dado que el LPS es uno de los principales componentes de la membrana externa, es posible que en el caso de *B. pertussis* las proteínas (AC) se secreten mediante VME.

Con el fin de analizar la relación entre la liberación de LPS y la producción de la adenilato ciclasa, se realizó en la cual se determinaron los niveles de AC y LPS en sobrenadantes de medios de cultivo que contienen distintos buffers: Tris-HCl (12.5 mM) y HEPES (0.05 M). Estos buffers se seleccionaron porque el buffer Tris-HCl (Irvin y col., 1981; Vaara, 1992), como se mencionó anteriormente, produce efectos conocidos sobre la organización estructural de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. El Tris se une, competitivamente con los cationes divalentes, a estructuras de superficie tales como lipopolisacáridos,

liberando estos componentes y consecuentemente, incrementando la permeabilidad de la membrana; en cambio, el buffer alternativo HEPES no ejerce tal acción sobre la membrana externa.

En estas experiencias se pudo observar que las bacterias crecidas en medios conteniendo buffer Tris-HCl (SS-Tris) liberaron 1.6 veces más AC que cuando crecieron en el medio conteniendo HEPES (SS-HEPES) (Figura 20). Paralelamente, se observó mediante corridas electroforéticas, que el contenido de LPS en los sobrenadantes del medio con buffer HEPES fue visiblemente inferior que el obtenido empleando como buffer al Tris-HCl (Figura 20)

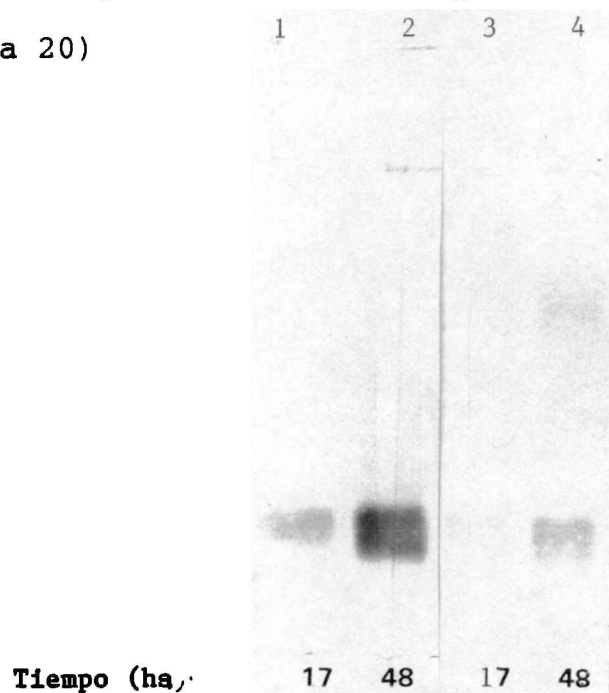


FIGURA 20: SDS-PAGE (15%) de lipopolisacáridos de sobrenadantes de cultivo de *B. pertussis* desarrollada en los medios SS-Tris (líneas 1,2) y SS-HEPES (líneas 3,4). Actividad de AC extracelular (pmol AMPC/ml. min): línea 1, 150; línea 2, 280; línea 3, 90.7; línea 4, 174.

Bajo la misma hipótesis sobre la secreción de proteínas mediante VME, se realizó una nueva experiencia empleando

otros agentes de acción conocida sobre la liberación de LPS (Vaara, 1992). La misma fue explicada, en parte, en secciones anteriores. Brevemente, células crecidas en el medio SS fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas (en tres tubos diferentes), a la misma densidad óptica, con las siguientes soluciones: Tris-HCl 100 mM; Tris-HCl 100 mM más EDTA 20 mM; y Tris-HCl 100 mM más ciclodextrina 3 g/l. Cada una de las suspensiones celulares fue incubada durante 2 hs a temperatura ambiente con agitación constante. Finalizado el tiempo de incubación, las células fueron sedimentadas por centrifugación a 10000 x g durante 15 min. a 4°C. Los sobrenadantes así obtenidos y previamente concentrados, se aplicaron a geles desnaturizantes para detectar LPS y polipéptidos (Figura 16 y 21). Paralelamente, de cada uno de los pellet celulares, se extrajo polipéptidos de membrana externa, los cuales se aplicaron en geles desnaturizantes (Figura 22).

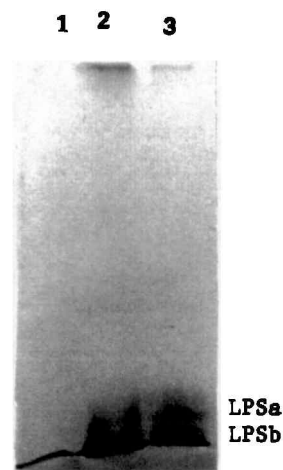


FIGURA 16: SDS-PAGE (15%) de lipopolisacáridos de sobrenadantes provenientes de tres mezclas de incubación: células de *B. pertussis* +

buffer Tris-HCl 100 mM (línea 1); células de *B. pertussis* + buffer Tris-HCl 100 mM y EDTA 20 mM (línea 2) y células de *B. pertussis* + buffer Tris-HCl 100 mM y Me β CD 3 g/l (línea 3).

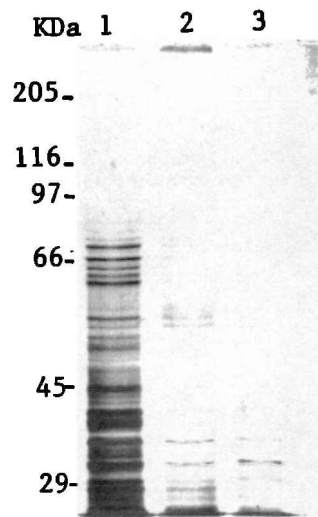


FIGURA 21: SDS-PAGE (10%) de polipéptidos de sobrenadantes provenientes de tres mezclas de incubación: células de *B. pertussis* + buffer Tris-HCl 100 mM y Me β CD 3 g/l (línea 1); células de *B. pertussis* + buffer Tris-HCl 100 mM y EDTA 20 mM (línea 2) y células de *B. pertussis* + buffer Tris-HCl 100 mM (línea 3).

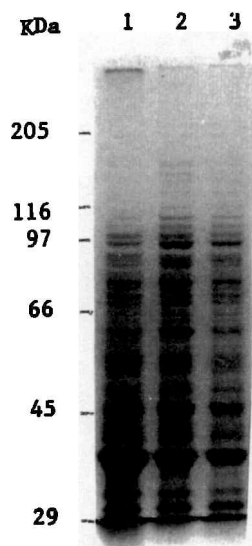


FIGURA 22: SDS-PAGE (10%) de polipéptidos de membrana externa de: células de *B. pertussis* + buffer Tris-HCl 100 mM (línea 1); células de *B. pertussis* + buffer Tris-HCl 100 mM y EDTA 20 mM (línea 2) y células de *B. pertussis* + buffer Tris-HCl 100 mM y Me β CD 3 g/l (línea 3).

En la figura 16 (como se describió anteriormente) se observa que el nivel de LPS en el sobrenadante-ciclodextrina es comparable, o un poco menor, que el correspondiente al sobrenadante-EDTA. Sin embargo, este nivel es mayor que el del sobrenadante-Tris. También se pudo observar que en el sobrenadante-ciclodextrina, el nivel de proteínas liberadas es superior que el del sobrenadante-Tris (Figura 21). Sin embargo, en el caso del sobrenadante-EDTA, si bien el contenido de proteínas liberadas es mayor que las del sobrenadante-Tris, el mismo es menor que el correspondiente al sobrenadante-ciclodextrina. Este último dato indicaría que el contenido de LPS en el sobrenadante no refleja exactamente los niveles de proteínas liberadas, lo cual sugeriría que la ciclodextrina-Tris ejerce una acción adicional sobre la liberación de proteínas, posiblemente alterando alguna propiedad de la membrana externa.

En relación a los polipéptidos de membrana externa, se pudo determinar que existen diferencias cuantitativas entre las tres preparaciones realizadas, en particular en la zona delimitada entre los pesos moleculares 70 y 200 kDa (Figura 22). Se observó, además, que el contenido proteico en el caso de las células incubadas con ciclodextrina-Tris es menor que el obtenido en las otras dos preparaciones.

Todos estos resultados avalan la hipótesis antes planteada sobre la liberación de proteínas al medio extracelular.

Para clarificar este aspecto se intentó aislar de sobrenadantes de cultivo de los medios SS y SS+Me β CD, vesículas de membrana externa (VME). Para ello se empleó una técnica descrita en bibliografía y detallada en este trabajo en la sección de Materiales y Métodos.

Los extractos crudos de VME obtenidos fueron sometidos a una electroforesis en geles desnaturalizantes y posteriormente transferidos a una membrana de polivinildifluoruro (PVDF), la cual fue revelada con anti-AC como primer anticuerpo y anti-IgG-fosfatasa alcalina como segundo anticuerpo (Figura 23). Para ésta y para las posteriores pruebas de inmunodetección se empleó como patrón AC purificada (por el IDEHU, Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, UBA) de acuerdo a la técnica descrita por Ladant y colaboradores (1986) mediante la cual se obtienen fundamentalmente las formas de bajo peso molecular de AC (60 kDa). Esta técnica de blotting permitió verificar que efectivamente las preparaciones de VME contienen AC. Este mismo resultado también se observó en VME obtenidas a partir de células crecidas en ambos medios de cultivo, SS y SS+Me β CD (Figura 23).

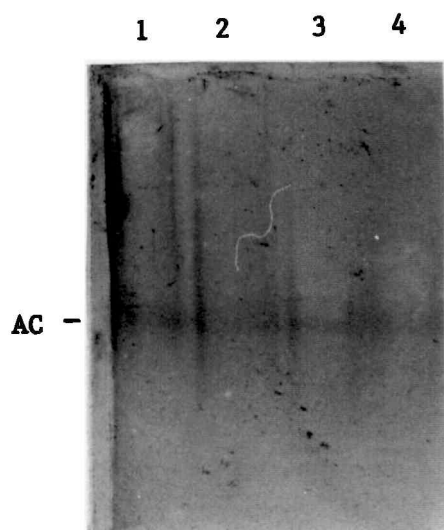


FIGURA 23: Western blot con anti-AC monoespecífico, de vesículas de membrana externa aisladas de: células cosechadas del medio SS, línea 1; células cosechadas del medio SS+Me β CD, línea 2; sobrenadante de cultivo del medio SS, línea 3; sobrenadante de cultivo del medio SS+Me β CD, línea 4. Para el revelado se empleó anti-IgG-fosfatasa alcalina como segundo anticuerpo y NBT y BCIP como sustratos.

Estos resultados sugieren un posible mecanismo de liberación de AC al medio extracelular, en el cual intervendría: una desestabilización de membrana externa, liberación de vesículas de membrana externa-LPS, liberación de AC. Este mecanismo estaría favorecido por la presencia de ciclodextrina en el medio de cultivo.

Estos importantes datos, sin embargo, aún no aclaran la causa de la pérdida de actividad de los principales inmunógenos durante la fase estacionaria del desarrollo celular. Una posibilidad es que los mismos se encuentren en

el sobrenadante de cultivo en parte asociados al LPS (VME), comprometiendo de esta manera su sitio activo o cambiando su conformación.

Por otra parte, y sin ser excluyente de lo dicho anteriormente, la adenilato ciclasa (con dominios hidrofóbicos) podría formar agregados moleculares en el medio extracelular acuoso. La formación de los mismos dependería de la concentración de AC extracelular y por lo tanto del desarrollo celular. Existen varios trabajos que hacen referencia de la heterogeneidad de pesos moleculares de AC (45 a 700 kDa) (Kessin y Franke, 1986; Friedman, 1987; Rogel y col., 1989), atribuyendo la actividad tóxica (entrada a células eucariotas y posterior disrupción de las funciones celulares) a las formas de alto peso molecular (Hanski, 1989; Raptis y col., 1989). Hasta el presente no se ha aclarado si las formas de mayor peso molecular del enzima (menor actividad biológica específica, Hanski, 1989) representan agregados moleculares de la misma subunidad catalítica o con otros polipéptidos, o de múltiples formas moleculares de AC. El conocimiento de estos aspectos y su relación con el poder protector de las diferentes especies moleculares, así como también el esclarecimiento de lo que ocurre en el medio extracelular, resulta de gran interés desde el punto de vista de la producción de la nueva vacuna acelular.

Para avanzar en este campo, se analizó en forma comparativa los perfiles polipeptídicos de sobrenadantes de cultivo de los medios SS y SS+Me β CD correspondientes a

diferentes períodos del desarrollo celular. Las muestras fueron sometidas a corridas electroforéticas en geles desnaturalizantes (Figura 24 a y b). Las figuras muestran diferencias, fundamentalmente cuantitativas, entre los perfiles correspondientes a ambos medios de cultivo. En particular, se observa que mientras en el medio suplementado con ciclodextrina aparece un banda pronunciada en la zona de 200 kDa, en el medio SS la misma aparece en forma tenue. En ambos medios, manteniendo la diferencia mencionada, la intensidad de dicha banda se incrementa con el desarrollo celular.

Estos resultados confirman los reportados por Bellalou y colaboradores (1990), quienes fueron los primeros en demostrar que AC también es secretada en la forma de 200 kDa además de las formas de menor peso molecular.

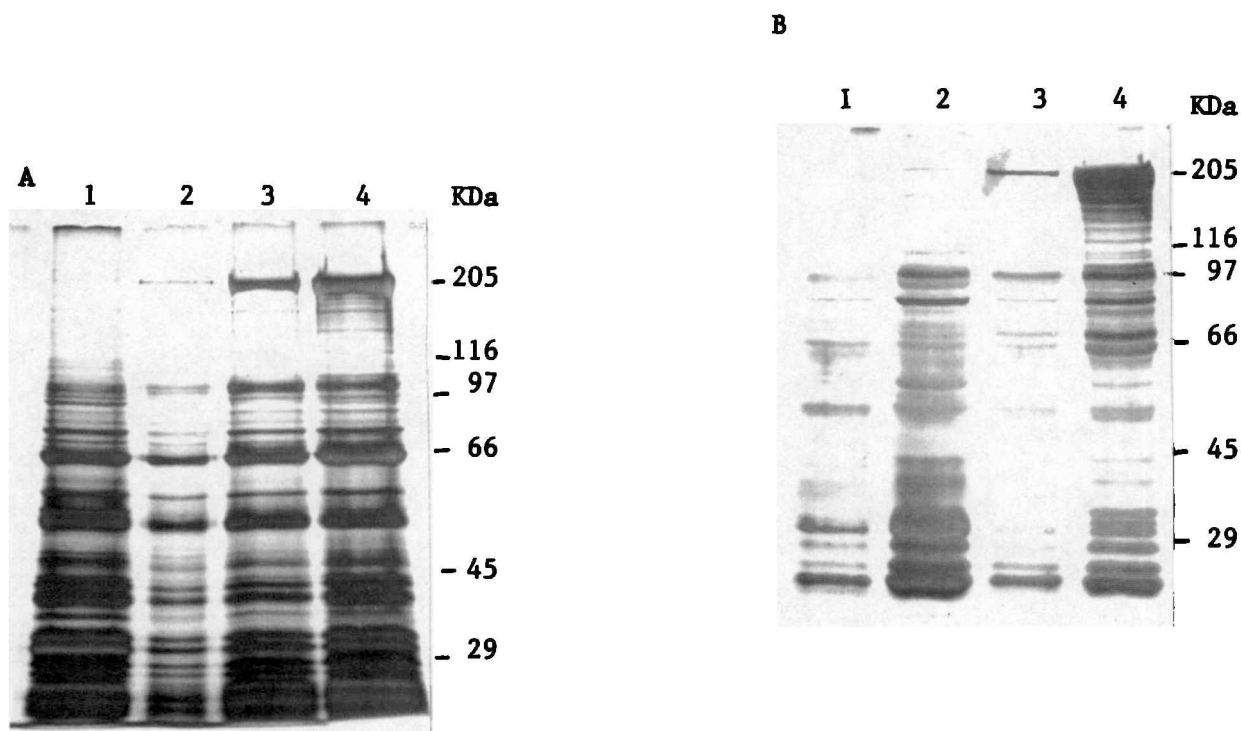


FIGURA 24: SDS-PAGE de polipéptidos de sobrenadantes de cultivo de *B. pertussis*, de los medios: **a)** SS (línea 1) y SS+Me β CD (líneas 2, 3, 4); **b)** SS (líneas 1,2) y SS+Me β CD (líneas 3,4).

Esta banda de 200 kDa merece especial atención, ya que recientemente se ha demostrado que la forma tóxica de AC tiene este peso molecular. Esta forma molecular de AC, y no las de menor peso molecular, contiene dominios hidrofóbicos a

través de los cuales podrían formarse agregados (Kessin y Franke, 1986; Glasser y col., 1991).

Se decidió entonces, estudiar más específicamente este aspecto mediante la técnica de inmunoblotting, para lo cual se transfirieron a una membrana de PVDF los geles de polipéptidos de sobrenadante de cultivo, antes obtenidos. Seguidamente, la membrana con las proteínas transferidas, fue tratada con anticuerpo anti-AC y revelada de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos. El blotting de la figura 25 muestra que efectivamente este anticuerpo anti-AC reconoce a polipéptidos de peso molecular próximo a 200 kDa, además de otros de menor peso molecular. La reacción antígeno-anticuerpo se hizo visible en el caso del sobrenadante de 48 hs del medio SS suplementado con ciclodextrina, condición en la cual la banda de 200 kDa es notable. Sin embargo, dicha banda puede ser detectada en cada uno de los sobrenadantes ensayados si los mismos han sido concentrados (Figura 26). Nuevamente, la intensidad de la banda es menor en los estadios tempranos del desarrollo celular en ambos medios de cultivo. Estos cambios de intensidad de la banda de 200 kDa correlacionan fuertemente con los cambios en la actividad observados anteriormente en distintos estadios del desarrollo celular, con o sin el agregado de ciclodextrina (véase capítulo 3)

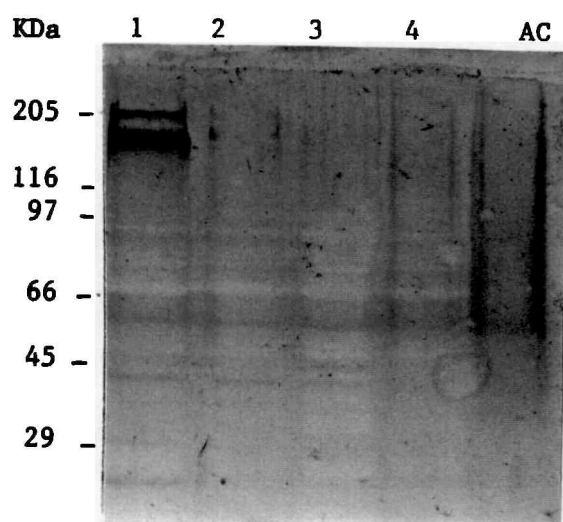


FIGURA 25: Western blot con anti-AC mono-específico, de sobrenadantes de cultivo de *B. pertussis* de los medios: SS+Me β CD (líneas 1,2) y SS (líneas 3,4). Para el revelado se empleó como segundo anticuerpo anti-IgG-fosfatasa alcalina y como sustratos NBT y BCIP.

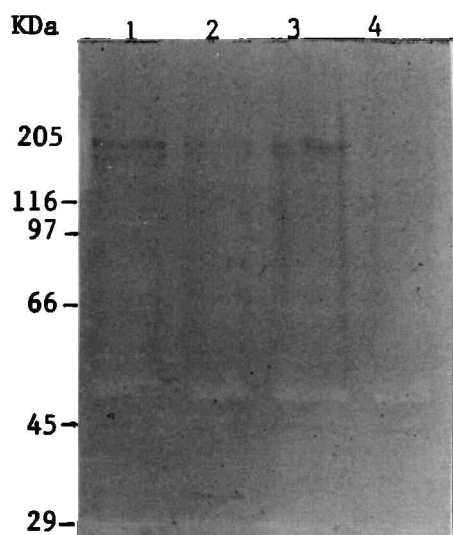


FIGURA 26: Western blot con anti-AC mono-específico, de sobrenadantes (previamente concentrados) de cultivo de *B. pertussis* de los medios: SS+Me β CD (líneas 1,2) y SS (líneas 3,4). Para el revelado se empleó como segundo anticuerpo anti-IgG-fosfatasa alcalina y como sustratos NBT y BCIP.

Kessin y Franke (1986) detectaron en el sobrenadante de cultivo del medio SS, luego de concentrarlo y someterlo a pasajes sucesivos por columnas de intercambio iónico y exclusión molecular, dos picos: uno con amplio rango de pesos moleculares, con un pico de 700 kDa, y otro con un rango de pesos moleculares de 60 a 70 kDa. Estos autores hallaron que en sus preparaciones la adenilato ciclasa se encuentra en su mayor parte como una forma de alto peso molecular, cuya actividad está oculta a no ser que la calmodulina se halle presente en el ensayo. Las formas de alto y bajo peso molecular del enzima difieren en su interacción con la calmodulina. Si bien la relación entre ambas formas de AC no pudo ser establecida, estos autores sugieren que las interacciones hidrofóbicas juegan un rol importante en la conversión de una forma a otra. En este sentido, observaron que la forma de bajo peso molecular no puede convertirse a la forma de alto peso molecular, quizás debido a que la misma haya perdido los dominios hidrofóbicos necesarios para la agregación. Siguiendo con esta idea y teniendo en cuenta que tanto en el medio SS como en el SS+Me β CD la aparición de la banda de 200 kDa correspondiente a AC depende del desarrollo celular, es probable que durante la fase estacionaria donde es notable dicha banda, la AC a través de sus dominios hidrofóbicos, interaccione consigo misma o con otras moléculas hidrofóbicas (LPS, tal vez), presentes en el medio extracelular. De esta manera, al agregarse o interaccionar con otras moléculas, el sitio activo del enzima quedaría

comprometido y consecuentemente, el valor de la actividad disminuiría.

Para analizar esta posibilidad se realizaron experiencias en sobrenadantes de cultivo a los cuales se les adicionó un agente desagregante, Tritón X-100 en concentraciones de 0.1% al 1 % v/v. Los sobrenadantes analizados correspondieron a las fases logarítmica y estacionaria del crecimiento en el medio SS libre de ciclodextrina (Tabla 10). Se eligieron estos dos períodos como primer intento para establecer si el supuesto grado de agregación varía con el crecimiento celular.

De acuerdo a los resultados obtenidos en relación a la aparición de la banda de 200 kDa en los sobrenadantes de cultivo, se esperaría que el grado de agregación fuera más alto en los sobrenadantes de fase estacionaria y consecuentemente, en ese sobrenadante el efecto del agente desagregante (en este caso Tritón) sería más pronunciado.

TABLA 10: Efecto del Tritón X-100 sobre la actividad de la adenilato ciclasa extracelular de *B. pertussis*.

SOBRENADANTE DE CULTIVO	ACTIVIDAD DE AC* EXTRACELULAR	
	FASE DEL CRECIMIENTO CELULAR LOGARITMICA ^a	ESTACIONARIA ^b
del medio SS ^c	195	380
del medio SS ^c + Tritón X-100	572	746

TABLA 10 (continuación)

Todos los resultados presentados en esta tabla son el promedio de cuatro experiencias.

* Actividad de AC extracelular: pmol AMP_C/min.ml de sobrenadante de cultivo.

a corresponde a un momento del desarrollo celular antes del máximo de actividad de AC (Hozbor y col., 1991).

b corresponde a un momento del desarrollo celular después del máximo de actividad AC (Hozbor y col., 1991).

c SS: medio sintético de Stainer-Scholte.

En estos ensayos se pudo observar que el agregado de Tritón X-100 efectivamente incrementa la actividad de AC en ambos sobrenadantes de cultivo. Sin embargo, el incremento relativo observado en la actividad de AC fue mayor en el caso del sobrenadante de fase logarítmica. Posiblemente, lo que está ocurriendo es que el grado de agregación de AC en el sobrenadante de fase estacionaria es mayor y consecuentemente requiere de otras condiciones de desagregación.

Según los resultados obtenidos en los ensayos descritos, se podría sugerir que la ciclodextrina influye en la estabilidad y/o en la formación de los agregados moleculares de AC-AC y/o AC-otra proteína y/o AC-LPS, de forma tal de incrementar la actividad biológica de dicho antígeno.

Este aspecto puede no ser mutuamente excluyente con los efectos observados en relación al lipopolisacárido; la

función propuesta para la ciclodextrina en este caso (actividad desagregante) puede estar superpuesta con la anterior (desestabilización de la membrana externa, liberación de proteínas).

Capítulo 6

La actividad de la adenilato ciclasa extracelular de *B. pertussis* decae al alcanzar la fase estacionaria del desarrollo celular en el medio sintético de Stainer-Scholte. Ni la presencia de actividad proteolítica ni un cambio de fase de una variante virulenta a una avirulenta, fueron los responsables de la pérdida de actividad observada.

El agregado de un agente complejante como la 2,6-O-dimetil- β -ciclodextrina (Me β CD) al medio SS permitió incrementar e incluso estabilizar la actividad de la AC extracelular durante la fase estacionaria del crecimiento. Este efecto resultó ser dependiente de la concentración de ciclodextrina empleada.

También se observó que la ciclodextrina incrementa la actividad de AC extracelular cuando es adicionada a sobrenadantes de cultivo libres de células. Pero este incremento es inferior al observado cuando dicho agente es incorporado desde el inicio de cultivo al medio SS. Este resultado indica que la ciclodextrina, además de activar a la adenilato ciclasa, favorece la liberación o la producción por unidad de biomasa de este antígeno.

En relación al esclarecimiento de estos aspectos (liberación o producción), se observó que en sobrenadantes de cultivo en donde la actividad de AC se ve incrementada por la presencia de ciclodextrina, también se observa un aumento en el nivel de uno de los principales componentes de membrana

externa, el lipopolisacárido (LPS). El nivel de LPS en los sobrenadantes de cultivo depende de la fase de crecimiento.

Este comportamiento similar entre la liberación del LPS y la de AC fue analizado mediante la determinación comparativa de los niveles de ambos componentes en sobrenadantes de medios de cultivo que contenían buffers que promueven o no la liberación de LPS (Vaara, 1992). Además de confirmarse la promoción de la liberación de LPS, se determinó un incremento paralelo en la liberación de AC, resultado no necesariamente esperado, a menos que ambos componentes esten comprometidos en un mismo mecanismo de liberación.

En experimentos similares empleando agentes de acción conocida sobre la liberación de LPS, nuevamente, se pudo observar un paralelismo entre el nivel de proteínas en el sobrenadante de cultivo y en la liberación de LPS.

En base a todos estos datos es posible suponer que en el caso de *B. pertussis*, ocurre uno de los mecanismos de liberación de proteínas descritos en bibliografía para otros organismos Gram-negativos, es decir liberación de proteínas a través de una desestabilización-vesicularización de la membrana externa. Siguiendo esta hipótesis, se decidió investigar la presencia de vesículas de membrana externa en sobrenadantes de cultivo empleando técnicas descritas en bibliografía. Efectivamente se pudo confirmar la presencia de las mismas en sobrenadantes de cultivo, las cuales contienen LPS. Pero lo más importante, es que en dichas vesículas se

pudo determinar la presencia de AC.

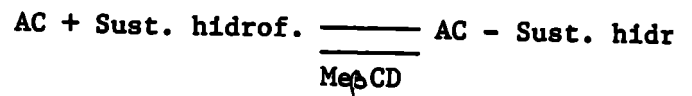
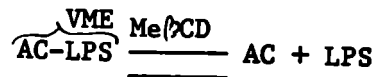
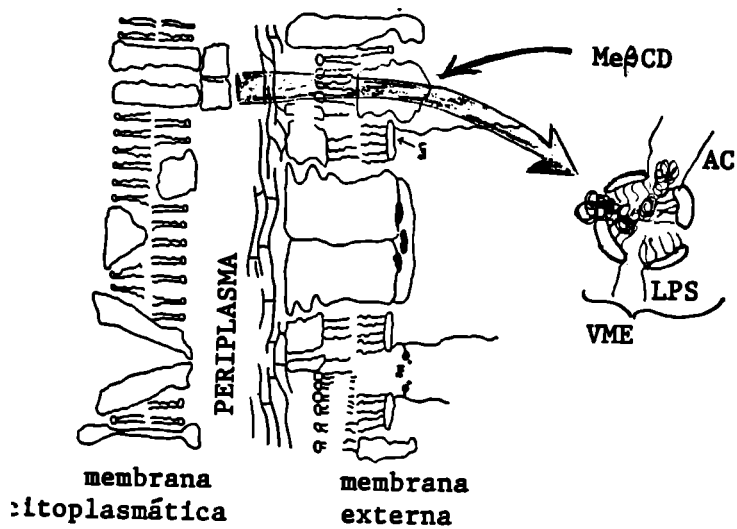
Todos estos datos sugieren un posible mecanismo de liberación al medio extracelular de AC y su relación con la acción de la ciclodextrina. Según dicho mecanismo, la adenilato ciclasa sería liberada al medio extracelular durante el desarrollo celular mediante vesículas de membrana externa, formadas por lipopolisacáridos. La ciclodextrina, con su capacidad de formar complejos de inclusión con sustancias hidrofóbicas (quizás ácidos grasos del LPS), promovería la desestabilización-vesicularización de la membrana externa y consecuentemente, aumentaría los niveles de AC en los sobrenadantes de cultivo.

Sin embargo, ésta no parece ser la única acción de la ciclodextrina, ya que como se mencionó anteriormente, la adición de este agente a sobrenadantes de cultivo libres de células provoca un incremento en la actividad de la AC extracelular. En relación a este aspecto, se observó que en los sobrenadantes de cultivo del medio SS la adenilato ciclasa se presenta como un polipéptido de 200 kDa, además de otras formas moleculares de menor peso molecular. La aparición de esta especie molecular de AC depende de la fase de crecimiento, haciéndose notoria en la fase estacionaria del cultivo. Esta forma molecular y no las más pequeñas, presenta dominios hidrofóbicos (Glasser y col., 1991). Se ha sugerido que a través de estos dominios hidrofóbicos, la AC forma agregados moleculares con diferentes pesos moleculares y con diferentes valores de actividad específica, siendo las

formas más pequeñas las que poseen mayor actividad (Kessin y Franke, 1986; Hanski, 1989). Avalando esta posibilidad de agregación de AC, en este trabajo de Tesis, se observó que el empleo de agentes desagregantes como el Tritón X-100 incrementan la actividad de AC extracelular. En base a estos datos, es posible suponer entonces, que durante el desarrollo celular de *B. pertussis* al ir apareciendo y acumulándose la forma de 200 kDa de AC, se formen agregados moleculares con ella misma o con otra molécula hidrofóbica también presente en el sobrenadante de cultivo (LPS). De esta forma, el sitio catalítico del enzima quedaría en parte oculto y consecuentemente la actividad de AC disminuiría, en particular, durante la fase estacionaria del cultivo. Esta agregación de moléculas hidrofóbicas se vería favorecida por la naturaleza acuosa del medio extracelular.

Este fenómeno de agregación podría explicar entonces la pérdida de actividad de AC durante la fase estacionaria del crecimiento en el medio SS, antes mencionada.

En este modelo, la ciclodextrina podría influir en la estabilidad y/o en la formación de los agregados moleculares de AC, de forma tal de incrementar la actividad biológica de dicho inmunógeno. Este aspecto puede no ser mutuamente excluyente con los efectos observados en relación a la liberación LPS-proteínas; la función propuesta para la ciclodextrina en este caso (actividad desagregante) puede estar superpuesta con la anterior (desestabilización de membrana externa-liberación de proteínas) (Figura 27).



CELULAR

MEDIO EXTRACELULAR

FIGURA 27: Esquema del modelo propuesto sobre los factores que condicionan la producción y estabilidad de la AC extracelular.

Todos estos resultados ponen de relieve el empleo de la ciclodextrina en la estabilización y producción de uno de los principales antígenos protectores de *B. pertussis*, la adenilato ciclasa extracelular. Además, permiten sugerir un modelo del mecanismo de acción de dicho agente según el cual estarían involucrados: desestabilización-vesicularización de

membrana externa y desagregación AC-AC y/o AC-LPS.

Por otra parte y desde el punto de vista biotecnológico resulta necesario destacar que si bien el uso de la ciclodextrina incrementa el rendimiento de los principales antígenos solubles de *B. pertussis*, también favorece la liberación de un componente indeseable en la formulación de una vacuna, la endotoxina (LPS), considerada uno de los principales responsables de las reacciones adversas asociadas a la vacunación pertussis. Esta mayor liberación de LPS en relación al medio libre de ciclodextrina se hace significativa en la fase estacionaria del desarrollo celular. Estos datos deberían tenerse en cuenta durante la purificación de los principales antígenos de *B. pertussis* para la producción de una vacuna acelular no tóxica.

- Alonso, J., Brezín, C. y Ray, B. (1985) *Bulletin de L'Institut Pasteur* **83**, 19.
- Amano, K., Fukushi, K. y Watanabe, M. (1990) *J. Gen. Microbiol.* **136**, 481.
- An der Lan, B., Cowell, J., Burstyn, D., Manclark, C. y Chrambach, A. (1986) *Mol. Cell. Biochem.* **70**, 31.
- Arai, H. y Munoz, J. (1979) *Infect. Immun.* **25**, 764.
- Arciniega, J., Shahin, R., Burnette, N., Bartley, T., Whiteley, D., Mar, V. y Burns, D. (1991) *Infect. Immun.* **59**, 3407.
- Arai, H. y Sato, Y. (1976) *Biochem. Biophys. Acta.* **444**, 765.
- Aricó, B. y Rappuoli, R. (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 2847.
- Aricó, B., Miller, J., Roy, C., Stibitz, S., Falkow, S. Gross, R. y Rappuoli, R. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 6671.
- Armstrong, S. y Parker, C. (1986) *Infect. Immun.* **54**, 109.
- Ashworth, L., Irons, L. y Dowsett, A. (1982) *Infect. Immun.* **37**, 1278.
- Ayme, G., Caroff, M., Chaby, R., Haeffner-Cavailon, N., LeDur, M., Moreau, M., Muset, M., Mynard, M., Roumiantzeff, M., Schulz, D. y Szabo, L. (1980) *Infect. Immun.* **27**, 739.
- Badr-El-Din, M., Aref, G., Mazloum, H., El-Towesy, Y., y Kassem, A. (1976) *J. Trop. Med. Hyg.* **79**, 213.
- Bellalou, J. y Relyveld, E. (1984) *Ann. Rev. Microbiol.* **135**, 101.

- Bellalou, J., Ladant, D. y Sakamoto, H. (1990) *Infect. Immun.* **58**, 1195.
- Black, W., Munoz, J., Peacock, M., Schad, P., Cowell, J., Burchall, J., Lim, M., Kent, A., Steinman, L. y Falkow, S. (1988) *Science* **240**, 656.
- Blank, M., Schmit, J. y Privett, O. (1964) *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **41**, 371.
- Blume, H., Beier, H. y Gross, H. (1987) *Electrophoresis* **8**, 93.
- Bordet, J. y Gengou, O. (1906) *Ann. Inst. Pasteur* **20**, 731.
- Bourret, R., Hess, J., Borkovich, K., Pakula, A. y Simon, M. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 7085.
- Bray, C. (1960) *Anal. Biochem.* **p** 279.
- Brewster, M., Simpkins, Hora, M., Stern, W. y Bodor, N. (1989) *J. Parenteral Sci Technology* **43**, 231.
- Brownlie, M., Parton, R. y Coote, J. (1985) *J. Gen. Microbiol.* **131**, 17.
- Burns, D., Kenimer, J. y Manclarck, C. (1987) *Infect. Immun.* **55**, 24.
- Cadieux, L., Kuzio, J. Milazzo, F. y Kropinski, A. (1983) *J. Bacteriol.* **155**, 817.
- Cameron, J. (1976) *Adv. Appl. Microbiol.* **20**, 57.
- Carter, E. y Preston, N. (1984) *J. Med. Microbiol.* **18**, 87.
- Chaby, R. y Szabo, L. (1975) *Eur. J. Biochem.* **59**, 277.
- Charles, I., Dougan, G., Pickard, D., Chatfield, S., Smith, M., Novotny, P., Morrissey, P. y Fairweather, N. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 3554.

- Chazono, M., Yoshida, I., Konobe, T. y Fukai, K. (1988) *J. Biol. Standard.* **16**, 83.
- Cherry, J., Brunell, P., Golden, G. y Karzon, R. (1988) *Pediatrics* **81**, 939.
- Christie, W. (1973) *Lipid Anal. Pergamon Press Oxford* p 168.
- Christodoulides, F., Sidey, F., Parton, R. y Stewart-Tull, D. (1986) *Vaccine* **5**, 199.
- Cody, C., Baraff, L., Cherry, J., Marcy, S. Mamclark, C. (1981) *Pediatrics* **68**, 650.
- Cohen, S. y Wheeler, M. (1946) *Am. J. Public Health* **36**, 371.
- Collier, A. (1975) *Bacteriol. Rev.* **39**, 54.
- Collier, A., Peterson, L. y Baseman, J. (1977) *J. Infect. Dis.* **136**, 196.
- Confer, D. y Eaton, J. (1982) *Science* **217**, 948.
- Cookson, B., Cho, H., Herwaldt, A. y Woldman, W. (1989) *Infect. Immun.* **57**, 2223.
- Cowell, J., Hewlett, E. y Manclark, C. (1979) *Infect. Immun.* **25**, 896.
- Devoe, I. y Gilchrist, J. (1973) *J. Exp. Med.* **138**, 1156.
- Ehrmann, I., Gray, M., Gordon, V., Gray, L. y Hewlett, E. (1991) *FEBS* **278**, 79.
- Endoth, M., Amitani, M. y Nakase, Y. (1986) *Microbiol. Immunol.* **30**, 659.
- Escuyer, V., Duflot, E., Sezer, O., Danchin, A. y Mock, M. (1988) *Gene* **71**, 293.

- Felmlee, T., Pellett, S., Lee, E. y Welch, A. (1985) *J. Bacteriol.* **163**, 88.
- Fernández, P. y Smith, H. (1977) *J. Gen. Microbiol.* **98**, 77.
- Fine, P. y Clarkson, J. (1987) *Rev. Infect. Dis.* **9**, 866.
- Flawia, M. y Torres, H. (1972) *J. Biol. Chem.* **243**, 68.
- Folch, J., Lees, M. y Sloane-Stanley, G. (1957) *J. Biol. Chem.* **226**, 497.
- Friedman, R. (1987) *Infect. Immun.* **55**, 129.
- Friedman, R., Fiederlein, R., Glasser, L. y Galgiani, J. (1987) *Infect. Immun.* **55**, 135.
- Funkhouser, A., Wassilak, S., Hinman, A., Orenstein, W. y Mortimer, E. (1988) *Tokai, J. Exp. Clin. Med.* **13**, 111.
- Gankema, H., Wensink, J., Guinee, P., Jansen, W. y Wiholt, B. (1980) *Infect. Immun.* **29**, 704.
- García-Sainz, J., Juárez-Ayala, Jy Valles, V. (1987) *Toxicon* **25**, 603.
- Girard, R., Chaby, R. y Bordenave, G. (1981) *Infect. Immun.* **31**, 122.
- Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A. Y Danchim, A. (1988) *EMBO J.* **7**, 3997.
- Glasser, P., Munier, H., Gilles, A., Krin, E., Porumb, T., Barzu, O., Sarfati, R., Pellecuer, C. y Danchin, A. (1991) *J. EMBO* **10**, 1683.
- Goodwin, M. y Weiss, A. (1990) *Infect. Immun.* **58**, 3445.
- Goldman, W., Klapper, D. y Baseman, J. (1982) *Infect. Immun.* **36**, 782.
- Goldman, W., Kappler, D. y Baseman, J. (1982) *Infect.*

- Immun.* **36**, 782.
- Goldman, W., Hanski, E. y Fish, F. (1984) *EMBO J.* **3**, 1353.
 - Goldman, W., Collier, J., Cookson, B., Marshall, G. y Erwin, K. (1990) *Proceedings of the Sixth International Symposium on Pertussis* p 5.
 - Gorringe, A., Irons, L. y Robinson, A. (1988) *FEMS Microbiol. Letters* **55**, 315.
 - Griffiths, E. y Kreenftenber, P. (1985) *WHO* **63**, 241.
 - Gross, R. y Rappuoli, R. (1989) *J. Bacteriol.* **171**, 4026.
 - Guiso, N., Rocancourt, M., Szatanik, M. y Alonso, J. (1989) *Microb. Path.* **7**, 373.
 - Guiso, N., Szatanik, M. y Rocancourt, M. *Microb. Pathog* (en prensa).
 - Hancock, R. (1991) *AMS News* **57**, 175.
 - Hanski, E. y Farfel, Z. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 5526.
 - Hanski, E. (1989) *Trends Biochem. Sci.* **14**, 459.
 - Hausman, S., Manclark, C. Y Burns, D. (1990) *Biochem.* **29**, 6128.
 - Hewlett, E., Wolff, J. y Manclark, C. (1978) *Adv. Cyc. Nucl. Res.* **9**, 621.
 - Hewlett, E., Weiss, A., Crane, J., Pearson, R., Anderson, H., Myers, G., Evans, W., Hantske, L., Kay, H. y Cronin, M. (1985) *Develop. Biol. Standard.* **61**, 21.
 - Hewlett, E., Gordon, V., McCaffery, J., Sutherland, W. y Gray, M. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 19379.
 - Hewlett, E. y Cowell, E. (1989) *Infect. Immun.* **57**, 661.
 - Hitchcok, P. y Brown, T. (1983) *J. Bacteriol.* **154**, 269.

- Hozbor, D., Samo, A. y Yantorno, O. (1991) *World J. Microbiol. Biotech.* **7**, 309.
- Hozbor, D., Rodríguez, M., Samo, A., Lagares, A. y Yantorno, O. (1993) *Res. Microbiol. en prensa.*
- Howard, S. y Buckley, J. (1985) *J. Bacteriol.* **161**, 1118.
- Ibsen, P., Schou, C., Au-Jensen, M. y Heron, I. (1989) *J. Biol. Standrad.* **17**, 321.
- Idigbe, E., Parton, R. y Wardlaw, A. (1981) *J. Med. Microbiol.* **14**, 409.
- Imaizumi, A., Suzuki, Y., Ono, S., Sato, H. y Sato, Y. (1983_a) *J. Chem. Microbiol.* **17**, 781.
- Imaizumi, A., Suzuki, Y., Ono, S., Sato, H. y Sato, Y. (1983_b) *Infect. Immun.* **41**, 1138.
- Irons, L., Ashworth, L. y Smith, W. (1983) *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2769.
- Irvin, R., MacAlister, T. y Costerton, J. (1981) *J. Bacteriol.* **145**, 1397.
- Ishikawa, H. e Isayama, Y. (1986) *J. Cin. Microbiol.* **23**, 235.
- Ito, K., Bassford, P. y Beckwith, J. (1981) *Cell* **24**, 707.
- Janoff, A., Gupte, S. y Mggroarty, E. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **598**, 641.
- Karkhanis, Y., Zeltner, J., Jackson, J. y Carlo, D. (1978) *Anal. Biochem.* **85**, 595.
- Katada, T. y Ui, M. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7210.
- Kaslow, H., Schlotterbeck, J., Mar, V. y Burnette, W. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 6386.

- Kaslow, H., Lim, L., Moss, J. Y Lesikar, D. (1987) *Biochem.* **26**, 123.
- Kawai, Y. (1985) *Develop. Biol. Standard.* **61**, 249.
- Kendrick, P. Eldering, G., Dixon, M. y Misner, J. (1947) *Am. J. Public Health* **37**, 803.
- Kessin, R. y Franke, J. (1986) *J. Bacteriol.* **166**, 290.
- Kimura, A., Mountzouros, K., Relman, D., Falkow, S. y Cowell, J. (1990) *Infect. Immun.* **58**, 7.
- Knapp, S. y Mekalanos, J. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 5059.
- Kobisch, M. y Novotny, P. (1990) *Infect. Immun.* **58**, 352.
- Kondo, H., Nakatani, H. y Hiromi, K. (1976) *Carbohydr. Res.* **52**, 1.
- Kume, K., Nakai, T., Samjima, Y. y Sugimoto, C. (1986) *Infect. Immun.* **52**, 370.
- Lacey, B. (1960) *J. Hyg.Camb.* **52**, 273.
- Laemmli, U. (1970) *Nature (London)* **227**, 680.
- Lane, A. (1968) *Appl. Microbiol.* **16**, 1400.
- Ladant, D., Brezin, C., Alonso, J., Crenon, I. y Guiso, N. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 16264.
- Ladant, D. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 2612.
- Le Dur, A., Chaby, R. y Szabó, L. (1980) *J. Bacteriol.* **143**, 78.
- Leininger, E., Roberts, M., Kenimer, J., Charles, I., Fairweather, N., Novotny, P. y Brennan, M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 345.
- Leininger, E., Probst, P., Brennan, M. y Kenimer, J. (1993) *FEMS Microbiol. Lett.* **106**, 31.

- Livey, I., Parton, R. y Wardlaw, A. (1978) *FEMS. Microbiol. Lett.* **3**, 203.
- Livey, I. y Wardlaw, A. (1984) *J. Med. Microbiol.* **17**, 91.
- Locht, C. y Cabezon, T. (1990) *Proceedings of the Sixth International Symposium on Pertussis* p 41.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A. y Randall, R. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265.
- Ludwig, A., Jarchau, T., Benz, R., Goebel, W. (1988) *Mol. Gen. Genet.* **214**, 553.
- Manclark, C. y Burns, D. (1985) *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* **136B**, 323.
- Marchitto, K., Munoz, J. y Keith, J. (1987) *Infect. Immun.* **55**, 1309.
- Masure, H., Oldenburg, D., Donovan, M., Shattuck, R. y Storm, D. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 6933.
- Masure, H. y Storm, D. (1989) *Biochem.* **28**, 438.
- Matsuyama, T. (1977) *J. Infect. Dis.* **136**, 609.
- Meade, B., Kind, P. y Manclark, C. (1984) *Infect. Immun.* **46**, 733.
- Melton, A. y Weiss, A. (1989) *J. Bacteriol.* **171**, 6206.
- Mooi, F., van der Heide, H., ter Avest, A., Welinder, K., Livey, I., van der Zeijst, B. y Gaastra, W. (1987) *Microb. Pathogen.* **2**, 473.
- Monack, D., Munoz, J., Peacock, M., Black, W. y Flakow, S. (1989) *J. Infect. Dis.* **159**, 205.
- Moreau, M., Chaby, R. y Szabó, L. (1984) *J. Bacteriol.* **159**, 611.

- Morishita, R., Kato, K. y Asano, T. (1988) *Eur. J. Biochem.* **174**, 87.
- Morse, S. y Morse, J. (1976) *J. Exp. Med.* **143**, 1483.
- Mortimer, E. (1990) *J. Infect. Dis.* **161**, 473.
- Moss, J., Stanley, S., Watkins, P., Burns, d., Manclarck, C., Kaslow, H. y Hewlett, E. (1986) *Biochem.* **25**, 2720.
- Munoz, J., Arai, H., Bergman, R. Y Sadowski, P. (1987) *Infect. Immun.* **33**, 820.
- Munoz, J., Peacock, M. y Hadlow, W. (1987) *Infect. Immun.* **55**, 1004.
- Musser, J., Hewlett, E., Pepler, M. y Selander, R. (1986) *J. Bacteriol.* **166**,230.
- Nakamura, T. y Ui, M. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 3584.
- Nicosia, A. y Rappuoli, R. (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 2843.
- Nikolajewski, H., Liepert, H., Nikolajewski, G., Pfuller, U., Swidsinski, S. y Wettig, G. (1990) *Biologicals* **18**, 305.
- Okajima, F. y Ui, M. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 13863.
- Onoue, K., Kitagawa, M. y Yamamura, Y. (1963) *J. Bacteriol.* **86**, 648.
- Opremcak, L. y Rheins, M. (1983) *Can. J. Microbiol.* **29**, 415.
- Parker, C. (1976) *Adv. Appl. Microbiol.* **20**, 27.
- Parton, R. y Durham, J. (1978) *FEMS Microbiol. Lett.* **4**, 287.
- Pearson, R., Symes, D., Conboy, M., Weiss, A. y Hewlett, E. (1987) *J. Immunol.* **139**, 2749.
- Pepler, M. (1984) *Infect. Immun.* **43**, 224.

- Perera, V., Wardlaw, A. y Freer, J. (1987) *J. Gen. Microbiol.* **133**, 2427.
- Peter, G., Giebenk, G., Hall, C. y Plotkin, S. (1986) *Informe del Comité de Enfermedades Infecciosas de la American Academy Pediatrics* **20^a** ed, Red Book.
- Pittman, M., Furman, B. y Wardlaw, A. (1980) *J. Infect. Dis.* **142**, 56.
- Poolman, J., Hamstra, H., Barlow, A., Kuipers, B., Loggen, H. y Nagel, J. (1990) *Proceedings of the Sixth International Symposium on Pertussis* p 148.
- Preston, N., Zorgani, A. y Carter, E. (1990) *J. Med. Microbiol.* **32**, 63.
- Pugsley, A., Chapon, C. y Schwartz, M. (1986) *J. Bacteriol.* **166**, 489.
- Ragnhild, A., Lothe, L., Oddvar, F., Gudmund, W. y Unn, K. (1985) *J. Biol. Standard.* **13**, 129.
- Raptis, A., Knipling, L. y Wolff, J. (1989) *Infect. Immun.* **57**, 1725.
- Redhead, K. (1983) *FEMS Microb. Lett.* **17**, 35.
- Redhead, K. (1985) *J. Med. Microbiol.* **19**, 99.
- Redhead, K., Robinson, A., Ashworth, L. y Melville-Smith, M. (1987) *J. Biol. Stand.* **15**, 341.
- Relman, D., Domenighini, M., Tuomanen, E., Rappuoli, R. Y Falkow, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 2637.
- Relman, D., Tuomanen, E., Falkow, S., Golenbock, D., Saukkonen, K. y Wrigth, S. (1990) *Cell* **61**, 1375.
- Relman, D., Wright, S., Falkow, S., Saukkonen, K. y

- Tuomanen, E. (1990) *Proceedings of the Sixth International Symposium on Pertussis* p 91.
- Rodbell, M. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 5744.
 - Robinson, A. Gorringer, A., Irons, L. y Keevil, C. (1983) *FEMS. Microbiol. Lett.* **19**, 105.
 - Robinson, A. e Irons, L. (1983) *Infect. Immun.* **40**, 523.
 - Robinson, A., Ashworth, L., Baskerville, A. e Irons, L. (1985_a) *Develop Biol. Stand.* **61**, 165.
 - Robinson, A., Irons, L. y Ashworth, l. (1985_b) *Vaccine* **3**, 11.
 - Robinson, A., Duggleby, C., Gorringer, A. y Livey, I. (1986) *Special Publications of the Society for General Microbiology. Vol 19*, chapter 9, p 147.
 - Rogel, A., Farfel, Z., Goldshmidt, S., Shiloach, J. y Hanski, E. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 13310.
 - Rogel, A., Meller, R. y Hanski, E. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 3154.
 - Ronson, C., Nixon, B. y Ausubel, F. (1987) *Cell* **49**, 579.
 - Salmond, G. y Reeves, P. (1993) *Trends Biochem. Sci.* **18**, 7.
 - Sato, Y., Kimura, M. y Fukumi, H. (1984) *The Lancet* **21**, 122.
 - Sato, H. y Sato, Y. (1984) *Infect. Immun.* **46**, 415.
 - Scarlato, V., Aricó, B., Domenighini, M. y Rappuoli, R. (1993) *BioEssays* **15**, 99.
 - Schneider, D. y Parker, C. (1982) *Infect. Immun.* **38**, 548.
 - Sekura, R., Fish, F., Manclarck, C., Meade, B. y Zhang, Y. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 14647.

- Selmer, J., Larsen, F., Hertz, J. y Parton, R. (1984) *Acta Path. Microbiol. Immunol.* **92**, 279.
- Shahin, R., Brennan, M., Li, Z., Meade, B. y Manclark, C. (1990) *J. Exp. Med.* **171**, 63.
- Shinitzky, M. y Barenholz, Y. (1976) *Biochem.* **15**, 4521.
- Shnaitman, C. (1971_a) *J. Bacteriol.* **108**, 545.
- Shnaitman, C. (1971_b) *J. Bacteriol.* **108**, 553.
- Stainer, D. y Scholte, M. (1971) *J. Gen. Microbiol.* **63**, 211
- Starkloff, A. y Szabó, L. (1986) *J. Gen. Microbiol.* **132**, 97.
- Steinman, L., Sriram, S., Adelman, N., Zamvil, S., McDevitt, H. y Urich, H. (1982) *Nature (London)* **299**, 738.
- Stell, R. y Torrie, J. (1980) *Principles and Procedures of Statics: a biometrical approach, 2 nd ed., p. 176.* McGraw Hill Book Co., New York.
- Steven, A. Bisher, M., Trus, B., Thomas, D., Zhang, J. y Cowell, J. (1986) *J. Bacteriol.* **167**, 968.
- Stibitz, S., Aaronson, W., Monack, D. y Falkkow, S. (1989) *Nature (London)* **338**, 226.
- Sultzer, B. y Nilsson, B. (1972) *Nature (London)* **240**, 198.
- Suzuki, Y., Imaizumi, A., Ginaga, A., Sato, H. y Sato, Y. (1985) *Dev. Biol. Stand.* **61**, 89.
- Syukuda, Y., Watanabe, H., Suehara, A., Fujii, S., Kuno Sakai, H. y Kimura, M. (1988) *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **13**, 71.
- Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M. y Ishii, S. (1982) *Biochem.* **21**, 5516.

- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 4350.
- Tsuchiya, H., Sato, M., Kanematsu, N., Kato, M., Hishino, Y., Takagi, N. y Namikawa, I. (1987) *Lett. App. Microbiol.* **5**, 15.
- Tsuchiya, M., Bliziote, M., Serventi, I., Russ Price, S., Avigan, J., Murtagh, J., Stevens, L., Angus, C., Walker, M., Newman, K., Halpern, J., Tsai, S., Moss, J. y Vaughan, M. (1990) *Proceedings of the Sixth International Symposium on Pertussis* p 57.
- Tuomanen, E. y Hendley J. (1983) *J. Infect. Dis.* **148**, 125.
- Tuomanen, E., Nedelman, J, Hendley, J. y Hewlett, E. (1983) *Infect. Immun.* **42**, 692.
- Tuomanen, E. (1986) *Infect. Immun.* **54**, 905.
- Ui, M. (1984) *Trends Pharm. Sci.* **5**, 277.
- Urisu, A., Cowell, J. y Manclark, C. (1986) *Infect. Immun.* **52**, 695.
- Vaara, M. (1992) *Microbiol. Rev.* **56**, 395.
- Wardlaw, A., Parton, R. y Hooker, M. (1976) *J. Med. Microbiol.* **9**, 89.
- Wardlaw, A. y Parton, R. (1983) *Med. Microbiol.* **2**, 207.
- Watanabe, M. y Nakase, Y. (1982) *Infect. Immun.* **35**, 1018.
- Watanabe, M., Takimoto, H., Kumazawa, Y. y Amano, K. (1990) *J. Gen. Microbiol.* **136**, 489.
- Weiss, A., Hewlett, E., Myers, G. y Falkow, S. (1983) *Infect. Immun.* **42**, 33.
- Weiss, A., Hewlett, E., Myers, G. y Falkow, S. (1984) *J.*

- Infect. Dis.* **150**, 219.
- Weiss, A. y Falkow, S. (1984) *Infect. Immun.* **43**, 263.
 - Weiss, A. y Hewlett, E. (1986) *Ann. Rev. Microbiol.* **40**, 661.
 - Weiss, A. y Goodwin, M. (1989) *Infect. Immun.* **57**, 3757.
 - Weiss, A., Melton, A., Walker, K., Andraos-Selim, C. y Meidl, J. (1989) *Infect. Immun.* **57**, 2674.
 - Westphal, O. y Jann, K. (1965) *Meth. Carbohydr. Chem.* **5**, 83.
 - Willems, R., Paul, A., van der Heide, H., ter Avest, A. y Mooi, F. (1990) *EMBO J.* **9**, 2803.
 - Wolff, J. y Cook, G. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 350.
 - Wolfrey, B. y Moody, J. (1991) *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 243.