

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

Tesis Doctoral

Caracterización fenotípica de *Bordetella pertussis*
creciendo en *biofilm*. Desde la proteómica al
reconocimiento molecular de factores de virulencia

Lic. Laura Arnal

Dr. Osvaldo M. Yantorno

Director

Dra. María E. Vela

Co-Directora

2014

Indice general

Capítulo I

Introducción General.....9

Capítulo II

Estudios comparativos sobre la capacidad de formación de *biofilm* por parte de aislados clínicos locales y la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I. Empleo de proteómica comparativa y análisis de expresión génica mediante real time PCR46

Capítulo III

Estudio de la presencia de factores de virulencia en la superficie de células individuales de *B. pertussis*. Introducción a la Microscopía de Fuerza Atómica.....95

Capítulo IV

Estudio de las propiedades nanomecánicas de cubierta de la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I asociados a la presencia de la proteína FHA..... 118

Capítulo V

Experimentos de Reconocimiento Molecular para determinar la localización espacial de la adhesina FHA sobre la superficie de células de *B. pertussis*.....146

Capítulo VI

Conclusiones Generales y Perspectivas..... 188

DEDICATORIA

A Luciano, mi compañero, que siempre estuvo a mi lado

A mi mamá y a mi papá por creer siempre en mí,

A mi hermana, Eugenia, por apoyarme desde el comienzo de mi carrera

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FUE REALIZADO EN EL CENTRO DE INVESTIGACIONES EN FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CINDEFI) Y EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FISICOQUIMICAS TEORICAS Y APLICADAS (INIFTA), CONICET, FACULATD DE CIENCIAS EXACTAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA. BAJO LA DIRECCION DEL DR. OSVALDO M. YANTORNO Y LA DRA. MARIA E. VELA.

PARTE DE LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS HAN SIDO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION O SE ENCUENTRAN EN REVISIÓN EN LOS SIGUIENTES ARTÍCULOS:

Publicado de revista Langmuir año 2012:

Arnal, L; Serra, D. O.; Cattelan, N.; Castez, M. F.; Vazquez, L.; Salvarezza, R. C.; Yantorno, O. M. and Vela, M. E. Adesin contribution to nanomechanical properties of virulent *Bordetella pertussis* envelope. Langmuir 2012, 28, 19: 7471-9.

En revisión actualmente, revista Nanoscale:

Arnal, L Longo. G.; Castez, M. F.; Cattelan,; Salvarezza, R. C.; Yantorno, O. M.; Kasas S. and Vela, M. E. Localization of adhesins in the surface of pathogenic bacterial envelope through atomic force microscopy (NR-ART-08-2014-004997)

MI RECONOCIMIENTO:

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas otorgadas, que posibilitaron la realización de esta tesis.

Al Centro de Investigaciones y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) y al Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) que me permitieron utilizar sus instalaciones y equipamiento para la realización de los experimentos de esta tesis.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación Argentina y a los ministerios de Educación de Alemania y de la República de Austria por haberme otorgado dos becas de intercambio para realizar parte de los experimentos de esta tesis.

Al Departamento de Microbiología de la Universidad Tecnológica de Munich, Alemania y al Departamento de Microbiología Funcional de la Universidad de veterinaria de Viena, Austria, ambos a cargo de la Dra. Monika Eling-Schulz por haberme brindado la posibilidad de realizar pasantías de investigación en sus instalaciones.

Al Laboratorio de Biofísica de la Escuela Politécnica de Lausanne, Suiza, por haberme brindado la posibilidad de realizar una estadía en sus laboratorios.

La realización de esta tesis no hubiera nunca sido posible sin la colaboración y el apoyo de muchas personas e instituciones. Por suerte tengo la necesidad de agradecer a muchas personas, investigadores, amigos y colegas, es por esto que quiero utilizar este espacio para expresar mi profundo agradecimiento:

Al Dr. Osvaldo Yantorno, por darme la posibilidad de comenzar junto a él mi experiencia en el mundo de la Ciencia y la Investigación y haber aceptado ser mi director de Tesis Doctoral. Por haber confiado en mí y haberme apoyado en cada una de mis experiencias. Por haber generado un ambiente de discusión abierta y haberme acompañado cuando las cosas no salían tan bien!

A la Dra. Maria E. Vela, por haber aceptado ser mi co-directora y haberme enseñado tanto a lo largo de estos años. No solo aprendí mucho de ella a nivel académico sino también me ha enseñado mucho a través de su calidad humana y buena predisposición. Le agradezco inmensamente por su infinita bondad y compañerismo.

Al Dr. Diego O. Serra por haberme acompañado en los primeros años de mi desarrollo en el campo de la investigación y haberme enseñado a trabajar de manera ordenada y sistemática, su aporte ha sido determinante en mi trabajo de tesis.

Al Dr. Luis Vazquez Burgos por su enorme ayuda y colaboración, por haberme acompañado en el duro comienzo de mi trabajo con el Microscopio de Fuerza Atómica, por su comprensión y buena predisposición y por su enorme humildad para compartir su sabiduría.

Al Dr. Sandor Kasas, por haber confiado en mí y haber compartido conmigo toda su experiencia en el campo del estudio de materia viva a través de la Microscopía de Fuerza Atómica. Por su calidad humana y su enorme capacidad para enseñar. Su colaboración a este trabajo de tesis cambió radicalmente su contenido.

A la Dra. Monika Elingh-Schulz, quien ha sido un aporte académico muy importante y quien me ha enseñado y ayudado en la realización de los experimentos de biología molecular.

Al Dr. Federico Castez, por su infinita ayuda en el análisis de mis datos experimentales y por su bondad y compañerismo. Tengo mucha suerte de haberlo cruzado en mi camino ya que es una de las personas más amables y comprensivas que he conocido.

A los Dres. Edgardo Donati y Roberto Salvarezza por haberme dado la libertad de utilizar las instalaciones y equipamientos de los institutos y laboratorios que dirigen.

Al Dr. Mario Aguilar, quien me permitió utilizar los equipos de su laboratorio durante mis experimentos.

A Julio Figari, por su invaluable colaboración y su profunda amistad, por ayudarme desde mis comienzos y por los mates y las charlas que tanto bien me han hecho siempre.

Al Dr. Giovanni Dietler por haberme dado el apoyo económico para realizar una estadía en su laboratorio y por haberme brindado tanta calidez humana. A los Dres. Giovanni Longo, Tom Grunert y a la Dra. Genia Lucking por haberme ayudado en mis etapas de intercambio, por haberme enseñado tanto y con tanta paciencia. Por haber confiado en mí y haberme acompañado en mis momentos de soledad.

A mis compañeros y amigos de los laboratorio 2 del CINDEFI y del grupo de Nanotecnología del INIFTA, quienes me han acompañado durante estos 5 años, con quien he compartido charlas, mates, experiencias y una profunda amistad:

Gracias Jime, Naty, Huguito, Yani, Clau, Pablo, Brenda, Juano, Hila, Ceci, Eva, Conie, Emilia, Emiliano, Doris, Ana, Caro Vericat y Caro Diaz, Patri, Yamil, Flavia, Anto, Tati, Mati, Alejandro Mignan y Alejandro Ramirez, Diego y Julie por haberme acompañado durante todos estos años y haberme brindado su amistad y tantísimos buenos momentos, por ser tan buenos compañeros y por ser la principal razón por la que disfruté tanto de estos años de trabajo.

Agradezco profundamente a mi familia, a mi mama Verónica, a mi papa, Hugo y a mi hermana y amiga Eugenia. Siempre confiaron en mí y me acompañaron durante este largo camino, los amo! También quiero agradecer a mi familia política que me ha acompañado en mi etapa de doctorado y quienes me han adoptado como una hija y hermana, los quiero mucho.

Por último quiero expresar mi profundo y sincero agradecimiento a Lucho, el amor de mi vida, mi compañero, quien me ha brindado todo su amor durante todos estos años y con quien he compartido los momentos más importantes de mi vida. Gracias por tu paciencia y tu entendimiento.

Capítulo I

Introducción General

Índice

I-INTRODUCCIÓN GENERAL.....	11
I.1 Tos convulsa	11
I.1.1 Marco teórico de la enfermedad y vacunación.....	11
I.1.2 Incidencia mundial de pertussis y la situación en nuestro país	12
I.1.3 Re-emergencia.....	14
I.1.4 Cuadro clínico	15
I.1.5 El género <i>Bordetella</i>	16
I.1.5.1 Sistema de regulación BvgAS y fases de virulencia de <i>B. pertussis</i>	17
I.1.5.2 Factores de virulencia.....	19
I.1.6 Patogénesis.....	23
I.1.6 Diagnóstico, tratamiento y vacunación.....	24
I.2 Biofilms microbianos	27
I.2.1 El concepto que revolucionó la microbiología	27
I.2.2 Etapas de formación de <i>biofilm</i>	29
I.2.3 Características estructurales y regulación de los procesos de formación de <i>biofilm</i>	31
I.2.7 Impacto de los <i>biofilms</i> en el área de salud	35
I.2.7 El <i>biofilm</i> de <i>B. pertussis</i>	36
1.4 OBJETIVOS GENERALES DEL TRABAJO DE TESIS	39
I.5 BIBLIOGRAFÍA	40

I-INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1Tos convulsa

I.1.1 Marco teórico de la enfermedad y vacunación.

La tos convulsa o pertussis es una enfermedad altamente contagiosa causada por bacterias Gram-negativas del género *Bordetella* que afecta el tracto respiratorio humano. Dentro de este género, las especies que han sido asociadas a la enfermedad son: *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*, *B. holmesii* y *B. pertussis* (1). Esta última es la especie que presenta mayor morbilidad y mortalidad y cuyo único reservorio conocido hasta el presente es el ser humano. La enfermedad se transmite a través de la inhalación de micro gotas provenientes del estornudo o tos de una persona infectada. Fue descrita en 1578 por Baillou luego de una epidemia en Paris (2) y tiene una de las más altas tasas de mortalidad dentro de las enfermedades inmuno-prevenibles. La enfermedad ha recibido diversos nombres según el país y la época (tos ferina, tos de barbilla, coqueluche, pertussis) aunque en la actualidad, en nuestro país se la denomina comúnmente tos convulsa, haciendo alusión a los intensos episodios de tos que la caracterizan. Si bien el agente etiológico fue detectado por primera vez en 1900 a través de la observación microscópica del esputo de un paciente infectado, fue en 1906 que Bordet y Gengou lograron el primer aislamiento de estas bacterias (3). A partir de este momento y debido a la severidad de la enfermedad que afectaba a infantes es que se comenzaron los estudios para desarrollar vacunas que la previnieran. Entre los años 1914 y 1923, Hess, Luttinger y Madsen realizaron los primeros ensayos de vacunación anti-pertussis (4). La primera vacuna introducida en la comunidad contenía células de *Bordetella pertussis* inactivadas y comenzó a utilizarse en Estados Unidos en la década de 1940. La vacunación fue posteriormente aceptada y aplicada en el resto del mundo en la década de 1950. El uso masivo de vacunas resultó muy positivo ya que se tradujo en una importante reducción de la incidencia de la enfermedad a nivel mundial. Sin embargo, problemas asociados a la reactogenicidad de las vacunas elaboradas con células enteras promovieron en la década de 1980 el desarrollo de formulaciones acelulares compuestas por antígenos purificados. A partir de ese momento y con el objetivo de disminuir la reactogenicidad de las vacunas disponibles en el mercado es que se dedicó un gran esfuerzo al desarrollo de formulaciones integradas por distintos factores de virulencia, las cuales fueron introducidas al mercado a partir del año 1981 en Japón. Posteriormente, estas vacunas fueron adoptadas

por otros países, donde las distintas empresas realizaron modificaciones en cuanto a su composición (5).

I.1.2 Incidencia mundial de pertussis y la situación en nuestro país

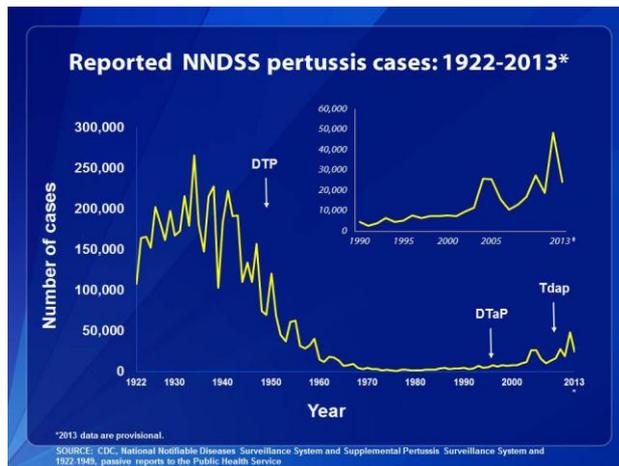
La tos convulsa es una enfermedad altamente contagiosa, presente en todo el mundo con picos de incidencia cada 3 a 5 años, y con aumentos estacionales en verano y otoño. La enfermedad afecta principalmente a niños de hasta 5 años y el mayor riesgo de mortalidad lo presentan el grupo de niños menores a 6 meses (6), en particular los no vacunados o con esquemas de vacunación incompletos. Por la severidad de la enfermedad y su alta mortalidad es que desde las organizaciones de control de la salud se recomienda poner especial atención en lograr un diagnóstico certero y rápido así como también en el manejo de la epidemiología de los casos confirmados de pertussis para detectar posibles epidemias (7).

En la era pre-antibiótica y pre-vacunal, tanto los casos de enfermedad como las muertes derivadas de la misma eran muy altos. En Estados Unidos, donde se encuentran las mejores estadísticas para esta enfermedad, se registraron durante las décadas de 1920 y 1930, 175.000 casos de pertussis y 8000 muertes (8). La incidencia anual de la enfermedad era de 175 casos cada 100.000 habitantes. Luego de la introducción de la vacuna celular, estos números disminuyeron drásticamente (Fig.1), llegando a reportarse sólo 1 caso de pertussis cada 100.000 habitantes en el año 1976. Sin embargo, a pesar del sostenido incremento en las tasas de vacunación a nivel mundial, en los últimos 20 años se ha reportado un notable aumento en los casos de tos convulsa, llevando a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a declarar la enfermedad como re-emergente. La misma organización ha reportado en los últimos años entre 30 y 50 millones de casos anuales de pertussis incluyendo entre 200.000 y 400.000 casos con desenlace fatal. Asimismo, ha declarado que la enfermedad se encuentra en el quinto puesto como causa de mortalidad dentro de las enfermedades inmuno-prevenibles.

Concomitantemente con la re-emergencia de la enfermedad, existe un aumento importante en la cantidad de casos reportados en pacientes adolescentes y adultos, registrándose en ellos manifestaciones clínicas atípicas que evidencian la persistencia de la bacteria en su hospedador (9). Según los datos publicados por el proyecto EUVAC-NET en Europa existe un incremento del 115% en el número de casos de pertussis en pacientes mayores de 14 años en el período 1998-2002 (10). De la misma manera, el Centro de Control de Enfermedades

de los Estados Unidos (CDC), ha documentado un incremento en los casos de pertussis en pacientes de entre 10 y 19 años que pasó de 5,5 casos cada 100.000 a 10,9 casos cada 10.000 habitantes. Estos datos han llevado a pensar que la enfermedad es también endémica en adolescentes y adultos. El cambio en la prevalencia hacia individuos de mayor edad es un hecho que se observa en todo el mundo y que ha caracterizado el resurgimiento de la tos convulsa (Figura 1) (11, 12).

A



B

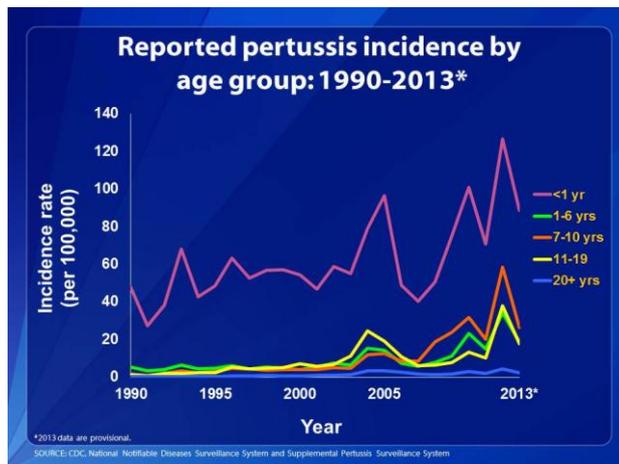


Figura 1. (A) Casos de pertussis reportados en Estados Unidos donde se muestra la introducción de los diferentes tipos de vacunas. (B) Incidencia cada 100.000 habitantes para el período 1990-2013 en relación a los diferentes grupos etarios en Estados Unidos. Fuente: CDC/EEUU.

Particularmente en nuestro país existen datos epidemiológicos sobre pertussis recién a partir del año 1969. Desde ese momento y hasta el año 2000 se observó un marcado descenso de la cantidad de casos declarados aunque se observaron picos de incidencia cada 3 años (13). Mientras que en el año 1976, la tasa de incidencia era de 166 casos cada 100.000 habitantes, en el año 2000 llegó a ser de 1,56 casos cada 100.000 habitantes. Sin

embargo, a partir del año 2003, se comenzó a registrar nuevamente un incremento en los casos de tos convulsa en nuestro país (14), que fue aumentando año tras año hasta llegar a reportarse casi 400 casos de pertussis en 2013, como puede observarse en la Figura 2. La mayor tasa de notificación se mantuvo dentro de la población correspondiente a menores de 6 meses, con calendario de vacunación incompleto, aunque en concordancia con lo que ocurrió a nivel mundial, se detectó un aumento creciente en los casos de coqueluche en adolescentes y adultos (15). En el año 2009 se actualizó el calendario de vacunación en nuestro país haciéndose obligatoria la aplicación de una dosis de refuerzo para pertussis utilizando la vacuna acelular. Sin embargo, a pesar de lo acertado de esta medida, los casos informados han continuado incrementándose.

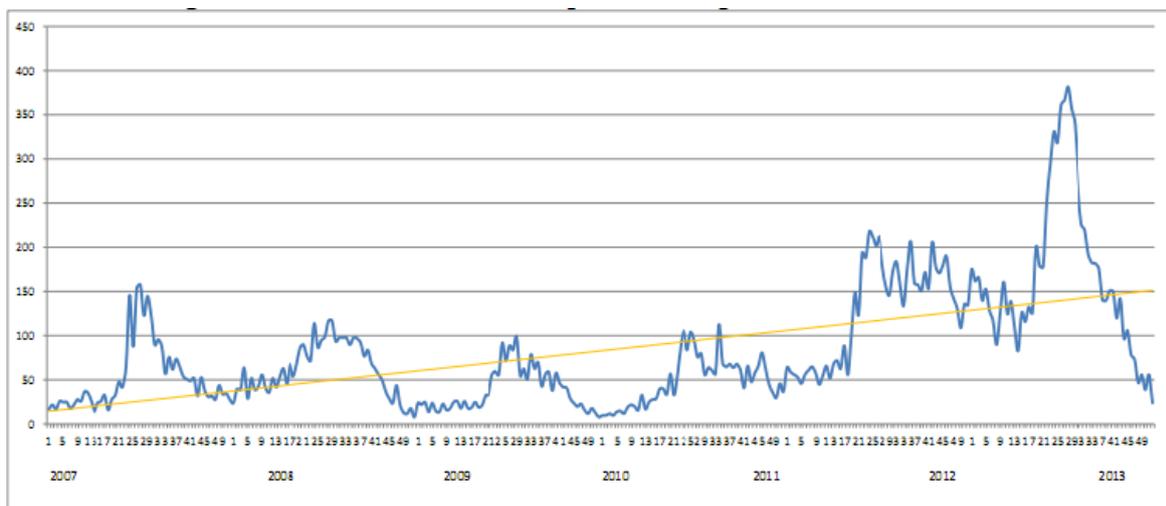


Figura 2. Gráfico de casos de pertussis notificados en nuestro país durante el período 2007-2013.

(www.msa.gov.ar)

I.1.3 Re-emergencia

Las causas que permitirían explicar la re-emergencia de la enfermedad a nivel mundial se han adjudicado a un conjunto de factores que confluyeron para generar la situación actual. Dentro de estos factores de influencia global se pueden incluir los siguientes:

- La reducida duración de la inmunidad conferida por la vacunación. Se estableció que luego de 5-8 años del último refuerzo de la vacuna los niveles de protección disminuyen considerablemente (16).
- La relativa eficiencia de las vacunas actuales, que se considera entre un 70 y un 90% (17).
- La aparición y selección de variantes antigénicas en organismos circulantes de *B. pertussis* que difieren de las cepas utilizadas para la producción de la vacuna (18).

Otros factores que pueden influir son

- La posible baja cobertura de vacunación.
- La baja eficiencia de los sistemas de vigilancia epidemiológica establecidos.

Es importante destacar que las vacunas actuales previenen el desarrollo de la enfermedad pero no la infección. Esto se debe a que la eficacia de las vacunas es inferior a la proporción crítica de inmunización necesaria para bloquear la transmisión (19). Se piensa que ésta puede ser una explicación a las infecciones y re-infecciones que sufren adolescentes y adultos vacunados, que muchas veces no presentan el cuadro agudo característico de la enfermedad, sino que probablemente manifiesten un cuadro sintomatológico leve aunque persistente o incluso llegan a cursar una infección asintomática. Numerosos estudios indican que estos grupos infectados y difíciles de diagnosticar actuarían como un reservorio del patógeno, incrementando sensiblemente el riesgo de contagio a los niños pequeños o infantes no vacunados, hecho que favorecería la circulación de la bacteria en la comunidad (9, 20, 21).

I.1.4 Cuadro clínico

Las manifestaciones clínicas de una infección con *B. pertussis* pueden variar dependiendo de la edad del paciente, de su historial de vacunación y de su condición previa de salud. En un desarrollo agudo típico de la enfermedad se pueden observar tres etapas; una primera fase de incubación, que puede durar entre 3 y 15 días, en la cual el riesgo de contagio es muy alto. Esta etapa se caracteriza por la presencia de síntomas inespecíficos como estornudos, rinorrea, enrojecimiento de ojos y fiebre leve. Luego de esta primera fase se comienza con una tos leve y persistente (segunda etapa), donde se observa un incremento de la intensidad de la tos hasta convertirse en crisis importantes con vómitos, convulsiones y hemorragias subconjuntivales. La fiebre raramente se asocia a esta etapa, que puede durar entre 1 y 4 semanas. Posteriormente comienza la fase de convalecencia (etapa tres) que dura aproximadamente entre 1 y 3 meses, que transcurre con disminución gradual de los episodios de tos. En neonatos e infantes muy pequeños, la enfermedad puede manifestarse con crisis de apnea y cianosis en lugar de los episodios de tos característicos. En esta etapa pueden observarse a su vez complicaciones como neumonía, neumotórax, hipertensión pulmonar severa y encefalopatías (21).

Existen otros cuadros, principalmente asociados a infecciones en adultos o individuos vacunados, que presentan una enfermedad clínicamente mucho menos severa, que cursa

con una sintomatología fácilmente confundible con otras patologías respiratorias como el asma (22). En estos casos se observa tos prolongada pero sin presencia de vómitos o chillidos respiratorios.

I.1.5 El género *Bordetella*

Los integrantes del género *Bordetella* son β -proteobacterias de la familia Alcaligenaceae. Son cocobacilos Gram-negativos de pequeño tamaño. Todos son aerobios estrictos (con la excepción de *B. petrii*) y muchas de las especies son fastidiosas para crecer bajo condiciones de laboratorio. El género *Bordetella* está compuesto por 9 especies a saber: *B. pertussis* (Figura3), *B. parapertussis_{hu}* (adaptada a humanos), *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis_{ov}* (adaptada a ovejas) (23, 24), *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum* y *B. petrii*. Las especies *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* son las más estrechamente relacionadas. *B. parapertussis* causa infecciones en humanos con sintomatología similar a *B.pertussis*. *B. bronchiseptica* fue primeramente descrita como un patógeno de animales, aunque actualmente se conoce que también puede producir enfermedades respiratorias en el ser humano (25, 26). Varios estudios sugieren que *B. bronchiseptica* es la especie evolutivamente más cercana a un ancestro común de estas especies y que las dos especies adaptadas al ser humano, *B. pertussis* y *B. parapertussis*, evolucionaron independientemente a partir de linajes diferentes de *B.bronchiseptica* (1).

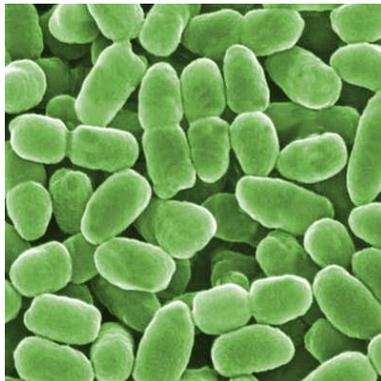


Figura 3. Imagen de microscopía electrónica del coco-bacilo Gram-negativo

Bordetella pertussis. (Imagen tomada de:

<http://www.microbiologybytes.com/blog/2012/10/page/2/>)

I.1.5.1 Sistema de regulación BvgAS y fases de virulencia de *B. pertussis*

Los organismos patógenos poseen una gran variedad de factores de virulencia que les permiten colonizar un tejido blanco y generar un proceso infeccioso. En su interacción con el hospedador, estos organismos utilizan diferentes sistemas de regulación que les permiten sentir el medio ambiente fisicoquímico en el que se encuentran y regular la expresión de un conjunto de factores de virulencia. En el caso de *B. pertussis*, se han reportado varios mecanismos de regulación aunque el más ampliamente estudiado y que regula la expresión de la mayoría de los factores de virulencia conocidos es el sistema de dos componentes denominado BvgAS (del inglés, *Bordetella virulence gene activator/sensor*) (27). Entre los factores de virulencia que regula este sistema se encuentran adhesinas, sistemas de secreción, toxinas y autotransportadores.

El sistema de regulación está compuesto por dos proteínas, una proteína híbrida sensora (BvgS), que se encuentra anclada a la membrana y que posee un dominio extracelular que sensa el entorno, seguido de dos dominios periplasmáticos del tipo Venus FlyTrap, luego del cual se encuentra un dominio citoplasmático de tipo PAS que transmite la señal a través de cambios conformacionales hasta el dominio Histidina quinasa que autofosforila el dominio Asp receptor, seguido por un dominio Histidina fosfotransferasa (Hpt). Este último fosforila y desfosforila al regulador transcripcional citoplasmático BvgA. Cuando BvgA se encuentra fosforilado se encuentra activo (ver Fig.4) (28, 29). El regulador BvgA además de regular la transcripción de los factores de virulencia, autorregula la expresión del operón bvgAS que incluye su propia expresión y el de la proteína sensora BvgS. (30).

Si bien no se conocen los agentes moduladores fisiológicos para el sistema BvgAS se sabe que a 37°C el sistema se encuentra activo. Cuando la temperatura desciende por debajo de los 26°C o la concentración de MgSO₄ en el medio de cultivo es ≥ 40 mM o la concentración de Ácido Nicotínico es ≥ 10 mM, el sistema se encuentra inactivo. Los diferentes estados de activación del sistema definen los distintos perfiles de expresión de factores de virulencia y con ello las fases fenotípicas de *B. pertussis*. Cuando el regulador BvgA se encuentra fosforilado, a 37°C, la bacteria se encuentra en fase virulenta o "Bvg⁺", expresando activamente los genes *vag* (del inglés, *virulence activated genes*), que incluyen muchos factores de virulencia y a su vez se reprime la expresión de los genes *vrg* (del inglés, *virulence repressed genes*), de los cuales aún no se conocen funciones. Bajo las condiciones modulantes mencionadas anteriormente, la bacteria se encuentra en la fase avirulenta o

“*bvg*⁻” caracterizada por la ausencia de la expresión de los factores de virulencia. Se sabe actualmente que el sistema BvgAS no actúa como un mecanismo *ON/OFF*, sino que regula de manera diferencial a los genes *vag*, los cuales se pueden discriminar entre genes *vag* tempranos (Ej.: *fhaB*, que codifica para la proteína hemaglutinina filamentosa FHA), *vag* tardíos (Ej.: *cyaA*, que codifica para la toxina adenilato ciclasa) de acuerdo con su expresión temporal luego de la activación del sistema, y que además regula la expresión del gen *bipA*, que codifica para una fuerte adhesina que caracteriza la fase intermedia de *B. pertussis* (Bvgⁱ), caracterizada por la expresión de los genes *vag* tempranos y el gen *bipA*. De esta manera la regulación ejercida por el sistema de dos componentes actuaría como un reostato dependiendo del grado de fosforilación del regulador transcripcional BvgA, generando una modulación de fases que da lugar a la transición entre las fases Bvg⁺, Bvgⁱ y Bvg⁻, cada una de las cuales se caracteriza por un perfil de expresión de factores de virulencia típicos como se puede observar en la Fig. 4. (31-33). Actualmente sería más correcto denominar a este sistema de dos componentes como sistema BvgASR ya que recientemente se ha demostrado que el regulador BvgR, transcrito dentro del mismo operón que los genes *bvgS* y *bvgA*, es el encargado de inhibir la expresión de los genes *vrgs* durante la fase Bvg⁺ (34).

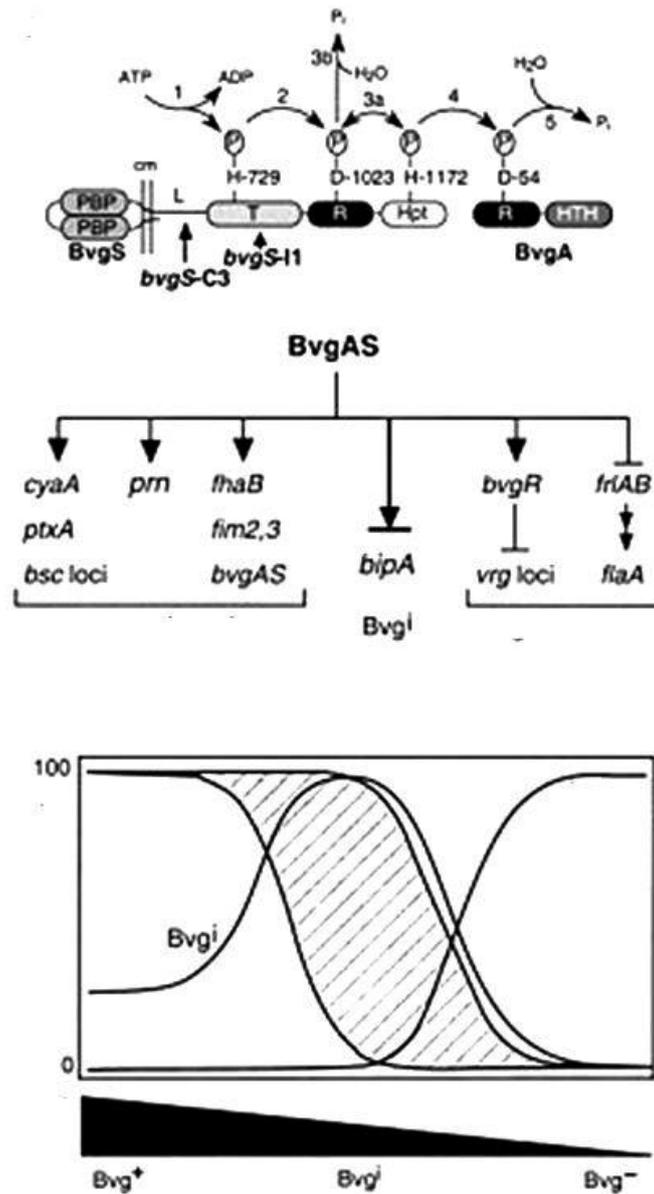


Figura 4. A- Esquema de señalización del receptor de membrana BvgS. Ante un estímulo externo, varias modificaciones conformacionales inducen la fosforilación de varios dominios del propio sensor para finalizar en la fosforilación de regulador transcripcional BvgA. Las figuras B y C esquematizan la expresión génica diferencial a lo largo de las tres fases de virulencia de *B. pertussis*: Bvg⁺, Bvgⁱ y Bvg⁻. Imagen tomada de Cotter y col. (31).

I.1.5.2 Factores de virulencia

Bordetella pertussis sintetiza una variedad de factores de virulencia que incluyen, adhesinas, toxinas, lipopolisacáridos, maquinarias secretoras y un sistema de captura de hierro que en cierto detalle se describen a continuación. La expresión de muchos de estos factores de

virulencia se encuentra, como se describió anteriormente, regulada por el sistema de dos componentes BvgAS.

Factores de virulencia regulados por el sistema de dos componentes BvgAS:

- **Adhesinas:**

Hemaglutinina filamentosa (FHA): es una proteína que se expresa en la superficie de la bacteria y que también es secretada al medio extracelular. Posee una estructura de horquilla y es una proteína altamente inmunogénica, que se utiliza actualmente en las formulaciones acelulares de la vacuna contra pertussis. Es una estructura dominante para la adhesión bacteriana.

La proteína es codificada por el gen *fhaB* y se sintetiza en primera instancia como un precursor de 365KDa que luego es escindido hasta convertirse en la proteína funcional de 220KDa. Posee en su estructura, un dominio RGD (Arg-Gly-Asp) situado en la zona media que participa en la unión a monocitos, macrófagos y leucocitos, así como también intervendría en la unión a moléculas VLA-5 de las células bronquiales del epitelio respiratorio. Dentro de su estructura, la proteína también presenta un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) que media la adhesión a células ciliadas del epitelio respiratorio y macrófagos. A su vez posee también un dominio tipo lectina que le permite unirse a heparina y otros carbohidratos sulfatados, mediando la adhesión a células no ciliadas del epitelio respiratorio (35, 36).

Fimbria (Fim): Fimbria es un tipo de proteína filamentosa que se expresa en la superficie bacteriana. Se encuentra formada por dos subunidades, una es la subunidad mayor, de la que se conocen dos variantes, Fim2 y Fim3 y otra es la subunidad menor, denominada FimD. Los genes que codifican para la expresión de todas las subunidades se encuentran codificadas en el operón *fimBCD*. Las subunidades mayores median la adhesión al epitelio respiratorio a través del reconocimiento de azúcares sulfatados presentes en él, como heparán sulfato, condroitin y dextrano. A su vez, la subunidad menor está involucrada en la adhesión a monocitos.

Debido a su alta inmunogenicidad esta proteína es parte de las formulaciones de la vacuna acelular (37-39).

Pertactina (PRN): Es una proteína de 69 KDa, autotransportadora, expresada en superficie, que participa de la adhesión a células del hospedador a través de sus dominios RGD, que interaccionan con dominios ricos en leucina y prolina, que forman parte de la unión

proteína-proteína en las células eucariotas. Debido a que genera protección, también ha sido incorporada a las formulaciones de las vacunas acelulares (40, 41).

Autotransportadores: tales como BrkA que es una proteína que se expresa en superficie y que ha sido asociada a la resistencia sérica de la bacteria así como también con la mediación de la adhesión al epitelio respiratorio (42). Las mismas funciones han sido descritas para el autotransportador Vag8 (43). Por su parte, el factor de colonización traqueal, TcfA, ha sido relacionado con la mediación de la adhesión bacteriana a células de la tráquea en modelos animales (20). Por último, SphB1 es una lipoproteína, proteasa, necesaria para la maduración de FHA (44).

- **Toxinas:**

Toxina pertussis (TP): Es una toxina proteica tipo A-B, sintetizada únicamente por la especie *B. pertussis*. Los genes codificantes para la toxina se encuentran en el locus *ptx* y corresponden a los genes *ptxA* hasta *ptxE*. La subunidad A, es la responsable de los efectos de la toxina ya que posee la actividad enzimática ADP ribosil transferasa NAD-dependiente, mientras que el oligómero que forma la subunidad B media la interacción con las células del hospedador. La toxina transfiere ADP ribosa a las proteínas G, bloqueando su cascada de señalización y manteniéndola en su estado inactivo.

Debido a que cuando se la inactiva genera altos niveles de protección es que se la ha incorporado en la formulación de la vacuna acelular (45-48).

Toxina Adenilato Ciclasa (CyaA): es una toxina de la familia de las citotoxinas formadoras de poro dependientes de Ca^{+2} con actividad adenilato-ciclasa y hemolisina. Mayormente se encuentra asociada a la superficie de la bacteria y requiere del producto CyaC para ser activada, a través de la palmitoilación del residuo de lisina 983. Una vez que logra el contacto con la célula, promueve la generación de cantidades supra-fisiológicas de cAMP, interfiriendo en los mecanismos de transmisión de señales en las células del sistema inmune y modulando diferentes funciones fisiológicas, incluyendo el estrés oxidativo, lo cual favorece la sobrevivencia de la bacteria en las células del hospedador (49, 50).

Toxina Dermonecrótica (TD): Es una toxina del tipo A-B, lábil a la temperatura, que provoca lesiones necróticas locales en animales de experimentación. Posee un dominio N-terminal de unión a receptor y un dominio C-terminal enzimático. Una vez adherida al receptor, es internalizada vía endocitosis, y luego de ser clivada se activa causando poliaminación y desaminación de GTPasas Rho intracelulares que regulan entre otros, los procesos de

reorganización del citoesqueleto y la diferenciación celular. Las GTPasas permanecen activas bajo la acción de la toxina provocando la intoxicación celular (51).

Sistema de Secreción Tipo III (T3SS): Corresponde a un sistema de inyección, a través del cual se translocan efectores directamente a la célula diana. Dentro de las proteínas efectoras que se conocen hasta el momento encontramos a la proteína BetA y BopC, que se encontrarían involucradas en el proceso de necrosis celular. El Sistema de Secreción de Tipo III ha sido únicamente descrito como activo en cepas clínicas de *B. pertussis*, aunque recientemente se ha demostrado que la cepa vacunal *B. Pertussis* Tohamal, cepa adaptada al laboratorio, luego de ser inoculada en ratones, expresa las proteínas componentes del sistema, aunque luego de sucesivos repiques en placa de cultivo vuelve a bloquear su expresión. De esta manera, pareciera que el T3SS es un factor de virulencia muy importante dentro de la patogénesis de *B. pertussis* in vivo (52-54).

Factores de virulencia no regulados por el sistema de dos componentes BvgAS:

Citotoxina traqueal (TCT): Es un glicopéptido muy pequeño derivado de las glicoproteínas que componen la pared celular de la bacteria que se libera durante el crecimiento celular. Es responsable de la disfunción y muerte celular de las células ciliadas del epitelio respiratorio. Se cree que estimularía la actividad de la enzima óxido nítrico (NO) sintasa, provocando una intoxicación por NO que genera la depleción de hierro en el interior de la célula y la inactividad de las enzimas hierro dependientes que intervienen en la respiración mitocondrial y la síntesis de DNA. De esta manera, las uniones de las células se ven comprometidas y ocurriría la extrusión de las células ciliadas (55, 56).

Lipopolisacárido (LPS): Es una potente endotoxina bacteriana, que al igual que en otras bacterias Gram-negativas, *B. pertussis* expresa en su superficie. Está constituido por una porción lipídica (lípidos A), anclado a la membrana externa y un núcleo oligosacárido. A diferencia de otras bacterias Gram-negativas el LPS de *Bordetella pertussis* no posee antígeno O (cadena de polisacárido). El LPS es pirogénico, mitogénico e histaminosensibilizante. Cuando entra en contacto con las células induce la secreción de citotoxinas pro-inflamatorias conduciendo a la toxicidad sistémica. Se ha reportado que es el responsable de la reactividad de la vacuna celular y es componente adyuvante de la vacuna acelular (57-59).

Sistema de secuestro de hierro: una de las condiciones nutricionales limitantes para el establecimiento de una infección por parte de los microorganismos es la limitación de hierro

que impone el hospedador. En los mamíferos, el hierro se encuentra intracelularmente unido a hemo-proteínas y en el medio extracelular unido a glicoproteínas quelantes que generan una concentración de hierro libre insuficiente para el desarrollo bacteriano normal. Para superar este obstáculo, las bacterias han desarrollado diversos sistemas de secuestro del metal, de manera de superar esta restricción. Dentro de estos mecanismos se encuentra la producción de quelantes de hierro denominados sideróforos. *B. pertussis* es capaz de expresar un sideróforo de tipo hidroxamato, denominado alcaligina capaz de extraer el hierro de las glicoproteínas quelantes del metal del hospedador (60-62).

I.1.6 Patogénesis

Existen varias etapas involucradas en la patogénesis de *B. pertussis*, dentro de las cuales podemos definir claramente al menos cuatro: i) adhesión bacteriana a las células del sistema respiratorio; ii) invasión de dichas células, que ocurre conjuntamente con la evasión de las defensas del hospedador, iii) daño tisular y iv) en algunos casos una etapa de persistencia.

Cada una de las etapas se describe a continuación:

i)-La primera etapa de la patogénesis corresponde a la adhesión bacteriana a células ciliadas del tracto respiratorio superior. Varios estudios realizados tanto en modelos animales como en cultivos celulares han demostrado la participación de varios factores de virulencia en esta etapa, incluyendo: FHA, PRN, Fim, Vag8, BrkA, tcfA y PT (63). Principalmente las adhesinas actúan a través del reconocimiento de los carbohidratos presentes en la superficie de este tipo de células y se considera a la proteína FHA como la adhesina principal.

ii)-En la etapa de evasión de las defensas del hospedador, interviene fuertemente la toxina Adenilato ciclasa que una vez translocada a la célula diana, modula las respuestas de la célula evitando la fagocitosis. La Toxina Pertussis, también tendría un efecto de evasión de la respuesta inhibiendo la migración de macrófagos y linfocitos a las áreas de infección (48, 64).

iii)- En la tercera etapa, donde se produce el daño tisular, intervendrían varios factores de virulencia, tales como BetA, que ingresa a la célula a través del reconocimiento de las regiones de *rafts* lipídicos y es inyectada por el T3SS. Este efector media la muerte celular no apoptótica (54). Conjuntamente, la citotoxina traqueal provoca intoxicación por NO y la toxina dermonecrótica provoca necrosis tisular. Todos estos factores contribuyen al daño del tejido provocando las crisis de tos paroxística características de la enfermedad (56).

iv) La persistencia de la bacteria en el hospedador ha sido planteada como una estrategia que debería adoptar *B. pertussis*, para la cual no se conoce hasta el momento otro tipo de hospedador. Si bien tradicionalmente la enfermedad ha sido considerada aguda, donde las bacterias son “eliminadas” de su hospedador, lo cierto es que al no conocerse otro nicho para el microorganismo, la persistencia en tracto respiratorio implicaría disponer de un entorno donde el patógeno persiste y desde el cual se podría transmitir a un nuevo individuo. En este nuevo receptor, podría darse luego una infección aguda así como también provocar un episodio con sintomatología leve. De esta manera se explicaría la persistencia de la bacteria en la comunidad a pesar de que hace más de 50 años que existe una amplia tasa de vacunación para controlarla en la mayoría de los países. Entender la forma en que *B. pertussis* persiste en su único hospedador conocido no ha podido todavía ser aclarado y es un tema de creciente interés a nivel mundial.

Tanto nuestro grupo como el del Dr. Deora en USA hemos reportado que *B. pertussis* puede formar *biofilms* tanto *in vitro* como *in vivo*. Consecuentemente apoyamos la hipótesis que postula a ésta forma de vida como un posible mecanismo que la bacteria podría adoptar para su persistencia en el hospedador. El *biofilm* se ha definido como un factor de virulencia que permite que una comunidad de microorganismos evada la respuesta inmune (65, 66). Es interesante resaltar que el grupo de la Dra. María Eugenia Rodríguez, de nuestro instituto, así como también otros investigadores en el exterior postulan otra alternativa posible para la persistencia de la bacteria que considera el modelo de vida dentro de las células del hospedador. Su grupo ha reportado la evasión de la fagocitosis y la capacidad de duplicación de *B. pertussis* en una gran variedad de células del hospedador (macrófagos, monocitos, células epiteliales respiratorias) (67, 68).

I.1.6 Diagnóstico, tratamiento y vacunación

El diagnóstico de pertussis se confirma con el aislamiento e identificación de la bacteria utilizando las técnicas de cultivo del microorganismo en medio Bordet-Gengou suplementado con sangre (BGs). Las muestras utilizadas para cultivo son hisopados nasofaríngeos. Esta técnica corresponde a la prueba *Gold* Estándar para la confirmación de la enfermedad aunque muchas veces las posibilidades de lograr el aislamiento de estas bacterias resultan muy bajas. Alternativamente se puede emplear el diagnóstico por PCR, que permite discriminar entre las distintas especies de *Bordetella* que pueden causar la enfermedad en humanos. Cuando la sintomatología lleva ya un tiempo considerable de

instalada (tos por más de 4 semanas) se recomiendan las pruebas serológicas que consisten en la determinación del título de IgG a través de un ensayo de ELISA (10, 69-71).

Para el tratamiento de la enfermedad se recomienda el empleo de antibióticos tales como la Eritromicina en dosis de 40-50 mg/Kg/día por vía oral, dividida en cuatro tomas (máximo 2g/día). La duración generalmente recomendada para prevenir las recaídas es de 14 días (72). Normalmente la bacteria responde muy bien a este tratamiento aunque se han reportado en los últimos años algunos casos de resistencia a Eritromicina. Cuando esto ocurre, se recomienda el uso de otros macrólidos (Azitromicina y Claritromicina) (73)

Como se ha comentado anteriormente, la vacunación es la principal herramienta de prevención contra la enfermedad. Cuando fueron desarrolladas y aplicadas las vacunas por primera vez en la década de 1950 se esperaba poder erradicar la bacteria con una buena cobertura. Sin embargo el transcurso de los años demostró la adaptación del microorganismo a las vacunas disponibles en el mercado, lo cual ha llevado a la necesidad de tener que actualizar las formulaciones persiguiendo aquel mismo objetivo que existía 60 años atrás. Es por esto que en la actualidad existen varias formulaciones que combinan al toxoide tetánico y diftérico con uno o varios antígenos de *B. pertussis* (DTPa). De acuerdo al antígeno pertussis que se incluya, estas preparaciones pueden ser: monovalentes (que contienen sólo Toxina Pertussis detoxificada), bivalentes (TP detoxificada y FHA), trivalentes (TP detoxificada, FHA y PRN), tetravalentes (TP detoxificada, FHA, PRN y FIM) y pentavalentes (TP detoxificada, FHA, PRN, FIM2 y FIM3). Este tipo de formulaciones se viene aplicando desde hace mucho tiempo a menores de 7 años. Actualmente se aplica una variante de la vacuna acelular, denominada Tdap, que corresponde a una dosis menor de toxoide tetánico y antígeno pertussis que se utiliza como refuerzo únicamente en adolescentes y adultos.

En nuestro país, así como también en muchos otros países en desarrollo hasta no hace mucho tiempo se utilizaba únicamente la vacuna celular que se denominaba cuádruple bacteriana (difteria, tétano, *Haemophilus influenzae* b y tos convulsa) que se aplicaba a los 2, 4, 6 y 18 meses de edad. Actualmente el calendario obligatorio de vacunación incluye una dosis de vacuna celular pentavalente (difteria, tétanos, *Haemophilus influenzae* b, tos convulsa y hepatitis B) a los 2, 4 y 6 meses de edad, la cual es seguida de un refuerzo con la cuádruple bacteriana a los 18 meses y un segundo refuerzo con la vacuna triple bacteriana (tétanos, difteria y tos convulsa) entre los 5 y 6 años. Recientemente se aprobó la

administración a los 11 años de una nueva dosis de refuerzo con la vacuna triple bacteriana con el componente pertussis acelular. De la misma manera se recomienda la utilización de esta última vacuna para embarazadas y personal del área de salud (74).

1.2 *Biofilms* microbianos

1.2.1 El concepto que revolucionó la microbiología

En sus orígenes, la microbiología cambió por completo la concepción de la naturaleza. La posibilidad de observar microscópicamente organismos que eran responsables de procesos fermentativos, de daños a la salud y fundamentalmente la posibilidad de cultivarlos *in vitro*, brindaron las herramientas para poder elaborar estrategias de tratamiento que en lugar de ser paliativas, apuntaran a la erradicación de la enfermedad y a su prevención. Durante mucho tiempo se consideró a los microorganismos como células de vida libre e individuales, que no interactuaban entre sí y que eran capaces de replicarse en cultivos líquidos. Estas características fueron extrapoladas a su mecanismo de vida natural. Aunque durante mucho tiempo se estudiaron los fenotipos bacterianos utilizando estos tipos de cultivo hoy por hoy es ampliamente aceptado el hecho de que la mayoría de los microorganismos en la naturaleza viven adheridos a superficies en comunidades mixtas denominadas *biofilms*.

Si bien la primera descripción de un *biofilm* data del siglo XVII cuando Antonie van Leeuwenhoek describió, utilizando un primitivo microscopio, la observación de “pequeños animales” en la superficie de sus propios dientes y más tarde, a principios del siglo XX, Zobell y colaboradores describieron la capacidad de las bacterias acuáticas de vivir adheridas a superficies (75, 76), no fue hasta el año 1978 que se difundió y aceptó el concepto de *biofilms* microbianos. Por aquellos años, varios autores, entre ellos William Costerton (“padre del biofilm”), Geesey y Cheng, describieron diferentes “organizaciones microbianas” en diversos ambientes (77). Una de las definiciones de *biofilm* que se daba por ese tiempo y que tiene vigencia actual es la siguientes: un *biofilm* es “una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un sustrato o interfase, o unas con otras, las cuales están contenidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares producidas por ellas mismas y que expresan un fenotipo propio” (78). En la figura 5 se pueden observar imágenes de micrografía electrónica de barrido donde se ve la estructura de un *biofilm* desarrollado por *Pseudomonas aeruginosa*, uno de los patógenos oportunistas sobre el que más se ha estudiado la formación del *biofilm*. A lo largo de los años se han descrito que muchas otras bacterias como *Vibrio cholerae*, *Burkholderia spp*, *Staphylococcus aureus*, entre otros son capaces de desarrollarse en comunidades adheridas a superficies. También se han descrito *biofilms* formados por otros organismos como

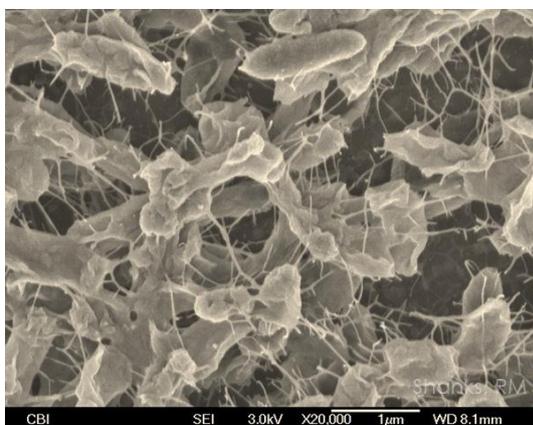
protozoarios, algas y hongos (79). La definición de *biofilm* no está circunscrita a cultivos puros, es más, actualmente es ampliamente aceptado el hecho de que los *biofilms* en la naturaleza están formados, en muchas oportunidades, por diferentes especies. La formación de *biofilms* representa grandes ventajas para la subsistencia de los microorganismos, algunas de ellas se detallan a continuación (78, 80):

- Protección del medio ambiente: la matriz extracelular que recubre las células se encuentra formada por polisacáridos, proteínas y ADN entre otras sustancias. Esta capa ofrece protección debido al aislamiento al que somete a las células, protegiéndolas de agentes externos que puedan dañarlas, tales como la radiación UV, cambios bruscos de pH, deshidratación, *shock* osmótico. Del mismo modo, retrasa la llegada de agentes bactericidas al seno de la población y ofrece la posibilidad de secuestrar nutrientes adsorbiéndolos en la matriz.

- Adquisición de nuevo material genético; dentro de la estructura del *biofilm* se ve favorecido el intercambio horizontal de genes a través del proceso de conjugación. La cercanía entre las células y la protección ofrecida por la matriz extracelular generan un entorno óptimo para el desarrollo del proceso.

- Disponibilidad de nutrientes y cooperación metabólica; dentro de la estructura de los *biofilms*, quedan definidos canales que semejan la estructura de un sistema circulatorio primitivo, asegurando la disponibilidad de nutrientes y eliminación de desechos. De manera paralela, la cercanía entre las células genera una oportunidad para el metabolismo cooperativo donde diferentes especies pueden metabolizar diferentes productos de manera de no generar toxicidad en el micro entorno.

A



B

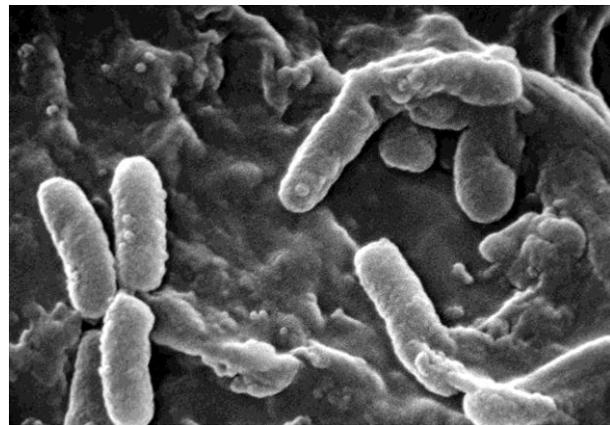


Figura 5- Imágenes SEM de un *biofilm* de *P. aeruginosa* de 6µm x 6µm (A) y de 3µm x 3µm. (<http://eyemicrobiology.upmc.com/PhotoGalleryBiofilms.html/>)

La importancia de los *biofilms* en nuestro ambiente fue por primera vez aceptada y evaluada por los profesionales de la industria química, quienes tenían grandes problemas en sus plantas de tratamiento de aguas, elaboración de alimentos, cañerías de transportes, etc., debido a la presencia de microorganismos que generaban contaminaciones y corrosión entre otros inconvenientes (81, 82). Actualmente, los *biofilms* han sido detectados en infecciones crónicas, como las infecciones por catéteres, infecciones pulmonares, infecciones mediadas por implantes, etc. (83). El increíble incremento de la resistencia a antibióticos que confiere esta forma de vida ha hecho que en las últimas décadas se dediquen grandes esfuerzos a mejorar las terapéuticas y a tratar de contar con herramientas preventivas de la colonización de equipamiento e insumos médicos.

1.2.2 Etapas en la formación de *biofilm*

Las etapas involucradas en la formación de un *biofilm* comprenden: i) una fase inicial de adhesión a la superficie, seguida de una etapa de ii) formación de micro colonias, posteriormente una etapa de iii) maduración del *biofilm* con formación de la matriz extracelular y una cuarta etapa iv) variable en el tiempo y dependiente de las condiciones del ambiente que consiste en el desprendimiento de las células para colonizar otros nichos (83, 84). A continuación se describirán más detalladamente cada una de las etapas:

i) La etapa inicial de formación de un *biofilm* corresponde a la fase de adhesión de las bacterias a la superficie blanco que pasa de ser reversible a irreversible. Se sabe que existen factores ambientales que estimulan este proceso y que están relacionados con la disponibilidad nutricional, el pH, la temperatura y las características del sustrato que estimulan cambios en la expresión de los factores de adhesión propios de las bacterias (85, 86). Se ha demostrado que *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* forman *biofilms* en casi todas las condiciones nutricionales, pero no lo hace de igual forma *E. coli* K12, que no genera *biofilms* en medios nutricionales mínimos a no ser que se hayan suplementado los mismos con aminoácidos. Los factores de sustrato y medio ambiente están relacionados con la etapa de adhesión reversible de las bacterias (87), mientras que la adhesión irreversible estaría asociada a componentes propios de las células (83). Dentro de estos componentes, se han identificado para bacterias Gram-negativas, la participación de flagelos, LPS, pilis de tipo I y IV (84) En el caso de las bacterias Gram-positivas, ciertas proteínas superficiales y extracelulares así como también polisacáridos capsulares estarían involucrados en el proceso de adhesión (85).

ii) En la segunda etapa, la movilidad mediada por pilis generaría una cercanía entre las bacterias, estimulando las uniones célula-célula y generando la formación de micro-colonias. En este sentido, resulta interesante el caso de *P. aeruginosa*, de la cual se sabe que luego de la etapa de adhesión irreversible, la expresión del flagelo se ve inhibida, para dar lugar al aumento en la expresión de pilis de tipo IV, promoviendo la movilidad en el soporte generando cercanía y reclutamiento de las células. Estas uniones intercelulares, se daría a través de fuertes adhesinas bacterianas dentro de las cuales se puede nombrar la proteína Ag43 de *E. coli* (87).

iii) La etapa de maduración del *biofilm* se caracteriza por la producción de la matriz extracelular, que generalmente está compuesta de un componente de polisacárido mayoritario dentro del cual se pueden encontrar inmersas proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, generando la estructura tridimensional definitiva del *biofilm* que incluye la formación de canales internos de circulación de nutrientes. La composición del polisacárido es variable dependiendo de la bacteria. Por ejemplo en el caso de *P. aeruginosa* el polisacárido es el alginato (88, 89), poli-acetilglucosamina en el caso de *Staphylococcus aureus* (90, 91), *Salmonella typhimurium* produce un polisacárido de celulosa (92) y en el caso de *Vibrio cholerae* produce un polisacárido rico en glucosa y galactosa (93). Se ha demostrado también que una misma bacteria es capaz de variar la composición del polisacárido dependiendo de las condiciones ambientales. Se ha reportado para *P. aeruginosa* la capacidad de producir además de alginato, una película rica en glucosa en la interfase medio- aire que se denominó Pellican (94).

iv) Finalmente, la etapa de liberación de las células para colonizar nuevos nichos es la etapa menos conocida del proceso de formación de *biofilm*. Algunos estudios en *P. aeruginosa* indicarían que la limitación de nutrientes, de manera contraria a lo que ocurre en la etapa inicial de formación de microcolonias, estimularía la expresión del flagelo y la disminución de la expresión de fimbria tipo IV (95), disminuyendo la intensidad de la unión entre células y aumentando la movilidad de las bacterias. En el caso de *S. epidermidis*, se vería afectada la expresión del operón *icaABCD*, responsable de la síntesis de exopolisacárido y de esta manera se vería afectada la organización del *biofilm*, permitiéndose la liberación de las células (96).

En la Figura 6 se ejemplifican los diferentes pasos y los diferentes factores involucrados en la formación del *biofilm* de *P. aeruginosa*. En las figura 7 se observa un esquema

representativo de la estructura tridimensional de un *biofilm* típico de la misma bacteria con su característica forma de hongo y donde se muestran los canales de circulación.

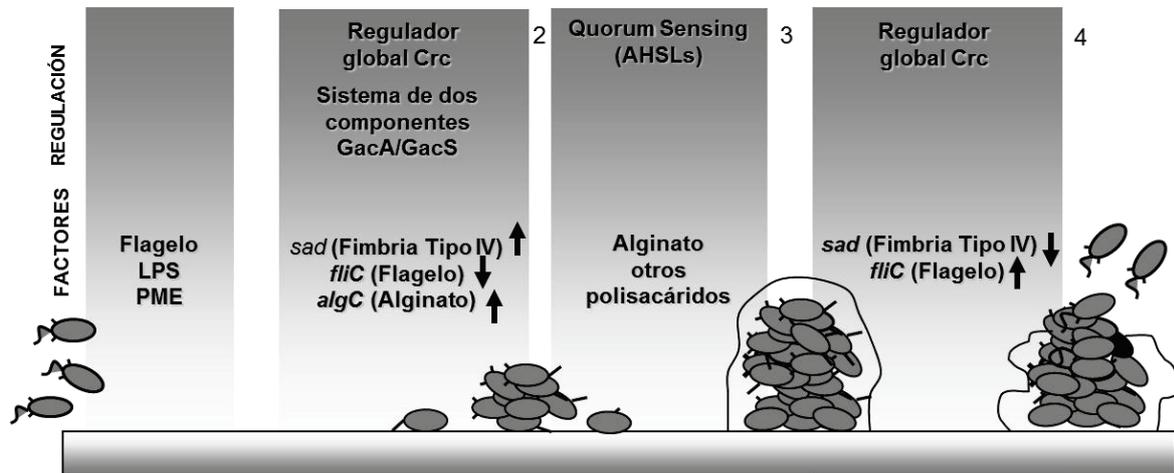


Figura 6- Esquema de las diferentes etapas de formación de *biofilm* de la bacteria *P. aeruginosa*. Se detallan los factores de virulencia que participan de las diferentes etapas así como también los elementos regulatorios. Imagen extraída de la Tesis doctoral de Diego O. Serra (97).

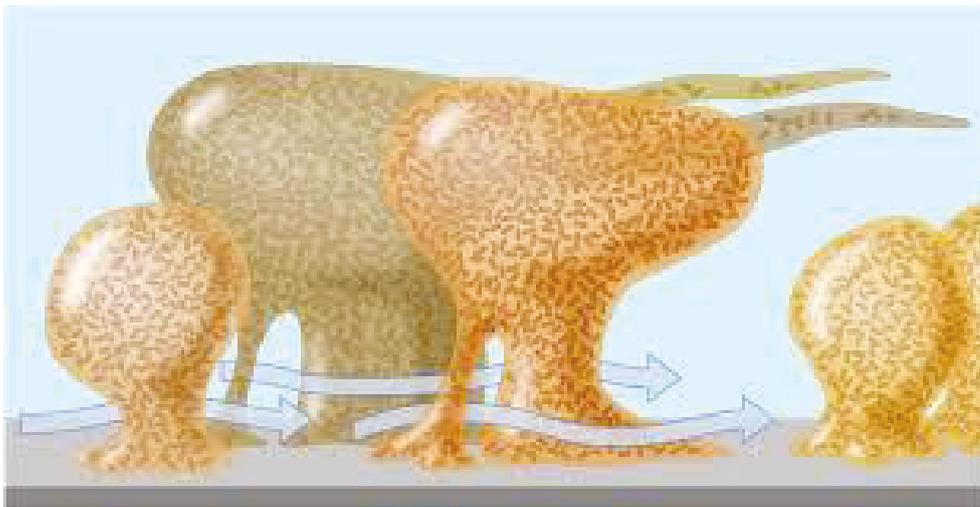


Figura 7- Esquema típico de un *biofilm* con estructura de Hongo de *P. aeruginosa*. Se observa la zona de adhesión y el crecimiento tridimensional que deja al descubierto canales de circulación de nutrientes y desechos (79)

1.2.3 Características estructurales y regulación de los procesos de formación de *biofilm*

Actualmente se asume que las características fisiológicas de las células en un cultivo planctónico que tiene lugar en un reactor a escala de laboratorio, con adecuada transferencia de materia y calor son bastante similares para todos los individuos. Se considera, en particular para esta escala, que cuando se quiere evaluar alguna característica

fenotípica la muestra que se toma es representativa de todo el volumen. A estos fines se centrifugan las células de un cultivo líquido y se trabaja sobre el conjunto como una población relativamente homogénea. Las mayores diferencias entre células en cultivos líquidos se dan en función del tamaño de la escala del reactor. Esta situación no ocurre dentro de un *biofilm*, donde a nivel de microescala existen marcados gradientes de nutrientes, de productos de desecho y presencia de compuestos señalizadores que varían temporal y espacialmente a lo largo del periodo de formación del *biofilm*, en estructuras que no superan el tamaño de los 500 μm . Estudiar un *biofilm* ha impuesto a la microbiología entrar en la micro y nano-escala, poder desarrollar nuevos sistemas de crecimiento y evaluar ese desarrollo sin perturbar el sistema. En este sentido dentro de las muchas medidas que se han realizado para estudiar el comportamiento de los nutrientes en las distintas zonas de los *biofilms*, una de las más estudiadas ha sido el nivel de O_2 . A través de la utilización de micro-electrodos se han logrado realizar medidas que indican un decrecimiento de la concentración del gas con la profundidad de la estructura. Este comportamiento no es atribuible solamente a una disminución en la difusión, ya que la matriz es un ambiente acuoso en el que el O_2 por su tamaño difunde relativamente bien, aunque en un menor porcentaje que si lo hiciera en agua pura. Lo que afecta la disponibilidad de O_2 es que a medida que el gas difunde va siendo consumido por las bacterias que se encuentran en las capas más superficiales, de modo que la concentración local es un equilibrio dinámico entre la difusión y el consumo. Un proceso similar ocurre con los nutrientes que se encuentran en el seno de la solución. De manera contraria, los productos de desecho se encuentran más concentrados en el interior del *biofilm* y difunden al medio siguiendo un proceso de difusión en sentido contrario al de los nutrientes. Ambos procesos se ejemplifican en la Figura 8. Una posibilidad diferente sería el comportamiento de los productos que pudieran ser generados dentro del *biofilm* y también consumidos dentro de él por células de una especie diferente a la productora. Esto llevaría a que exista una concentración máxima dentro del *biofilm*, y que el producto nunca alcance el seno del líquido (Fig. 8.A) (98, 99).

Es razonable entonces que debido a todas las diferencias nutricionales y ambientales que generan los perfiles de difusión mencionados, se observen respuestas fisiológicas distintivas o que ocurra una adaptación en las células que se encuentran en las diferentes zonas. Un ejemplo que muestra, tal vez drásticamente las variaciones del ambiente al que se encuentran sometidas las bacterias a lo largo del *biofilm*, es el publicado por investigadores

de la Universidad de *Southampton*, que utilizando una tinción fluorescente diferencial para bacterias vivas y muertas (*LIVE/DEAD*), muestran como en un mismo momento del desarrollo, las células que se encuentran en contacto con la superficie (y alejadas del seno del líquido con nutrientes) se encuentran muertas, mientras las que están más próximas a la superficie (en contacto con el medio de cultivo) se encuentran vivas (ver figura 8-B). Otro trabajo muy interesante publicado recientemente por el Dr. Diego Serra analiza, utilizando Microscopía Electrónica de Barrido, las diferencias estructurales de un *biofilm* correspondiente a una microcolonia de *E. coli* K12 crecida sobre agar. Realizando cortes con un criomicrotomo observaron diferentes zonas de la estructura; la zona de base, que es la zona en contacto con los nutrientes, la capa más superficial, con menor concentración de nutrientes y también zonas de los bordes de la microcolonia. Se observaron marcadas diferencias en cuanto a la morfología de las bacterias y a la expresión de filamentos. En la parte inferior se observaron células alargadas, en división activa, embebidas en una red intensa de filamentos que fueron identificados como flagelos. A medida que se fueron analizando zonas más profundas, las estructuras filamentosas dejaban de observarse y lo que mantenía a las células unidas eran fibras de tipo *curli*, y la morfología de las bacterias se transformaba de alargada a ovalada encontrándose células aisladas en la capa más superficial sostenidas en una matriz estructural de *curli*. La transición entre un tipo de morfología y el otro resultó ser muy abrupta. Por otro lado al analizar los bordes del *biofilm* se observó que la morfología correspondía a una zona muy similar a la zona de la base aunque con presencia de una red flagelar menor. De esta manera se pudo determinar que el ambiente en el cual se encuentran las células condiciona la expresión de los filamentos y la morfología, efecto que posiblemente esté relacionado con el grado de actividad metabólica (100).

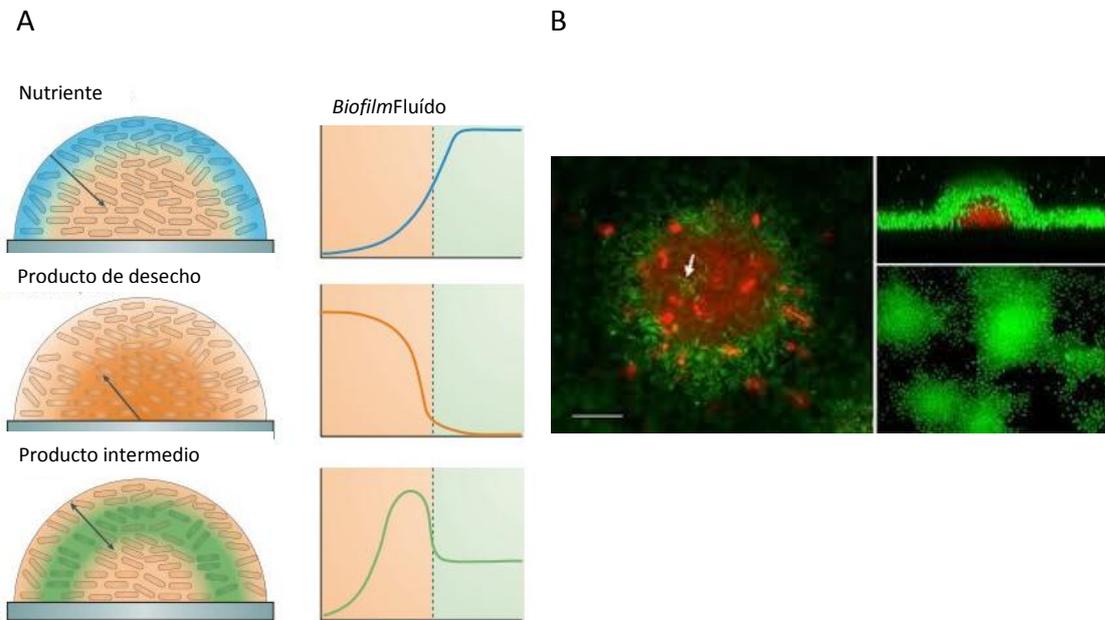


Figura 8-A. Esquema donde se representa las diferentes posibilidades de concentración de nutrientes que provienen del seno del líquido, un desecho metabólico o producido dentro de la estructura en una zona intermedia dentro de un biofilm de geometría semi-esférica. En la Figura 8 B se observa una imagen de fluorescencia realizada con una tinción *LIVE/DEAD* donde se ve en la zona interna, un cúmulo de bacterias muertas mientras que en la zona más externa las células permanecen vivas. (Imágenes tomadas del sitio de la Universidad de Montana-Centro de Ingeniería del Biofilm: <http://www.biofilm.montana.edu/>)

El proceso general de crecimiento en *biofilm* así como también los mecanismos de adaptación microbiana a las diferentes condiciones micro-ambientales que se describieron anteriormente, se encuentran sometidos a una eficiente regulación por parte de las bacterias. Dentro de los sistemas de regulación más ampliamente estudiados se encuentra el sistema de *Quorum Sensing*. Este sistema de señalización intercelular se basa en la producción de distintos tipos de moléculas derivadas de las acil-homoserin-lactonas en el caso de las bacterias Gram-negativas, y de oligopéptidos en el caso de bacterias Gram-positivas (101, 102). Estas moléculas son liberadas al medio extracelular y permiten sensar la densidad celular. Cuando el número de células es alto, la acumulación de las señales alcanza un valor umbral que desencadena una cascada de señalización y estimula la producción de *biofilm*. En el caso de *P. aeruginosa* se han descrito varios sistemas de QS, el sistema LasR-LasI, que controla la expresión de varios factores de virulencia extracelulares y a su vez también controla al sistema de QS, RhIR-EhII, que interviene en la regulación de la producción de varios metabolitos secundarios. Otras especies para las que se han reportado

moléculas de homo-serinlactonas son *E. coli*, *V. cholerae*, *S. typhimurium* y *Burkholderia spp.* (101).

Existe otro tipo de reguladores que intervienen en la formación de *biofilm* y son los denominados reguladores globales. En el caso de *P. aeruginosa*, la proteína de represión de catabolito (Crc), que está relacionada al metabolismo del carbono, también intervendría en la estimulación de la expresión de fimbrias de tipo IV y de esta manera en la formación de microcolonias (103). Para *E. coli* se ha descrito la relación del par OmpR (proteína de membrana) y RpoS (regulador maestro) (104, 105). En esta misma especie, el regulador CsrA, que interviene en el metabolismo del carbono, también participa en la activación de la dispersión de los *biofilms* en varias condiciones de cultivo (106). De la misma manera varios sistemas de dos componentes han sido relacionados a la formación de *biofilm* tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas.

Recientemente se ha descrito un tipo de regulación postranscripcional que estaría asociado a la formación de *biofilm* en bacterias. Se trata de la regulación que ejerce la concentración de “bis-(3'-5')-**cyclic** dimeric guanosine monophosphate”(c-di-GMP), un metabolito cuya concentración está regulada por la actividad *di-guanilato ciclasa* y *fosfodiesterasa* (107).

1.2.7 Impacto de los *biofilms* en el área de salud

Desde el comienzo de la era de los antibióticos y el desarrollo de las vacunas, muchas enfermedades agudas pudieron ser tratadas con eficacia. Normalmente los episodios agudos de enfermedad originados por infecciones bacterianas responden rápida y efectivamente al tratamiento antibiótico a no ser que exista alguna resistencia a la droga administrada. No obstante, se ha podido comprobar que más de la mitad de las infecciones padecidas por el hombre son causadas por microorganismos comensales del cuerpo, patógenos oportunistas que toman ventaja de una situación de estrés o injuria para desarrollar una infección. Las imágenes que han sido tomadas de alguna herida donde desarrolló un microorganismo de este tipo siempre demostraron un desarrollo de bacterias embebidas en una matriz polimérica, o sea, un *biofilm*. Con el tiempo se pudo demostrar que existe una gran cantidad y diversidad de infecciones producidas por *biofilms*, tales como las caries dentales, infecciones de válvulas cardíacas, infecciones del tracto urinario y digestivo, infecciones pulmonares crónicas, como las sufridas por los pacientes fibroquísticos, heridas, conjuntivitis, etc. De la misma manera se ha logrado comprobar que la mayoría de las infecciones intra-hospitalarias, asociadas a catéteres o material médico o quirúrgico

contaminado tienen su base en el desarrollo de *biofilms* sobre estas superficies. En la actualidad se conocen muchas patologías en las que los microorganismos desarrollan formando *biofilms*, donde interviene el desarrollo de células sésiles (adheridas a superficie). Ha sido ampliamente documentado que las células que integran un *biofilm* debido a la alta capacidad de resistencia de estas comunidades, tanto a agentes antibióticos como a las defensas del organismo, son las responsables de infecciones crónicas o persistentes. Además, los *biofilms* liberan antígenos que estimulan la producción de anticuerpos, aunque estos fallan en la tarea de erradicación, y producen además daño a los tejidos circundantes, provocando serias lesiones inflamatorias. Por otro lado, si bien los antibióticos tienen éxito en eliminar las bacterias planctónicas liberadas de los *biofilms*, no tienen la misma eficiencia para eliminar la comunidad sésil. Como consecuencia, se observan picos de síntomas agudos luego de un ciclo de tratamiento. Para poder desarrollar una estrategia terapéutica adecuada para el control de este tipo de estructuras microbianas, resulta importante conocer cuáles son las razones por las que los *biofilms* presentan una resistencia aumentada al tratamiento con antibióticos que sus contrapartes planctónicas. En este sentido; algunas de las hipótesis más aceptadas son (78, 79, 94, 108):

- La difusión de un antibiótico dentro de la matriz se ve disminuida por la presencia de componentes propios de la matriz polimérica. La matriz extracelular podría dificultar la difusión de estos agentes imposibilitando que los mismos contacten de manera eficaz a las células sésiles. Un caso particular es la poca difusión de los agentes oxidantes que conjuntamente con la desactivación por parte de las capas más externas del *biofilm* impiden su penetración al interior de la película. Esto es especialmente importante como una explicación de las causas por las que las células fagocíticas, que median su ataque a través de la utilización de este tipo de compuestos son incapaces de destruir los *biofilms*.
- La existencia en ciertas regiones del *biofilm* en las que las células se encuentran en un estado nutricional de inanición con un metabolismo menos activo, que provocaría una resistencia intrínseca a la acción de los agentes microbicidas.
- Una última explicación, aunque un poco más especulativa, sería la existencia de un fenotipo genéticamente determinado de resistencia programado para la vida en *biofilm*.

1.2.7 El *biofilm* de *B. pertussis*

Varios trabajos realizados durante los últimos años por nuestro laboratorio y por otros grupos han demostrado la capacidad de *B. pertussis* de formar *biofilm* sobre superficies

abióticas, como vidrio, polipropileno, poliestireno, y sobre superficies bióticas como la cavidad nasofaríngea de ratón. Se ha demostrado que *B. pertussis* utiliza varios factores de virulencia para promover la adhesión y formación de *biofilm*, dentro de los cuales se encuentran varias adhesinas. Fim y PRN estarían involucradas en las primeras etapas de adhesión. La proteína filamentosa FHA, no solo forma parte esencial de esta etapa sino que también es requerida para la unión de las bacterias entre sí durante la maduración de la comunidad. De la misma manera, la proteína Fim junto con la proteína Bsp22, secretada por el Sistema de Secreción Tipo III, formarían filamentos que junto con una matriz polimérica, de la cual no se conoce detalladamente la composición, generaría la estructura en la cual están embebidas las bacterias. Además de proteínas y polisacáridos, la matriz extracelular del *biofilm* de *B. pertussis* contiene ADN. Estudios de formación de *biofilm* realizados a través de escaneo por microscopía láser confocal *in vitro* permitieron cuantificar la altura promedio de un *biofilm* maduro de *B. pertussis*, el cual arrojó un valor de 25µm (66).

Actualmente se conocen algunos factores regulatorios que influyen en la formación de *biofilm* en *B. pertussis*. El sistema de dos componentes BvgAS ha sido el primer sistema de regulación involucrado en la formación de *biofilm* de *Bordetella*. Se ha demostrado que cuando la bacteria se encuentra en su fase avirulenta es incapaz de desarrollar *biofilms*. Este fenómeno está asociado a la falta de expresión de factores involucrados en los procesos de adhesión, tales como FHA, Fim, PRN, SST3, etc. De la misma manera, el regulador BpsR, ha sido descrito como regulador de la producción de polisacárido. Este regulador, BvgAS independiente, se une a la región promotora del operón *bpsA-D* induciendo su expresión. Más recientemente se ha demostrado que la molécula (p)ppGpp, una molécula que se acumula en muchas bacterias en respuesta a condiciones nutricionales desfavorables, regula positivamente la expresión de Fim y Bsp22, quienes formarían estructuras filamentosas estructurales en el *biofilm* de *B. pertussis*. Se ha demostrado que la regulación que ejerce este metabolito es BvgAS independiente. Por último, también recientemente, se ha demostrado que en *Bordetella spp*, también existe una regulación de la formación de *biofilm* por parte del señalizador secundario di-cGMP, cuya mutación disminuye drásticamente la formación de *biofilm* en *B. bronchiseptica*. Una figura representativa de las etapas de formación de *biofilm* y los factores intervinientes se resume en la Figura 9 (65, 66, 109-114).

Teniendo en cuenta toda la información descrita anteriormente, la hipótesis de que *B. pertussis* pueda colonizar y persistir en el hospedador mediante la formación de *biofilm* ha cobrado importancia en la comunidad científica. De modo que, entender los mecanismos moleculares que conllevan dicho desarrollo resulta de gran interés para mejorar no solo las terapéuticas sino también la calidad de las vacunas contra este patógeno.

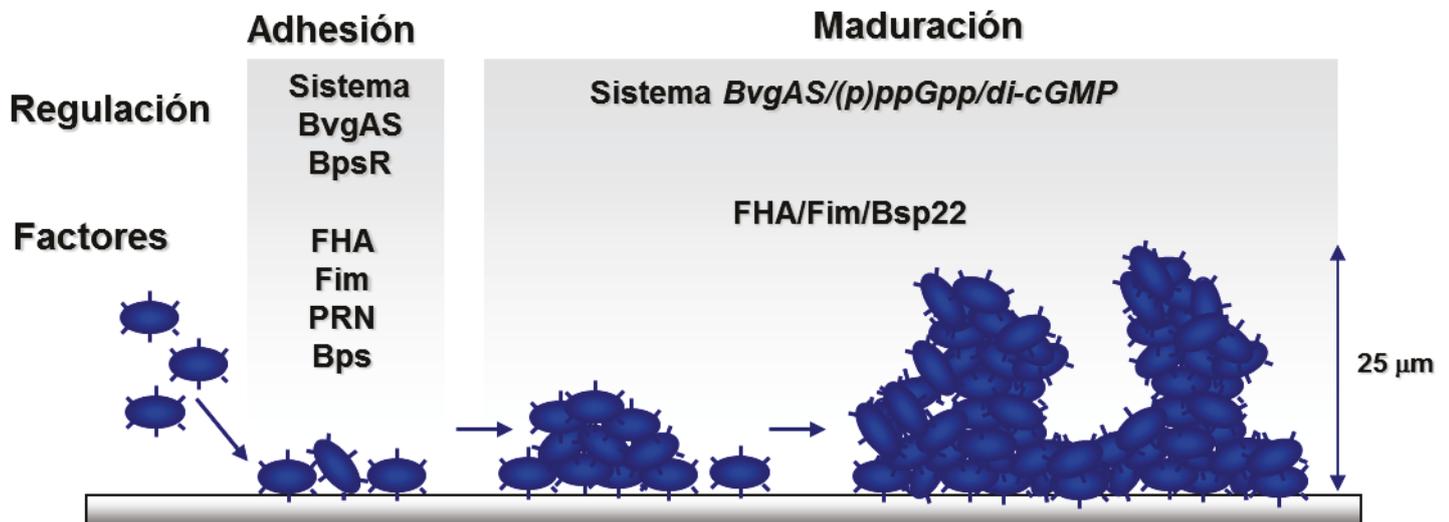


Figura 9- Esquema representativo de las etapas de adhesión, formación de microcolonias y maduración del *biofilm* de *B. pertussis* junto con los factores de virulencia involucrados y los sistemas de regulación conocidos. Imagen extraída y modificada de la Tesis Doctoral de Diego O. Serra (97).

1.4 OBJETIVOS GENERALES DEL TRABAJO DE TESIS

I) Caracterizar el crecimiento en *biofilm* de aislados clínicos de *B. pertussis* recuperados en hospitales de la región y provenientes de pacientes con tos convulsa,

II) Estudiar mediante técnicas de proteómica comparativa diferencias fenotípicas entre un aislado clínico seleccionado por su alta capacidad de formación de *biofilm* y la cepa de referencia adaptada al laboratorio *B. pertussis* Tohama I,

III) Estudiar la localización espacial y dinámica temporal de adhesinas involucradas en el proceso de formación de *biofilm*, mediante el empleo de Microscopia de Fuerza Atómica.

I.5 BIBLIOGRAFÍA

1. Gerlach, G., von Wintzingerode, F., Middendorf, B., and Gross, R. (2001) Evolutionary trends in the genus *Bordetella*, *Microbes Infect* 3, 61-72.
2. Cone, T. C., Jr. (1970) Whooping cough is first described as a disease sui generis by Baillou in 1640, *Pediatrics* 46, 522.
3. Bordet, J., and Gengou, O. (1906) Le microbe de la coqueluche, *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 20, 48-68.
4. Cherry, J. D., Brunell, P. A., Golden, G. S., and Karzon, D. T. (1988) Report of the Task Force on Pertussis and Pertussis Immunization—1988, *Pediatrics* 81, 933-984.
5. Sato, Y., Kimura, M., and Fukumi, H. (1984) Development of a pertussis component vaccine in Japan, *Lancet* 1, 122-126.
6. Cherry, J., Heininger, U., Feigin, R., Demmler, G., and Kaplan, S. . (2004) Pertussis and other *Bordetella* infections, *Textbook of pediatric infectious diseases Philadelphia, Pa.: The W. B. Saunders Co*, 1588-1608.
7. Sturmberg, J. P., and Watt, P. (1999) Could it be whooping cough?, *Aust Fam Physician* 28, 129-131.
8. Cherry, J. D. (1984) The epidemiology of pertussis and pertussis immunization in the United Kingdom and the United States: a comparative study, *Curr Probl Pediatr* 14, 1-78.
9. Sandora, T. J., Gidengil, C. A., and Lee, G. M. (2008) Pertussis vaccination for health care workers, *Clin Microbiol Rev* 21, 426-434.
10. Wood, N., and McIntyre, P. (2008) Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention, *Paediatr Respir Rev* 9, 201-211; quiz 211-202.
11. Organization, W. H. (2006) Pertussis, <http://www.who.int/immunizationmonitoring/diseases/pertussis/en/index.html>.
12. Edwards, K., and Freeman, D. M. (2006) Adolescent and adult pertussis: disease burden and prevention, *Curr Opin Pediatr* 18, 77-80.
13. Riva Posse, C., and Miceli, I. P. . (2005) Evolucion de coqueluche en la Argentina del siglo XX, *Edicina* 65, 7-16.
14. Epidemiología, D. N. d. (2013) <http://www.msal.gov.ar>.
15. Cherry, J. D. (2003) The science and fiction of the "resurgence" of pertussis, *Pediatrics* 112, 405-406.
16. Halperin, S. A. (2007) The control of pertussis--2007 and beyond, *N Engl J Med* 356, 110-113.
17. Organization, W. H. (2006) Immunization, vaccines and biologicals: pertussis vaccine, <http://www.who.int/vaccines/en/pertussis.shtml>.
18. Fingerhann, M., Fernandez, J., Sisti, F., Rodriguez, M. E., Gatti, B., Bottero, D., Graieb, A., Gaillard, M. E., Ayala, S. G., Mooi, F. R., Lopardo, H., and Hozbor, D. (2006) Differences of circulating *Bordetella pertussis* population in Argentina from the strain used in vaccine production, *Vaccine* 24, 3513-3521.
19. Van Loo, I. H., and Mooi, F. R. (2002) Changes in the Dutch *Bordetella pertussis* population in the first 20 years after the introduction of whole-cell vaccines, *Microbiology* 148, 2011-2018.
20. Mattoo, S., and Cherry, J. D. (2005) Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies, *Clin Microbiol Rev* 18, 326-382.
21. McEniery, J. A., Delbridge, R. G., and Reith, D. M. (2004) Infant pertussis deaths and the management of cardiovascular compromise, *J Paediatr Child Health* 40, 230-232.
22. Bisgard, K. M., Pascual, F. B., Ehresmann, K. R., Miller, C. A., Cianfrini, C., Jennings, C. E., Rebmann, C. A., Gabel, J., Schauer, S. L., and Lett, S. M. (2004) Infant pertussis: who was the source?, *Pediatr Infect Dis J* 23, 985-989.
23. Cotter, P. A., and Miller, J. F. (2000) Genetic analysis of the *Bordetella* infectious cycle, *Immunopharmacology* 48, 253-255.
24. Preston, A. (2005) *Bordetella pertussis*: the intersection of genomics and pathobiology, *CMAJ* 173, 55-62.

25. Anderton, T. L., Maskell, D. J., and Preston, A. (2004) Ciliostasis is a key early event during colonization of canine tracheal tissue by *Bordetella bronchiseptica*, *Microbiology* *150*, 2843-2855.
26. Woolfrey, B. F., and Moody, J. A. (1991) Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*, *Clin Microbiol Rev* *4*, 243-255.
27. Smith, A. M., Guzman, C. A., and Walker, M. J. (2001) The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control, *FEMS Microbiol Rev* *25*, 309-333.
28. Herrou, J., Bompard, C., Wintjens, R., Dupre, E., Willery, E., Villeret, V., Locht, C., Antoine, R., and Jacob-Dubuisson, F. (2010) Periplasmic domain of the sensor-kinase BvgS reveals a new paradigm for the Venus flytrap mechanism, *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 17351-17355.
29. Dupre, E., Wohlkonig, A., Herrou, J., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., and Antoine, R. (2013) Characterization of the PAS domain in the sensor-kinase BvgS: mechanical role in signal transmission, *BMC Microbiol* *13*, 172.
30. Cotter, P. A., and Jones, A. M. (2003) Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*, *Trends Microbiol* *11*, 367-373.
31. Deora, R., Bootsma, H. J., Miller, J. F., and Cotter, P. A. (2001) Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene, *Mol Microbiol* *40*, 669-683.
32. Vergara-Irigaray, N., Chavarri-Martinez, A., Rodriguez-Cuesta, J., Miller, J. F., Cotter, P. A., and Martinez de Tejada, G. (2005) Evaluation of the role of the Bvg intermediate phase in *Bordetella pertussis* during experimental respiratory infection, *Infect Immun* *73*, 748-760.
33. Melton, A. R., and Weiss, A. A. (1993) Characterization of environmental regulators of *Bordetella pertussis*, *Infect Immun* *61*, 807-815.
34. de Gouw, D., Diavatopoulos, D. A., Bootsma, H. J., Hermans, P. W., and Mooi, F. R. (2011) Pertussis: a matter of immune modulation, *FEMS Microbiol Rev* *35*, 441-474.
35. Prasad, S. M., Yin, Y., Rodzinski, E., Tuomanen, E. I., and Masure, H. R. (1993) Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*, *Infect Immun* *61*, 2780-2785.
36. Menozzi, F. D., Gantiez, C., and Locht, C. (1991) Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin, *FEMS Microbiol Lett* *62*, 59-64.
37. Mooi, F. R., van der Heide, H. G., ter Avest, A. R., Welinder, K. G., Livey, I., van der Zeijst, B. A., and Gaastra, W. (1987) Characterization of fimbrial subunits from *Bordetella* species, *Microb Pathog* *2*, 473-484.
38. Geuijen, C. A., Willems, R. J., and Mooi, F. R. (1996) The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars, *Infect Immun* *64*, 2657-2665.
39. Geuijen, C. A., Willems, R. J., Bongaerts, M., Top, J., Gielen, H., and Mooi, F. R. (1997) Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract, *Infect Immun* *65*, 4222-4228.
40. Henderson, I. R., and Nataro, J. P. (2001) Virulence functions of autotransporter proteins, *Infect Immun* *69*, 1231-1243.
41. Charles, I. G., Dougan, G., Pickard, D., Chatfield, S., Smith, M., Novotny, P., Morrissey, P., and Fairweather, N. F. (1989) Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*, *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 3554-3558.
42. Barnes, M. G., and Weiss, A. A. (2001) BrkA protein of *Bordetella pertussis* inhibits the classical pathway of complement after C1 deposition, *Infect Immun* *69*, 3067-3072.
43. Marr, N., Shah, N. R., Lee, R., Kim, E. J., and Fernandez, R. C. (2011) *Bordetella pertussis* autotransporter Vag8 binds human C1 esterase inhibitor and confers serum resistance, *PLoS One* *6*, e20585.
44. Coutte, L., Antoine, R., Drobecq, H., Locht, C., and Jacob-Dubuisson, F. (2001) Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway, *EMBO J* *20*, 5040-5048.

45. Nicosia, A., Perugini, M., Franzini, C., Casagli, M. C., Borri, M. G., Antoni, G., Almoni, M., Neri, P., Ratti, G., and Rappuoli, R. (1986) Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: operon structure and gene duplication, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4631-4635.
46. Kaslow, H. R., and Burns, D. L. (1992) Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation, *FASEB J* 6, 2684-2690.
47. Katada, T., Tamura, M., and Ui, M. (1983) The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein, *Arch Biochem Biophys* 224, 290-298.
48. Carbonetti, N. H., Artamonova, G. V., Van Rooijen, N., and Ayala, V. I. (2007) Pertussis toxin targets airway macrophages to promote Bordetella pertussis infection of the respiratory tract, *Infect Immun* 75, 1713-1720.
49. Welch, R. A. (1991) Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria, *Mol Microbiol* 5, 521-528.
50. Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A., and Danchin, A. (1988) Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of Bordetella pertussis, *EMBO J* 7, 3997-4004.
51. Cowell, J. L., Hewlett, E. L., and Manclark, C. R. (1979) Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of Bordetella pertussis, *Infect Immun* 25, 896-901.
52. French, C. T., Panina, E. M., Yeh, S. H., Griffith, N., Arambula, D. G., and Miller, J. F. (2009) The Bordetella type III secretion system effector BteA contains a conserved N-terminal motif that guides bacterial virulence factors to lipid rafts, *Cell Microbiol* 11, 1735-1749.
53. Kuwae, A., Matsuzawa, T., Ishikawa, N., Abe, H., Nonaka, T., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S., and Abe, A. (2006) BopC is a novel type III effector secreted by Bordetella bronchiseptica and has a critical role in type III-dependent necrotic cell death, *J Biol Chem* 281, 6589-6600.
54. Shrivastava, R., and Miller, J. F. (2009) Virulence factor secretion and translocation by Bordetella species, *Curr Opin Microbiol* 12, 88-93.
55. Bassinet, L., Gueirard, P., Maitre, B., Housset, B., Gounon, P., and Guiso, N. (2000) Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by Bordetella pertussis, *Infect Immun* 68, 1934-1941.
56. Fukui, A., and Horiguchi, Y. (2004) Bordetella dermonecrotic toxin exerting toxicity through activation of the small GTPase Rho, *J Biochem* 136, 415-419.
57. Preston, A., Thomas, R., and Maskell, D. J. (2002) Mutational analysis of the Bordetella pertussis wlb LPS biosynthesis locus, *Microb Pathog* 33, 91-95.
58. Nakase, Y., Tateishi, M., Sekiya, K., and Kasuga, T. (1970) Chemical and biological properties of the purified O antigen of Bordetella pertussis, *Jpn J Microbiol* 14, 1-8.
59. Schaeffer, L. M., McCormack, F. X., Wu, H., and Weiss, A. A. (2004) Bordetella pertussis lipopolysaccharide resists the bactericidal effects of pulmonary surfactant protein A, *J Immunol* 173, 1959-1965.
60. Litwin, C. M., and Calderwood, S. B. (1993) Role of iron in regulation of virulence genes, *Clin Microbiol Rev* 6, 137-149.
61. Weinberg, E., Roth, J., Bolin, C., Brogden, K., Minion, F., and Wannemuehler, M. . (1995) Acquisition of iron and other nutrients in vivo Virulence mechanisms of bacterial pathogens, *Washington, D. C.: American Society for Microbiology*, 81-95.
62. Moore, C. H., Foster, L. A., Gerbig, D. G., Jr., Dyer, D. W., and Gibson, B. W. (1995) Identification of alcaligin as the siderophore produced by Bordetella pertussis and B. bronchiseptica, *J Bacteriol* 177, 1116-1118.
63. van den Berg, B. M., Beekhuizen, H., Willems, R. J., Mooi, F. R., and van Furth, R. (1999) Role of Bordetella pertussis virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract, *Infect Immun* 67, 1056-1062.
64. Munoz, J. J. (1988) Action of pertussigen (pertussis toxin) on the host immune system in pathogenesis and immunity in pertussis, *Pathogenesis and immunity in pertussis. John Wiley & Sons, Ltd., New York, N.Y.*, 173-192.

65. Bosch, A., Serra, D., Prieto, C., Schmitt, J., Naumann, D., and Yantorno, O. (2006) Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy, *Appl Microbiol Biotechnol* 71, 736-747.
66. Serra, D., Bosch, A., Russo, D. M., Rodriguez, M. E., Zorreguieta, A., Schmitt, J., Naumann, D., and Yantorno, O. (2007) Continuous nondestructive monitoring of *Bordetella pertussis* biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy and other corroborative techniques, *Anal Bioanal Chem* 387, 1759-1767.
67. Lamberti, Y., Gorgojo, J., Massillo, C., and Rodriguez, M. E. (2013) *Bordetella pertussis* entry into respiratory epithelial cells and intracellular survival, *Pathog Dis* 69, 194-204.
68. Lamberti, Y. A., Hayes, J. A., Perez Vidakovics, M. L., Harvill, E. T., and Rodriguez, M. E. (2010) Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages, *Infect Immun* 78, 907-913.
69. Tatti, K. M., Sparks, K. N., Boney, K. O., and Tondella, M. L. (2011) Novel multitarget real-time PCR assay for rapid detection of *Bordetella* species in clinical specimens, *J Clin Microbiol* 49, 4059-4066.
70. Muller, F. M., Hoppe, J. E., and Wirsing von Konig, C. H. (1997) Laboratory diagnosis of pertussis: state of the art in 1997, *J Clin Microbiol* 35, 2435-2443.
71. Lievano, F. A., Reynolds, M. A., Waring, A. L., Ackelsberg, J., Bisgard, K. M., Sanden, G. N., Guris, D., Golaz, A., Bopp, D. J., Limberger, R. J., and Smith, P. F. (2002) Issues associated with and recommendations for using PCR to detect outbreaks of pertussis, *J Clin Microbiol* 40, 2801-2805.
72. Halperin, S. A., Bortolussi, R., Langley, J. M., Miller, B., and Eastwood, B. J. (1997) Seven days of erythromycin estolate is as effective as fourteen days for the treatment of *Bordetella pertussis* infections, *Pediatrics* 100, 65-71.
73. Aoyama, T., Sunakawa, K., Iwata, S., Takeuchi, Y., and Fujii, R. (1996) Efficacy of short-term treatment of pertussis with clarithromycin and azithromycin, *J Pediatr* 129, 761-764.
74. Nacion, M. d. S. d. I. (2013) Calendario de vacunación obligatorio.
75. Zobell, C. E. (1943) The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity, *J Bacteriol* 46, 39-56.
76. Zobell, C. E., and Allen, E. C. (1935) The Significance of Marine Bacteria in the Fouling of Submerged Surfaces, *J Bacteriol* 29, 239-251.
77. Costerton, J. W., Geesey, G. G., and Cheng, K. J. (1978) How bacteria stick, *Sci Am* 238, 86-95.
78. Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clin Microbiol Rev* 15, 167-193.
79. Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., and Marrie, T. J. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease, *Annu Rev Microbiol* 41, 435-464.
80. Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., and Ciofu, O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms, *Int J Antimicrob Agents* 35, 322-332.
81. Holah, J. T. a. I. R. K. (1992) Introduction to biofilms in the food industry, *Biofilm-Science and Technology*. Kluwer Academic Press, 35-41.
82. Carpentier, B., and Cerf, O. (1993) Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry, *J Appl Bacteriol* 75, 499-511.
83. O'Toole, G., Kaplan, H. B., and Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development, *Annu Rev Microbiol* 54, 49-79.
84. Davey, M. E., and O'Toole G, A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics, *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 847-867.
85. Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., and Penades, J. R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation, *J Bacteriol* 183, 2888-2896.
86. Pringle, J. H., and Fletcher, M. (1986) Influence of substratum hydration and adsorbed macromolecules on bacterial attachment to surfaces, *Appl Environ Microbiol* 51, 1321-1325.
87. Pratt, L. A., and Kolter, R. (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili, *Mol Microbiol* 30, 285-293.

88. Hall-Stoodley, L., and Stoodley, P. (2002) Developmental regulation of microbial biofilms, *Curr Opin Biotechnol* 13, 228-233.
89. Davies, D. G., Chakrabarty, A. M., and Geesey, G. G. (1993) Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*, *Appl Environ Microbiol* 59, 1181-1186.
90. Maira-Litran, T., Kropec, A., Abeygunawardana, C., Joyce, J., Mark, G., 3rd, Goldmann, D. A., and Pier, G. B. (2002) Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide, *Infect Immun* 70, 4433-4440.
91. Sutherland, I. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework, *Microbiology* 147, 3-9.
92. Garcia, B., Latasa, C., Solano, C., Garcia-del Portillo, F., Gamazo, C., and Lasa, I. (2004) Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation, *Mol Microbiol* 54, 264-277.
93. Wai, S. N., Mizunoe, Y., Takade, A., Kawabata, S. I., and Yoshida, S. I. (1998) *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation, *Appl Environ Microbiol* 64, 3648-3655.
94. Lasa, I., Del Pozo, J. L., Penades, J. R., and Leiva, J. (2005) [Bacterial biofilms and infection], *An Sist Sanit Navar* 28, 163-175.
95. Sauer, K., Cullen, M. C., Rickard, A. H., Zeef, L. A., Davies, D. G., and Gilbert, P. (2004) Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm, *J Bacteriol* 186, 7312-7326.
96. Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Lossner, I., Gotz, F., and Hacker, J. (1999) A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256, *Mol Microbiol* 32, 345-356.
97. Serra, D. O. (2008) Caracterización Fenotípica de *Bordetella pertussis* Creciendo en Cultivos Continuos en *Biofilm*, In *Facultad de Ciencias Exactas*, UNLP, La Plata.
98. Stewart, P. S. (2003) Diffusion in biofilms, *J Bacteriol* 185, 1485-1491.
99. James, G. A., Beaudette, L., and Costerton, J. W. (1995) Interspecies bacterial interactions in biofilms, *Journal of Industrial Microbiology* 15, 257-262.
100. Serra, D. O., Richter, A. M., Klauck, G., Mika, F., and Hengge, R. (2013) Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm, *MBio* 4, e00103-00113.
101. Miller, M. B., and Bassler, B. L. (2001) Quorum sensing in bacteria, *Annu Rev Microbiol* 55, 165-199.
102. Waters, C. M., and Bassler, B. L. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria, *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 319-346.
103. O'Toole, G. A., Gibbs, K. A., Hager, P. W., Phibbs, P. V., Jr., and Kolter, R. (2000) The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol* 182, 425-431.
104. Vidal, O., Longin, R., Prigent-Combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M., and Lejeune, P. (1998) Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression, *J Bacteriol* 180, 2442-2449.
105. Adams, J. L., and McLean, R. J. (1999) Impact of rpoS deletion on *Escherichia coli* biofilms, *Appl Environ Microbiol* 65, 4285-4287.
106. Jackson, D. W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J. W., Hart, M. E., and Romeo, T. (2002) Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*, *J Bacteriol* 184, 290-301.
107. Tischler, A. D., and Camilli, A. (2004) Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation, *Mol Microbiol* 53, 857-869.
108. Jefferson, K. K. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm?, *FEMS Microbiol Lett* 236, 163-173.

109. Medhekar, B., Shrivastava, R., Mattoo, S., Gingery, M., and Miller, J. F. (2009) Bordetella Bsp22 forms a filamentous type III secretion system tip complex and is immunoprotective in vitro and in vivo, *Mol Microbiol* 71, 492-504.
110. Conover, M. S., Sloan, G. P., Love, C. F., Sukumar, N., and Deora, R. (2010) The Bps polysaccharide of Bordetella pertussis promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin, *Mol Microbiol* 77, 1439-1455.
111. Mishra, M., Parise, G., Jackson, K. D., Wozniak, D. J., and Deora, R. (2005) The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in Bordetella, *J Bacteriol* 187, 1474-1484.
112. Conover, M. S., Redfern, C. J., Ganguly, T., Sukumar, N., Sloan, G., Mishra, M., and Deora, R. (2012) BpsR modulates Bordetella biofilm formation by negatively regulating the expression of the Bps polysaccharide, *J Bacteriol* 194, 233-242.
113. Serra, D. O., Conover, M. S., Arnal, L., Sloan, G. P., Rodriguez, M. E., Yantorno, O. M., and Deora, R. (2011) FHA-Mediated Cell-Substrate and Cell-Cell Adhesions Are Critical for Bordetella pertussis Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and in the Mouse Nose and the Trachea, *PLoS One* 6, e28811.
114. Sisti, F., Ha, D. G., O'Toole, G. A., Hozbor, D., and Fernandez, J. (2013) Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in Bordetella bronchiseptica, *Microbiology* 159, 869-879.

Capítulo II

Estudios comparativos sobre la capacidad de formación de *biofilm* de aislados clínicos locales de *B. pertussis* y la cepa de referencia Tohama I. Empleo de proteómica comparativa y análisis de expresión génica mediante real time PCR

Índice

II.1 INTRODUCCIÓN	49
II.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
II.2.1 CULTIVOS EN PLACA Y PLANCTÓNICOS.....	53
II.2.1.i Microorganismos y condiciones de cultivo planctónico	53
II.2.1.ii Cinética de crecimiento en medios líquidos.....	54
II.2.1.iii Cultivos planctónicos para aislamiento de proteínas y ARN.	54
II.2.2 CULTIVOS EN BIOFILM.....	55
II.2.2i Cultivos para evaluar la capacidad formadora de biofilm.....	55
II.2.2ii Cultivos en biofilm para purificación de ARN y proteínas	56
II.2.2iii Cinética de crecimiento de cultivos en biofilm y cinética de adhesión a perlas de polipropileno.	56
II.2.2iv Cuantificación de la adhesión y formación de biofilms de cepas de <i>Bordetella pertussis</i> sobre superficies abióticas mediante tinción con cristal violeta	57
II.2.2v Métodos estadísticos aplicados al análisis de las diferencias de adhesión y formación de biofilm.....	57
II.2.3 Métodos proteómicos y de PCR en tiempo real aplicados al estudio del fenotipo del aislado clínico BP2723 y la cepa de referencia <i>B.pertussis</i> TOHAMA I creciendo en biofilm	57
II.2.3i Obtención de la fracción de proteínas solubles, cuantificación y análisis por SDS-PAGE....	57
II.2.3ii Tinción de proteínas con colorantes fluorescentes.....	58
II.2.3iii Electroforesis 2D.....	59
II.2.3iv Adquisición de imágenes y análisis univariado de datos.....	60
II.2.3v Digestión trípica en gel y Espectrometría de Masas MALDI-TOF.....	60
II.2.3vi Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc.....	61
II.2.3vii Condiciones de PCR en tiempo real y análisis de resultados.....	62
II.2.4 Secuenciameinto de genes asociados a virulencia de cepas clínicas.....	63
II.3 RESULTADOS.....	64
II.3.1 Formación de biofilm sobre perlas de polipropileno por parte de ocho aislados clínicos y la cepa de referencia <i>B. pertussis</i> Tohama I	64

II.3.2 Cinética de crecimiento de las cepas <i>B. pertussis</i> Tohama I y el aislado Bp2723 en medio líquido y adheridos a superficie formando biofilm	65
II.3.3 Análisis fenotípico de las cepas Bp2723 y <i>B. pertussis</i> Tohama I creciendo en biofilm través de la técnica 2D-DIGE	66
II.3.4 Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente en biofilm y en cultivo planctónico por la cepa Bp2723 en relación a la cepa Tohama I	71
II.3.5 Análisis de expresión génica utilizando la técnica de PCR en tiempo real	74
II.3.5 Secuenciamiento de los genes del sistema BvgAS y factores de virulencia en el aislado clínico Bp2723	78
II.3.6 Formación de <i>biofilm</i> por parte de la cepa mutante BpK ₇₀₅ →E y ensayos de adhesión con bacterias moduladas.	82
II.4 DISCUSIÓN	84
II.5 CONCLUSIONES	89
II.6 BIBLIOGRAFÍA	90

II.1 INTRODUCCIÓN

El conocimiento de los mecanismos de adaptación microbiana tanto a la inmunidad derivada del empleo de vacunas como a las acciones terapéuticas plantea un gran esfuerzo biotecnológico y una necesidad constante para el sector de salud pública. El desafío que representa controlar a los organismos patógenos no se limita a comprender la patogénesis de los mismos, sino que a partir de este conocimiento esencial se debe tratar de mejorar las estrategias de lucha contra las enfermedades que ocasionan. En el caso particular de tos convulsa o pertussis, en los últimos años se han postulado varios mecanismos de adaptación microbiana que parecen haber contribuido al éxito de la persistencia del agente etiológico en su hospedador natural en respuesta a los permanentes esfuerzos para erradicar la enfermedad (1-5). En este sentido es importante recordar que después de más de 60 años de vacunación sistemática contra pertussis, la enfermedad no ha podido todavía ser controlada, lo cual es una clara indicación de que las estrategias de prevención utilizadas, como el empleo de vacunas celulares y acelulares no han sido lo suficientemente efectivas. En los últimos años se ha hecho especial hincapié en los estudios sobre invasión y persistencia de estos patógenos en el tracto respiratorio del único hospedador conocido de *Bordetella pertussis*, el ser humano. A efectos de poder enfrentar de manera más efectiva a estos organismos se ha reportado la necesidad de mantener actualizadas las formulaciones de vacunas en respuesta a las formas de “adaptación” del patógeno a las mismas y a las estrategias de control de su hospedador. Aunque pertussis es considerada una enfermedad aguda, de alguna manera, estas bacterias logran persistir generando focos infecciosos de enorme peligro para la población en riesgo (6-9). Por estos motivos resulta de gran interés clínico el estudio de las posibles formas de persistencia de estos patógenos, con el objeto de mejorar las acciones terapéuticas e iniciar una lucha más adecuada en lo que se refiere a prevención.

Como se mencionó en el capítulo I, es sabido que muchos microorganismos se organizan en comunidades denominadas *biofilms* para poder persistir en nichos ecológicos desfavorables (10, 11). Dentro de estas estructuras, las bacterias se encuentran protegidas contra antibióticos y/o componentes del sistema inmune (12-15). Varios estudios, incluidos los de nuestro laboratorio, han demostrado la capacidad de la cepa de referencia de *B. pertussis* Tohama I de formar *biofilms* tanto *in vitro* como *in vivo*; lo cual nos ha llevado a postular esta

forma de vida como un posible mecanismo de persistencia del patógeno en su hospedador (82, 51). El estudio de la expresión fenotípica de las bacterias sésiles (crecen adheridas a soportes) resulta así de gran importancia para entender los cambios moleculares que acompañan la adaptación microbiana a esta forma de vida.

Una técnica que ha sido ampliamente implementada en el estudio fenotípico diferencial en microorganismos patógenos es la proteómica 2D (16-24). Esta metodología permite realizar un análisis de la expresión de proteínas aprovechando la separación de las mismas en geles corridos en dos dimensiones, lo cual permite lograr una mejor separación y aumentar de este modo la sensibilidad. La proteómica 2D consta de dos etapas, en la primera de ellas se separan las proteínas de una muestra según su punto isoeléctrico (PI). Para lograrlo, se suspenden las proteínas en un *buffer* adecuado y se separan en un gel que posee un gradiente de pH inmovilizado. De esta manera, al aplicarse una diferencia de potencial, las proteínas migran según su carga hasta encontrar el pH correspondiente a su punto isoeléctrico. Una vez concluida esta etapa, se procede a la separación de las proteínas en geles de poliacrilamida donde son separadas según su peso molecular. Al cabo de esta segunda etapa de separación se procede al análisis de los geles. Las proteínas diferencialmente expresadas son escindidas e identificadas a través de la técnica de Espectrometría de Masas de Tiempo de Vuelo con Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz (MALDI-TOF MS). El fundamento de esta metodología es el siguiente: la suspensión de proteínas se mezcla con ácido α -ciano(4)hidroxicinámico en exceso y se deposita sobre una superficie de metal de modo que ambos co-cristalicen cuando se evapora el solvente. En el espectrómetro de masas MALDI-TOF, esta preparación es sometida a la acción de pulsos cortos del láser en alto vacío, lo que provoca que la energía absorbida por parte de la matriz sea convertida en energía de excitación y se transfieran H^+ a la muestra (ionización) dando lugar a especies por lo general mono cargadas. El área irradiada aumenta su temperatura, generando la desorción de las especies cargadas de la fase sólida a la fase gaseosa para dirigirse hacia el analizador de tiempo de vuelo (TOF, *time of flight*). Allí, tras ser aceleradas por un campo eléctrico en una región de alto vacío, se ordenan en función de su relación masa-carga. La señal de aquellas moléculas que volaron y fueron detectadas es representada en un espectro de masas. Estos espectros son luego analizados por comparación con bases de datos existentes y de esta forma se logra la identificación de las proteínas que se encontraban en la muestra original (17, 25).

Existen varias maneras de visualizar las proteínas presentes en los geles de poliacrilamida. Una de ellas consiste en utilizar moléculas fluorescentes para marcar las proteínas de una muestra; esta metodología da lugar a la técnica denominada 2D-DIGE (del inglés, 2D-Differential In Gel Electrophoresis). Los marcadores fluorescentes reaccionan con las aminas terciarias de las lisinas generando grupos imida (26). Existen diferentes fluoróforos, que si bien presentan similitud en su carga y masa poseen perfiles de excitación-emisión diferentes, permitiendo revelar distintos marcadores presentes en un mismo gel al excitarlos con diferentes filtros. De esta manera se pueden revelar muestras diferentes marcadas con distintos fluoróforos en un mismo gel, disminuyendo las variaciones debidas a separaciones de muestras en geles diferentes (26, 27). En la Figura 1 se muestran los perfiles de emisión de los fluoróforos de cianina comerciales.

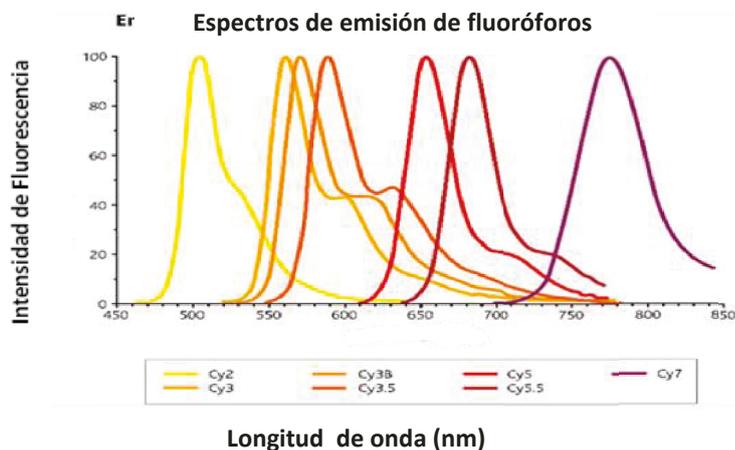


Fig. 1. Espectros de emisión de distintos marcadores fluorescentes. Tomado de: <http://www.crbdiscovery.com/technical/labelling/fluorescent-dyes/proprietary-dyes.php>

Otra técnica que ha sido ampliamente utilizada para la caracterización fenotípica asociada al estudio de expresión de genes es la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (del inglés, quantitative *Real time* PCR). Esta metodología ha sido aplicada a la caracterización de perfiles de virulencia en hongos y bacterias y ha demostrado ser una herramienta valiosa en el estudio de los perfiles de expresión génica en cultivos en *biofilm* (28-31). Permite analizar de manera comparativa el nivel de transcripción génica entre diferentes muestras. Tiene su fundamento en la detección de fragmentos cortos de amplificación utilizando una sonda fluorescente que se une a ácidos nucleicos de doble cadena, de este modo, luego de cada ciclo de PCR, se realizan lecturas de fluorescencia y se puede lograr un seguimiento en

tiempo real de los productos de amplificación. En este tipo de metodologías se puede utilizar como molde tanto ADN como ADNc (ADN complementario), generado a partir de moléculas de ARN; de esta manera se pueden realizar estudios de expresión relativa del ARN original aislado o cuantificar la cantidad de ácido nucleico original presente en la muestra (32, 33).

La cepa de referencia de *B. pertussis* Tohama I fue aislada en la década de 1950 y si bien la mayoría de los estudios sobre esta especie se han centrado en el análisis de la misma, es ampliamente reconocido que en la actualidad ya no representa cabalmente a los organismos circulantes. En este capítulo hemos tratado de avanzar en el conocimiento del comportamiento de aislados clínicos locales, en cuanto a su capacidad para formar *biofilm*. Los estudios realizados se han iniciado comparando el crecimiento adherido a superficies de la cepa Tohama I frente a una serie de aislados clínicos recuperados de pacientes con tos convulsa en el Servicio de Bacteriología del Hospital de Niños de La Plata. Se obtuvieron resultados sobre el desarrollo de biomasa adherida a soportes así como de la expresión fenotípica de células sésiles. En este último caso se comparó la cepa vacunal *B. pertussis* Tohama I con un aislado clínico circulante (Bp2723), seleccionado por su alta capacidad de formación de *biofilm*.

Los objetivos específicos de esta parte del trabajo fueron:

- Caracterizar la formación de *biofilm* por parte de aislados clínicos de *Bordetella pertussis* recuperados de pacientes infectados en la región,
- Determinar las diferencias fenotípicas existentes entre un aislado clínico y la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I creciendo en *biofilm*,
- Determinar si en su adaptación a la vida en *biofilm* por parte de los aislados clínicos se detectan cambios moleculares asociados a dicha adaptación.

II.2 MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1 CULTIVOS EN PLACA Y PLANCTÓNICOS.

II.2.1.i Microorganismos y condiciones de cultivo planctónico

En el presente estudio se emplearon la cepa de referencia de *Bordetella pertussis* Tohama I, cepas mutantes derivadas de la misma, así como también aislados clínicos de *B. pertussis* recuperados de pacientes con tos convulsa tratados en el Hospital de Niños de La Plata “Sor María Ludovica” entre el año 2001 y 2007. Las características de estos organismos se detallan en la Tabla 1. Todas las cepas fueron cultivadas y mantenidas en placas de agar Bordet-Gengou (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) suplementadas con 15% v v⁻¹ de sangre de carnero defibrinada (ABGs). La sangre fue provista por el Instituto Biológico del Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires (La Plata, Buenos Aires). Para los cultivos planctónicos, las bacterias fueron crecidas a 37°C en el medio sintético Stainer-Scholte (SS). Este medio de cultivo está compuesto por un conjunto de componentes esterilizables por vapor, en g L⁻¹: Glutamato monosódico 10,70; L-Prolina 0,24; KH₂PO₄ 0,5; KCl 0,20; MgCl₂.6H₂O 0,20; solución al 1% de CaCl₂ 2mL; Tris-HCl 1,52; NaCl 2,50; y por otros componentes que son esterilizables por filtración, utilizando una membrana de 0,22 µm: 10 mg L⁻¹ SO₄Fe.4.H₂O; 40 mg L⁻¹ L-cistina; 0,1 mL L⁻¹ HCl; 20 mg L⁻¹ ácido ascórbico; 4 mg L⁻¹ ácido nicotínico y 100 mg L⁻¹ L-glutatió reducido. Las cepas mutantes se cultivaron en las condiciones de restricción recomendadas para lo cual los medios de cultivo fueron suplementados con Estreptomicina, 50 µg mL⁻¹ (Sigma St. Louis, MO, USA).

El crecimiento de las cepas bajo condiciones de modulación se llevó a cabo adicionando a las placas de cultivo sólido y a los medios líquidos, 40mM de MgSO₄. Se utilizó la expresión de Adenilato ciclasa hemolisina como marcador de modulación ya que éste es el primer factor de virulencia que inhibe su expresión en el cambio de fase.

El *buffer* utilizado para los lavados fue PBS, obtenido a partir de la disolución de 8g L⁻¹ de NaCl, 0.2g de KCl, 1.44g de Na₂HPO₄ y 0.24g de KH₂PO₄, llevados a pH= 7,4-7,6 con HCl.

Tabla1- Listado de cepas de *Bordetella pertussis* utilizadas en este trabajo, su año y lugar de aislamiento y características serológicas.

Cepa	Año de aislamiento	Edad del paciente (semanas)	Fuente	PtxA	Fim	Prn
Bp Tohama I	1954	-----	France	2	2	1
Bp 2723	2001	8	Argentina	1	3	1
Bp 1938	2003	12	Argentina	1	3	2
Bp 2930	2004	17	Argentina	1	3	2
Bp 3495	2004	4	Argentina	1	3	2
Bp 7470	2005	8	Argentina	1	3	2
Bp 162	2006	8	Argentina	1	3	2
Bp 462	2006	6	Argentina	1	3	2
Bp 892	2007	12	Argentina	1	3	2
Bp _{K705} → E	2009	-----	Francia	2	2	1
BPSM	1994	-----	Bélgica	2	2	1

II.2.1.ii Cinética de crecimiento en medios líquidos

A partir de colonias crecidas en placas ABGs se inocularon frascos Erlenmeyers de 500 mL conteniendo 100 mL del medio SS los cuales se incubaron durante 24 h a 37°C en agitación (160 rpm). La suspensión celular obtenida fue utilizada para inocular un Erlenmeyer de 1 L de capacidad conteniendo 200 mL de medio SS fresco. Para iniciar estos cultivos la densidad óptica inicial a 650 nm se ajustó a un valor de 0,2 ($DO_{\text{inicial-650}} = 0,2$). Los frascos resultantes se incubaron a 37°C durante 40 h en agitación tomándose muestras cada dos horas para determinar la DO_{650} . Los cultivos fueron realizados por triplicado tanto para la cepa *B. pertussis* Tohama I como para la cepa Bp2723. Con los datos obtenidos se graficaron curvas de DO vs tiempo.

II.2.1.iii Cultivos planctónicos para aislamiento de proteínas y ARN.

Los cultivos planctónicos se iniciaron a partir de colonias crecidas en ABGs que se utilizaron para inocular frascos Erlenmeyer de 100 mL de capacidad conteniendo 30 mL de medio de

cultivo SS. Los mismos fueron incubados 20 h a 37°C en agitación (160 rpm). Estos cultivos se utilizaron como inóculo para la obtención de los cultivos finales. En el caso de los cultivos para aislamiento de proteínas, se inocularon frascos Erlenmeyer de 1L de volumen total conteniendo 200 mL de medio SS con una $DO_{\text{inicial-650}}=0,2$. Se incubaron por 24 h a 37°C en agitación (160 rpm). Luego de este tiempo las células fueron cosechadas por centrifugación (8000xg, 20 min a 4°C) y los *pellets* fueron congelados inmediatamente utilizando N₂ líquido y almacenados a -80°C. Cada cultivo se realizó por triplicado. En el caso de los cultivos para aislamiento de ARN, se siguieron los mismos pasos con la diferencia de que el volumen de cultivo utilizado fue de 30 mL (en frascos Erlenmeyer de 100 mL de volumen total) y el almacenamiento se realizó en 1 mL de RNAlater (Invitrogen) a -20°C hasta su utilización.

II.2.2 CULTIVOS EN *BIOFILM*

II.2.2i Cultivos para evaluar la capacidad formadora de *biofilm*

Las experiencias de crecimiento en *biofilm* fueron hechas empleando ocho aislados clínicos, así como también la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I y las cepas BpSM (cepa resistente a estreptomicina derivada de la cepa Bp Tohama I) y Bp_{K705→E} (cepa mutante derivada de la cepa BPSM con un intercambio de nucleótidos en la posición 2113 del gen codificante para la proteína sensora BvgS de una A por una G. La cepa fue generosamente cedida por el Dr. Françoise Dubuisson del Instituto Pasteur de Lille, Francia). Los ensayos fueron realizados en tubos de vidrio cilíndricos de 3 cm de diámetro y 30 cm de altura. Dichos reactores se rellenaron con 20 g de perlas de polipropileno que fueron utilizadas como soporte para el desarrollo de los *biofilms* (4.2 mm de diámetro y 2 mm de altura, con una densidad promedio de 0.901 g L⁻¹, Petroken S.A., Argentina). Los tubos fueron inicialmente inoculados con 20 mL de una suspensión bacteriana de $DO_{650}=1$ e incubados estáticamente por 4 h a 37°C para permitir la adhesión de las bacterias a la superficie. Posteriormente a esta etapa de adhesión, la suspensión microbiana con las células no adheridas fue removida por drenaje, luego de lo cual un volumen igual de medio fresco fue agregado a cada uno de los tubos para iniciar el crecimiento. Los tubos se incubaron durante 72 h a 37°C con agitación tipo *roller* (140 rpm) para evaluar la biomasa del *biofilm* maduro formada en cada caso. Cada 24 h el medio de cultivo fue reemplazado por medio SS fresco para mantener las condiciones nutricionales de las bacterias. Luego de 72 h las perlas fueron removidas y lavadas con *buffer* PBS estéril tres veces.

II.2.2ii Cultivos en *biofilm* para purificación de ARN y proteínas

Los cultivos en *biofilm* del aislado clínico Bp2723 y de la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I fueron realizados en columnas de vidrio de 5 cm de diámetro y 55 cm de altura rellenas con 100 g de perlas de polipropileno. Para cada cultivo las columnas fueron inoculadas asépticamente con 130 mL de una suspensión de bacterias con una $DO_{650}=1$ e incubadas de forma estática por 4 h a 37°C a fin de permitir la adhesión bacteriana al soporte. Luego de esta etapa, las suspensiones fueron drenadas de modo de eliminar las células no adheridas y las columnas fueron recargadas con medio SS fresco (100 mL). Las columnas se incubaron con aireación (0.1 L min^{-1}) durante 72 h a 37°C. Cada 24 h el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco. Al cabo de las 72 h de cultivo, las perlas fueron colectadas en un frasco estéril y lavadas tres veces con PBS. Luego las mismas fueron suspendidas en 100 mL del mismo *buffer*; y con el fin de desprender el *biofilm* de los soportes se procedió a agitar las perlas a 160 rpm durante 15 min de modo de remover mecánicamente las bacterias sésiles. Posteriormente, con el objetivo de separar las células de la matriz del *biofilm* se centrifugó a 8000xg durante 20 min a 4°C y las células cosechadas fueron inmediatamente congeladas utilizando N_2 líquido o re-suspendidas en RNALater (2 mL) y conservadas a -80°C o -20°C respectivamente. Todos los cultivos fueron realizados por triplicado para el aislamiento de ARN y por sextuplicado para el aislamiento de proteínas ya que la cantidad de biomasa requerida fue mayor (con dos columnas se obtuvo un replicado).

II.2.2iii Cinética de crecimiento de cultivos en *biofilm* y cinética de adhesión a perlas de polipropileno.

Para llevar a cabo el recuento de células viables de los cultivos en *biofilm* se realizaron cultivos en columna para las cepas *B. pertussis* Tohama I y Bp2723. Después de 4, 24, 48, 72 y 96 h de cultivo se colectaron perlas provenientes de columnas independientes, las cuales fueron lavadas tres veces con PBS estéril para remover las bacterias no adheridas. Posteriormente se desprendieron los *biofilms* del soporte mediante agitación de las perlas inmersas en 100 mL de PBS estéril a 160 rpm. A partir de esas muestras se realizó el recuento de células viables a cada tiempo y se construyó la curva $UFC \text{ cm}^{-2}$ vs tiempo de crecimiento.

Las cepas *B. pertussis* Tohama I, Bp2723, $Bp_{K \rightarrow E705}$ y BPSM moduladas fueron estudiadas para determinar su capacidad de adherirse a perlas de polipropileno. Brevemente, luego de

ser moduladas, las cepas se lavaron con *buffer* PBS para eliminar el $MgSO_4$ y se utilizaron para preparar suspensiones de $DO_{650}=1$ en medio SS fresco; con dichas suspensiones se inocularon tubos de vidrio conteniendo 10 g de perlas de polipropileno limpias. Cada columna se incubó a 37°C en condiciones estáticas. Cada 30 min se tomaron muestras de perlas, que se lavaron tres veces con PBS estéril y se secaron durante 2 h para luego ser teñidas con cristal violeta y determinar la biomasa adherida. Con los valores de Absorbancia (Abs.) a 590nm se graficaron las curvas Abs_{590} vs. tiempo.

II.2.2iv Cuantificación de la adhesión y formación de *biofilms* de cepas de *Bordetella pertussis* sobre superficies abióticas mediante tinción con cristal violeta

Para la evaluación rápida de las células adheridas y formación de *biofilm* sobre superficies abióticas se utilizó la tinción con cristal violeta publicada por O'Toole y col. (34) con modificaciones acordes al sistema. Luego de lavar las perlas con *buffer* PBS, las mismas fueron transferidas a tubos de vidrio limpios e incubadas 2 h a 60°C para permitir la fijación de las células a los soportes. Luego, se transfirieron 10 g de perlas a 5 tubos de vidrio limpios (2 g por tubo) y se incubaron con una solución de cristal violeta (CV) 0.1% durante 20 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se lavaron las perlas con agua destilada tres veces de modo de eliminar el exceso de colorante y luego se solubilizó el colorante retenido por las células adheridas a las perlas en 7.5 mL de una mezcla etanol: acetona (80:20) y se midió la absorbancia a 590 nm.

II.2.2v Métodos estadísticos aplicados al análisis de las diferencias de adhesión y formación de *biofilm*.

Diferencias significativas en el porcentaje de células adheridas a perlas de polipropileno se determinaron utilizando un ensayo de Análisis de Varianza de una vía (ANOVA), con grado de significación $\leq 0,05$ (*).

II.2.3 Métodos proteómicos y de PCR en tiempo real aplicados al estudio del fenotipo del aislado clínico BP2723 y la cepa de referencia *B.pertussis* TOHAMA I creciendo en *biofilm*

II.2.3i Obtención de la fracción de proteínas solubles, cuantificación y análisis por SDS-PAGE.

Las células provenientes de cultivos planctónicos y sésiles de las cepas *B. pertussis* Tohama I y del aislado clínico Bp2723 luego de congeladas y liofilizadas fueron suspendidas en un

buffer de lisis de la siguiente composición: 7 M de urea, 2M de tiourea, 4 % CHAPS y 30 mM TRIS y utilizadas para la obtención de proteínas citosólicas siguiendo el protocolo descrito por Ehling-Schulz y colaboradores (35). Brevemente, las células fueron fragmentadas haciendo pasar las muestras dos veces por una prensa Francesa (Aminco French Press) operada con una presión de 140 mPa. Los restos celulares no fragmentados fueron separados por centrifugación a 10000xg durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes fueron transferidos a tubos de ultracentrífuga (Beckman, USA) y centrifugados a 30000xg durante 40 min a 15 °C de modo de obtener en el sobrenadante la fracción de proteínas solubles. Para la determinación de la concentración proteica se utilizó el kit 2D-Quant kit (GE, Healthcare, Amersham Biosciences, USA), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Se realizó para ello una curva de calibración utilizando seroalbúmina bovina (BSA) y las determinaciones se realizaron por duplicado. Una vez determinada la concentración de proteínas, las muestras fueron alicuotadas y almacenadas a -80°C hasta su utilización.

Para examinar la calidad de las muestras, las mismas fueron estudiadas a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) siguiendo el procedimiento descrito por Görg y col. (36). Los geles fueron visualizados por tinción con AgNO₃. Una de las muestras aunque mostró buena calidad de bandas en su observación por SDS-PAGE, no presentó la concentración de proteínas suficiente para llevar a cabo los análisis de proteómica 2D, por lo cual se recurrió a aumentar la concentración a través de la utilización de una columna ViVaspin 500 (Sartorius Stedim Biotech, Gottingen, Alemania) con un límite de corte de 500 Da generándose una muestra adecuada para su posterior utilización.

II.2.3ii Tinción de proteínas con colorantes fluorescentes

La tinción para electroforesis en gel diferencial (DIGE) fue desarrollada siguiendo lo descrito por Radwan y col. (37) con algunas modificaciones. Se utilizaron los fluoróforos CyDye DIGE™ (GE Healthcare, Life Science, Munich, Alemania) para teñir 33 µg de proteínas por muestra utilizando 8nmol colorante mg⁻¹ de proteína. La tinción fue realizada por mezclado de las dos soluciones en baño de hielo. Para cada experimento se utilizaron tres replicados biológicos. Tanto las muestras de proteínas provenientes de cultivos planctónicos como de *biofilms* de cada cepa fueron marcadas con los fluoróforos Cy3 y Cy5. El estándar interno fue preparado mezclando 33 µg de cada muestra y fue marcado con el fluoróforo Cy2. En cada gel se separaron dos muestras y un estándar interno.

II.2.3iii Electroforesis 2D

Las fracciones citosólicas de las células obtenidas a partir de cultivos planctónicos y en *biofilm* de las cepas *B. pertussis* Tohama I y Bp2723 fueron analizadas utilizando la técnica de electroforesis 2D con tinción fluorescente (2D-DIGE) siguiendo los protocolos establecidos por Grunert y col. (38). La separación de las proteínas en la primera dimensión se realizó mediante Isoelectroenfoque (IEF) utilizando geles con gradiente de pH inmovilizados (IPG, Immobilized pH gradient, GE Healthcare, Amersham Biosciences, USA). El gradiente de pH se logra en los IPGs a través de la copolimerización de “inmovilinas” junto con la matriz de acrilamida. Las proteínas fueron separadas utilizando geles IPG de 18 cm de longitud y rangos de pH: 4-7 y 6-9. Antes de sembrar los geles, los mismos fueron incubados toda la noche con una solución re-hidratante compuesta por: urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4 % y Serdotil 1% p/v a temperatura ambiente. Luego los IPGs fueron colocados en un equipo IPGphor III (GE Healthcare, Amersham Biosciences, USA) y las muestras fueron sembradas a través del sistema de carga en pocillo. Las condiciones de corrida para la separación en la primera dimensión para el rango de pH 4-7 fueron: paso 1, 150V por 2h; paso 2, 300V por 2h; paso 3, 600V por 1h, seguido por un gradiente con máximo en 8000V en 30 min (paso 4) y paso 5, 8000V por 4h con un total de 36 kWh. Para el rango de pH: 6-9, las condiciones de separación fueron las siguientes: paso 1, 100 V por 2h; paso 2, 300 V por 3 h; paso 4, 500 V por 3 h; paso 5, gradiente hasta 1400V en 30 min; paso 6, 1400V por 5 h; paso 6, gradiente hasta 3500 V en 3 h y finalmente el último paso a 3500 V por 2 h. El voltaje total aplicado fue de 27 kWh. Luego del IEF los IPGs fueron incubados 15 min con una solución de 1% wv^{-1} DTT y posteriormente con una solución de iodoacetamida 4% wv^{-1} durante 15 min para lograr la reducción y alquilación de las proteínas. Posteriormente a esta etapa, se procedió a la separación de proteínas en la segunda dimensión. Los geles IPGs fueron colocados en el extremo superior de los geles de poliacrilamida 12.5% y sellados con 0.5% de agarosa en *buffer* de electroforesis + Azul de Bromofenol. En cada corrida se utilizaron seis geles de poliacrilamida empleando un equipo Ettan Dalt Six Electrophoresis Chamber (GE Healthcare, Amersham Biosciences, USA), la corrida se llevó a cabo durante toda la noche a 78 mA seguida de 45 min a 39 mA. Además de la tinción fluorescente, los geles fueron teñidos con plata utilizando un protocolo compatible con la identificación por MALDI-TOF para su visualización durante el proceso de escisión (39).

II.2.3iv Adquisición de imágenes y análisis univariado de datos

Para el análisis comparativo de los perfiles de proteínas, tres geles por muestra fueron analizados. Las imágenes fluorescentes fueron obtenidas utilizando un scanner Typhoon 9400 (GE Healthcare) y su análisis fue realizado empleando el *software* DeCyder versión 7.0 (GE Healthcare). En una primera instancia se determinaron los *spots* a ser incluidos en la comparación definitiva, de modo que sólo se tuvieran en cuenta los *spots* que además de estar presentes en las muestras a comparar, estuvieran presentes en los geles correspondientes a los estándares internos. En ese momento se procuró controlar la calidad de los *spots* utilizando algoritmos del *software* para controlar la calidad. Posteriormente se realizó la comparación entre los geles utilizando todos los replicados de cada muestra. El *match* fue realizado utilizando algoritmos del *software* y controlados manualmente. El análisis univariado de los perfiles de proteínas se realizó estableciendo el siguiente criterio: significancia estadística ≤ 0.05 (Prueba *t*) y límite de tolerancia en las diferencias ≥ 3 veces. Los *spots* seleccionados según el criterio establecido fueron escindidos manualmente de los geles luego de su tinción con plata (protocolo publicado por Grunert y col. (38)).

II.2.3v Digestión trípica en gel y Espectrometría de Masas MALDI-TOF

Los *spots* seleccionados fueron analizados por Espectrometría de Masas en Tiempo de Vuelo con Desorción/ Ionización Láser por Matriz (MALDI-TOF MS) siguiendo los procedimientos descritos por Radwan y col. (37). Los *spots* fueron desteñidos siguiendo el protocolo descrito por Gharahdagui y col. (40). Posteriormente se realizó la digestión de las proteínas para lo cual se agregó Tripsina (10 μL) de concentración $12.5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ en buffer conteniendo bicarbonato de amonio 50 mM y HCl 1 mM a cada porción de gel. Luego, las diferentes muestras fueron incubadas a 37°C durante 12-20 h. Posteriormente, las soluciones fueron transferidas a un nuevo tubo y el gel fue extraído con una solución de acetonitrilo 50% y ácido trifluoroacético 0.5% en sonicación durante 20 min. Las soluciones de estas nuevas extracciones fueron posteriormente combinadas con las soluciones de las digestiones originales y las muestras resultantes (conteniendo el total de la proteína escindida) fueron secadas utilizando una centrifuga de Speed Vac. Los péptidos fueron suspendidos en 3 μL de acetonitrilo 50% y ácido trifluoroacético 0.5%. Las huellas peptídicas (peptide mass fingerprints, PMF) se obtuvieron utilizando una solución de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (2 mg mL^{-1}), ácido trifluoroacético (1%), acetonitrilo (50%) y fosfato de amonio monobásico (10mM) como matriz. Para la identificación por espectroscopia de masas se utilizó un equipo

Ultraflex II (Bruker Daltonics) utilizando la calibración publicada por Radwan y col. (38). Para la generación de las huellas peptídicas a partir de los picos masa/carga se utilizó el software MASCOT (Matrix Science), el cual también fue utilizado para comparar las secuencias masa/masa con la base de datos de NCBI de *B. pertussis* Tohama I (acceso: NC 002929; Proteínas codificantes: 3436, www.ncbi.nlm.nih.gov). En todas las búsquedas se permitió la pérdida de un corte por péptido y se consideró una tolerancia de masa de 100 ppm. También se consideraron modificaciones parciales de las proteínas por carbamidometilación de las cisteínas y oxidación de las metioninas. Las proteínas se consideraron como identificadas cuando al menos 5 péptidos arrojaron *match* positivo y cuando el valor de expectativa fue menor que 0.05. Asimismo se verificó concordancia entre los valores de punto isoeléctrico y pesos moleculares teóricos y experimentales.

II.2.3vi Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc

El ARN de células obtenidas de cultivos planctónicos y *biofilms* de las cepas *B. pertussis* Tohama I y Bp2723 conservadas en RNALater a -20°C fue extraído con Trizol (Life Technology, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ARN fue evaluada a través de su separación en gel de agarosa 1% teñido con Bromuro de Etidio, se consideró una muestra de buena calidad cuando se observaron las tres bandas correspondientes a las fracciones de ARN ribosomal 23S, 16S y 5S en el gel. Luego de la determinación de la concentración del ARN aislado (mediante absorción a 280nm, Nanodrop, Thermo Scientific) se alícuotaron muestras de 1 µg que se almacenaron a -80°C. Posteriormente las alícuotas fueron descongeladas para su tratamiento con DNAsal y síntesis de ADNc siguiendo los protocolos establecidos por los fabricantes. Brevemente, se realizó un tratamiento con la enzima DNAsal (Promega, Madison, USA) por 45 min a 37°C para remover el ADN contaminante y luego se sintetizó el ADNc utilizando *random hexamers* (Promega, Madison, USA) como cebadores y la enzima retrotranscriptasa reversa M-MLV (Life Technology, Invitrogen). Para controlar la eficacia del tratamiento de remoción de ADN contaminante así como también de la obtención de ADNc se realizaron PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) control utilizando cebadores específicos para genes expresados por *B. pertussis* en ambas condiciones de crecimiento. El ADNc fue almacenado a -20°C.

II.2.3vii Condiciones de PCR en tiempo real y análisis de resultados

Se analizó la expresión diferencial de ARNm (ARN mensajero) entre la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I y la cepa Bp2723. Se estudiaron los siguientes genes: *bvgA*, *bvgS*, *ptxS*, *fhaB*, *bsp22*, *bcrh2*, *ompQ*, *vag8*, *brkA*, *bipA*, *fim2* (en el caso de *B. pertussis* Tohamal), *fim3* (en el caso de Bp2723) y *prn* utilizando los cebadores descritos en la Tabla 2. Para la visualización de los fragmentos de amplificación se utilizó el fluoróforo SYBR Green (Thermo Scientific). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95°C por 3 min para la activación de la enzima, seguido de cuarenta ciclos de: 95°C por 30 seg., 58°C 3 seg. y 72° 30 seg. Como gen *house keeping* se utilizó el gen *16S*, los cebadores utilizados para su amplificación fueron los publicados por Nicholson y col. (41) (ver Tabla 2). De cada condición de cultivo se analizaron triplicados y en cada corrida se incluyeron duplicados técnicos. Una vez finalizada la amplificación se obtuvieron los valores de ciclo de disparo (Ct) que fueron analizados según el modelo de $\Delta\Delta C_t$ siguiendo lo descrito por Conover y col. (42). En el caso del gen *bipA*, se debió modificar el modelo de análisis ya que los valores de eficiencia de los cebadores no se correspondían con los del gen *house keeping* por lo que se utilizó el modelo de Pfaffl. (43). Las diferencias de expresión de ARNm se consideraron significativas cuando el test de *Student* utilizado en la comparación de medias arrojó un valor de $p \leq 0.05$

Tabla 2- Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de productos de PCR en tiempo real.

Gen	Secuencia de cebadores	Gen	Secuencia de cebadores
<i>bvga</i>	F: 5'AGACCGTCAGCACCTACA	<i>fim2</i>	F: 5'TGGCCTCCTACGTA AAAAG
	R: 5'GAGGTCTATCAGTTCCACCA		R: 5'ACCACGGAAAAACCCATA
<i>bvgs</i>	F: 5'ATTACGTCAACCGCTACTTC	<i>fim3</i>	F: 5'GAGCTACACCCTGCGTATC
	R: 5'GTTCAGGATGGACATCAGTT		R: 5'CTTCCTTGGGTTTCTTCACG
<i>vag8</i>	F: 5'GGTTCAGTGGTAGAGAGCAC	<i>ompQ</i>	F: 5'GGTTCAGTGGTAGAGCAC
	R: 5'GTTGAGCAGGGACACATTAC		R: 5'GTTGAGCAGGGACACATTAC
<i>bsp22</i>	F: 5'GAACTCGAAAGTGCCCTACAC	<i>fhab</i>	F: 5'GCCACGATTTACGGTGCA
	R: 5'ATGTCCATCTGTTGCGTATT		R: 5'CAGCGTCGCGTCATGCT
<i>brkA</i>	F: 5'GACGCAGGAGTTCAAAG	<i>Prn</i>	F: 5'TGTTCCGCATGAATGTCTTC
	R: 5'TACGAAGCATAGAGGTTGTG		R: 5'TGTTGGCAAGGGTAAAGGTC
<i>bcrH2</i>	F: 5'CTATGCCTGCAGAAGACC	<i>bipA</i>	5'GACAGCGGTTTCTACCTGGA
	R: 5'GAATCTGGATAGAGCGTGAG		5'CGCCACCTTGAAGTCATTCT
<i>16S</i>	F: 5'TCAGCATGTCGCGGTGAAT	<i>ptxS</i>	5'AGAACAGGCTGGCTGACG
	R: 5'TGTGACGGGCGGTGTGTA		5'GAACGTCCGGTCAGATGG

II.2.4 SECUENCIAMIENTO DE GENES ASOCIADOS A VIRULENCIA DE CEPAS CLÍNICAS

El gen *bvgS* fue secuenciado para todos los aislados clínicos utilizados y también en el caso de la cepa *B. pertussis* Tohama I. Para ello se utilizaron cinco juegos de cebadores generando fragmentos de aproximadamente 500 pares de bases que fueron secuenciados por la empresa Macrogen (Seúl, Korea). En el caso de la cepa Bp2723 la totalidad del genoma fue secuenciado en el laboratorio del Dr. Fritz Mooi, en Nijmegen, Holanda. Para el secuenciamiento se utilizó un secuenciador 454 GS-FLX (Roche). Los *contigs* obtenidos fueron utilizados para comparar las secuencias de los genes analizados por qRT-PCR y sus regiones promotoras con las secuencias de la cepa BpTohama I utilizando la herramienta *BLAST* de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

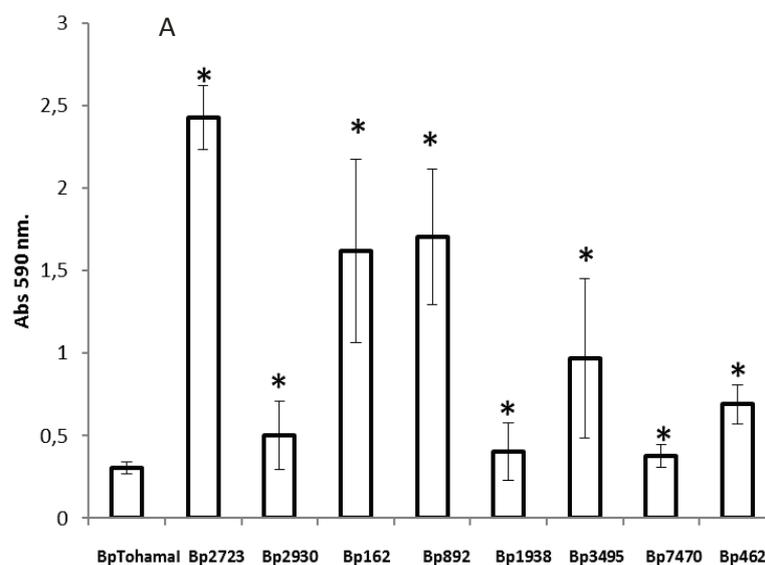
Tabla 3- Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación del gen *bvgS*.

Dominio	Secuencia de cebadores
VT1F	F: 5'GCAGAAGCTGAACGCCACGTC
	R: 5'ATTCAGGACCGCCACCTTCAC
VT2F	F: 5'GCCTGCTGCGGGTGGTCA
	R: 5'TCGATGAGCACGCGCATGAAT
PAS/His	F: 5'ACCGCAACGAGATCTACCTG
	R: 5'TCCAGGATGTCGCCTATCAGC
RF	F: 5'CCGGGCCAAGACCACGTTTCCT
	R: 5'AGCACCGCGTACGTCCGTAAC
Hpt	F: 5'ACTACCTGGGCCAGCGTGTC
	R: 5'CGGTATCTGCTGGGCGACCA

II.3 RESULTADOS

II.3.1 Formación de *biofilm* sobre perlas de polipropileno por parte de ocho aislados clínicos y la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I

Se comparó la biomasa adherida a perlas de polipropileno luego de 72 h de incubación bajo la forma de cultivo semi-continuo. Se estudiaron ocho aislados clínicos (Bp162, Bp462, Bp892, Bp2723, Bp3495, Bp7470, Bp1938 y Bp2930) en comparación con la cepa *B. pertussis* Tohama I. La cepa de referencia, adaptada al crecimiento en laboratorio, ha sido extensivamente empleada en la producción de la vacuna celular, incluso ha sido utilizada en nuestro país para la inmunización de infantes (DTP-HB-Hib, quintuple bacteriana) y DTP-Hib (cuádruple bacteriana). Para el estudio se utilizó como reactor un sistema de tubos de vidrio rellenos con perlas de polipropileno, empleadas como superficie soporte, con cambio de medio de cultivo cada 24 h. Los tubos fueron incubados en un sistema de *roller drums* (rodillos con rotación axial) a fin de permitir la agitación adecuada para asegurar la aireación del sistema. La evaluación de la biomasa se realizó mediante la tinción con cristal violeta 0,1%. Se pudo determinar que todos los aislados clínicos estudiados mostraban una capacidad de formación de *biofilm* significativamente mayor a la que exponía la cepa vacunal (Figura 1.A). En la Figura 1.B se puede observar un ejemplo representativo de la tinción con cristal violeta para cada aislado y para el control de tinción realizado con PBS. Llamó la atención la muy alta producción de biomasa que mostró la cepa clínica Bp2723, que claramente resalta respecto de las demás cepas en cuanto a su absorción a 590 nm. Este interesante incremento en la formación de *biofilm* nos llevó a estudiar en mayor detalle dicho aislado clínico.



B

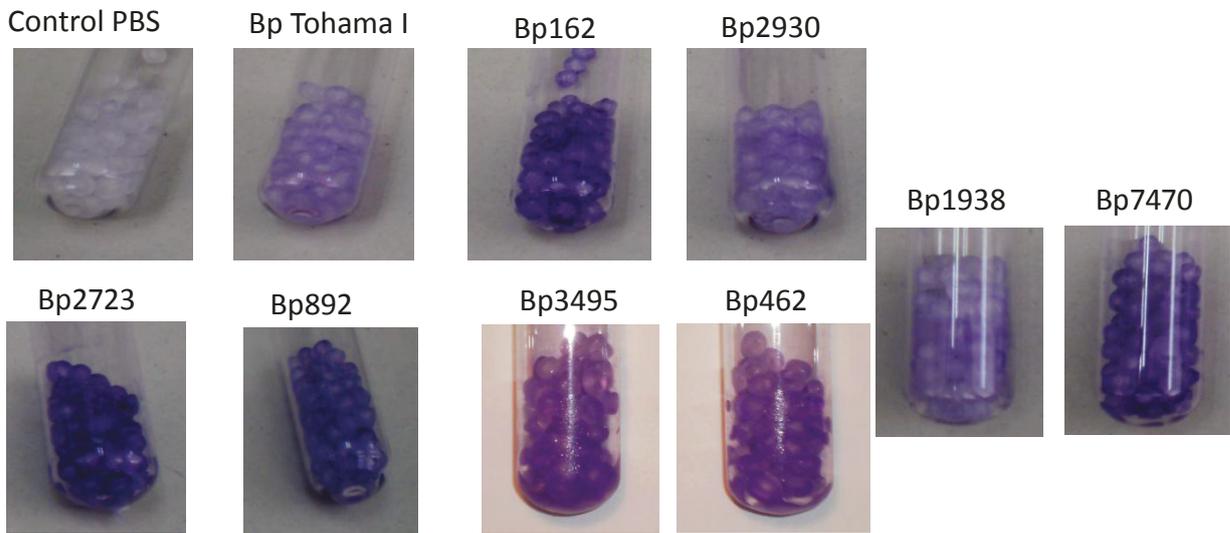


Figura 1. A. Gráfico comparativo de la absorción de cristal violeta por parte de los *biofilms* formados por aislados clínicos y la cepa de referencia de *B. pertussis* sobre perlas de polipropileno después de 72 h de crecimiento en el medio SS. Donde resalta la alta producción de biomasa generada por el aislado clínico Bp2723; (B) imagen representativa de la tinción con cristal violeta 0.1% de *biofilms* adheridos a perlas de polipropileno de diferentes aislados y la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I. Todos los tubos tienen la misma cantidad de perlas.

II.3.2 Cinética de crecimiento de las cepas *B. pertussis* Tohama I y el aislado Bp2723 en medio líquido y adheridos a superficie formando *biofilm*

Los resultados obtenidos previamente nos llevaron a preguntarnos las razones del distinto comportamiento entre los aislados clínicos estudiados y la cepa de referencia creciendo adheridos a superficie. Con este fin se decidió monitorear en primer lugar las cinéticas de crecimiento en cultivos líquidos y en *biofilm* para ambas poblaciones. Dada la particular respuesta del aislado clínico Bp2723 se decidió realizar los estudios con esta cepa. Se buscó evaluar si las cinéticas de crecimiento no sólo en medio líquido sino también en *biofilm* para este aislado clínico y para la cepa de referencia mostraban diferencias. La Figura 2.A muestra las curvas de crecimiento (DO_{650} vs tiempo) para ambas cepas en cultivo planctónico. Se puede observar que la cepa Bp2723 en la totalidad del período de tiempo evaluado presenta niveles de absorbancia mayores a los de la cepa de referencia. Se comprobó que durante la fase estacionaria de crecimiento la diferencia de absorbancia entre ambos cultivos es mayor al 70%. La velocidad aparente de crecimiento (μ_{ap}) (calculada a partir de las curvas logDO vs.

tiempo) es de $0,054 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ para la cepa *B. pertussis* Tohama I y de $0,090 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$ para la cepa Bp2723; mientras que el tiempo de duplicación es de 12,8 h y 7,7 h respectivamente.

En cuanto al estudio del crecimiento en *biofilm*, los resultados de las curvas UFC cm^{-2} en función del tiempo (Figura 2.B) muestran como la cepa Bp2723 genera aproximadamente diez veces más biomasa en términos de CFU cm^{-2} que la cepa *B. pertussis* Tohama I en las mismas condiciones experimentales de cultivos en *biofilm*. En la Figura 2.C se puede observar una imagen comparativa de la tinción con cristal violeta de ambas cepas y del control de tinción a las 24 h de crecimiento en *biofilm*.

Mediante estos experimentos se pudo observar que el aislado clínico Bp2723 no sólo forma más *biofilm* que la cepa de referencia, sino que también crece en cultivo planctónico con una mayor velocidad.

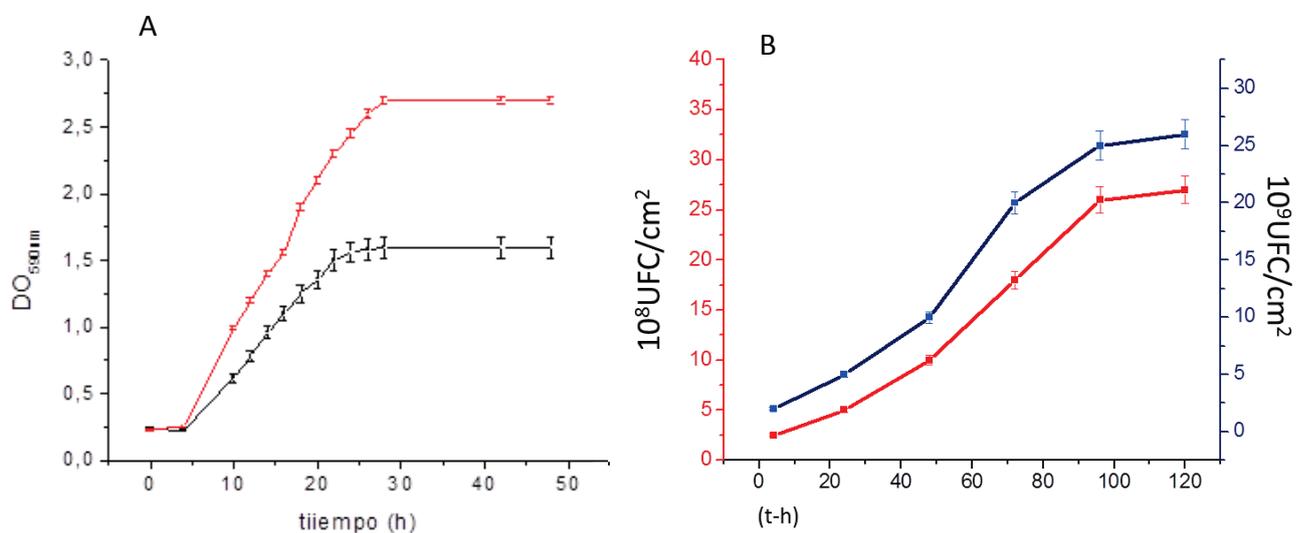


Figura 2.A. Curvas de crecimiento en cultivo planctónico de las cepas Bp Tohama I (línea negra) y Bp2723 (línea roja). B curvas de crecimiento en *biofilm* de las cepas Bp Tohama I (línea roja) y de la cepa Bp2723 (línea azul). Puede observarse el incremento de las UFC cm^{-2} en el caso de la cepa clínica, y C, biomasa adherida a perlas de polipropileno luego de 24 h de crecimiento. La tinción se realizó con cristal violeta 0.1%. Los tubos corresponden a: i- Bp Tohama I, ii- Bp 2723 y iii-control con PBS.

II.3.3 Análisis fenotípico de las cepas Bp2723 y *B. pertussis* Tohama I creciendo en *biofilm* través de la técnica 2D-DIGE

Un modo interesante de entender las diferencias que conllevan a la cepa Bp2723 a generar mayor biomasa que la cepa *B. pertussis* Tohama I tanto en cultivos líquidos como en *biofilm* es conocer el perfil proteico expresado por ambas cepas en las dos condiciones de cultivo. En este sentido, y a través de un proyecto de colaboración con la Dra. Monika Ehling Schulz,

de la Universidad de Veterinaria de Viena, Austria, se llevó a cabo un análisis comparativo de los perfiles proteicos de ambas cepas creciendo en *biofilm* y en cultivo planctónico utilizando la técnica de proteómica 2D-DIGE. Para ello, el método de aislamiento la fracción de proteínas solubles elegido fue el empleado previamente en el laboratorio (Tesis Doctoral del Dr. D. O. Serra (44)) obteniéndose un buen rendimiento en cantidad de proteínas y buena calidad de las muestras, como puede observarse en el gel SDS-PAGE en la Figura 3. En el caso de las condiciones de la separación de las proteínas en la primera y segunda dimensión, se debió ajustar el protocolo y para ello, en primera instancia, se realizaron separaciones de proteínas en 2D utilizando la tinción con Nitrato de Plata (AgNO_3) a fin de encontrar las condiciones ideales para el isoelectroenfoco y para la obtención de *spots* de forma y separación adecuados en los geles.

Una vez finalizada la etapa de puesta a punto, se marcaron las proteínas con marcadores fluorescentes y se procedió a la realización del análisis proteómico 2D-DIGE y la obtención de las imágenes. La Figura 4 muestra imágenes representativas de los geles obtenidos para cada condición de pH ensayada así como también de los *spots* diferencialmente expresados que se encontraron luego del análisis.

El análisis comparativo de los geles fue organizado de a pares. Así, se compararon los geles obtenidos a partir de las muestras de *B. pertussis* Tohama I de 24h de cultivo planctónico con sus pares de la cepa Bp2723 y por otro lado, se compararon los geles de las muestras de cultivos en *biofilm* de la cepa *B. pertussis* Tohama I y sus pares provenientes de la cepa Bp2723 en los dos rangos de pH utilizados (4→7 y 6→9). El límite inferior de diferencias en la expresión fue establecido como 3, es decir, sólo los *spots* con diferencias en el volumen de radio superior a tres veces fueron seleccionados como diferencialmente regulados en cada comparación. Un análisis global de los resultados es el representado en la Figura 5. Allí se puede observar un gráfico correspondiente al análisis de componente principal (ACP) utilizando todas las diferencias encontradas entre los geles. Se puede ver como la componente principal que separa los conjuntos de datos es el tipo de cepa, siendo la segunda componente el tipo de cultivo; también se observa como los triplicados de cada muestra resultaron muy similares, ya que los puntos que representan cada replicado de cultivo no se alejan significativamente uno del otro en el análisis estadístico. En referencia a los porcentajes de *spots* diferencialmente regulados en cada caso se puede observar en la Tabla 3 que existen un total de 28 *spots up* regulados en la cepa Bp2723 en ambas

condiciones de cultivos en el rango de pH 4-7 y 7 *spots down* regulados en las mismas condiciones, es decir: 11 *spots* fueron hallados *up* regulados en la cepa Bp2723 en ambas condiciones de cultivo en el rango de pH 6-9 y 10 *spots down* regulados (Tabla 3). Sobre un total de 1275 *spots* encontrados en todos los geles, sumando ambas condiciones de pH, la diferencia en la expresión de proteínas con más de tres veces de expresión entre la cepa Bp2327 y *B. pertussis* Tohama I es del 4,4%, siendo 2,4% las diferencias encontradas entre cultivos planctónicos y de 1,96% entre cultivos en *biofilm*.

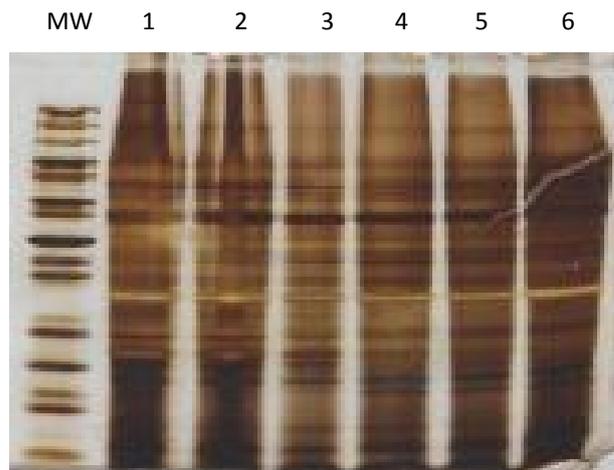
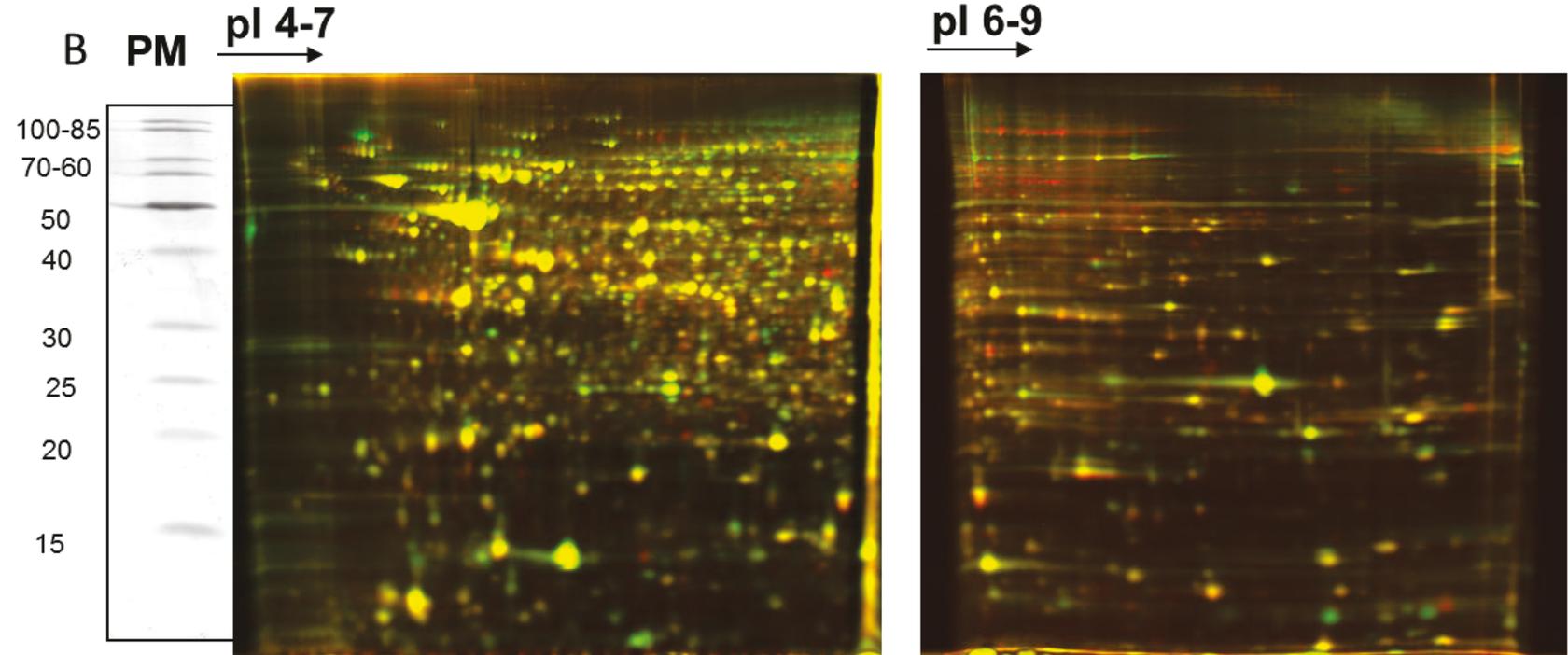
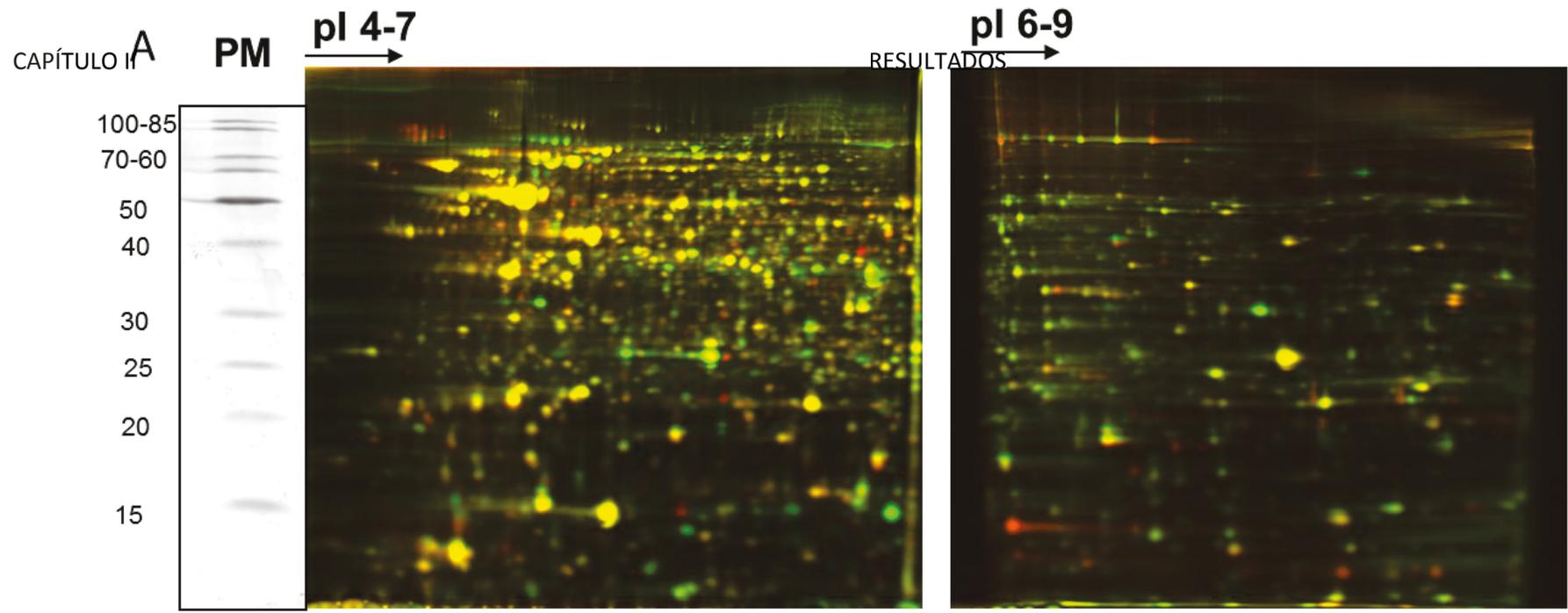


Figura 3 Gel SDS-PAGE realizado como control de aislamiento de las fracciones proteicas de las muestras correspondientes al cultivo en *biofilm* de la cepa *B. pertussis* Tohamal y replicado (calles 1 y 2); cultivo en *biofilm* de la cepa Bp2723 y replicado (calles 3 y 4) y de los cultivos planctónicos de las cepas *B. pertussis* Tohama I (calle 5) y Bp2723 (calle 6).



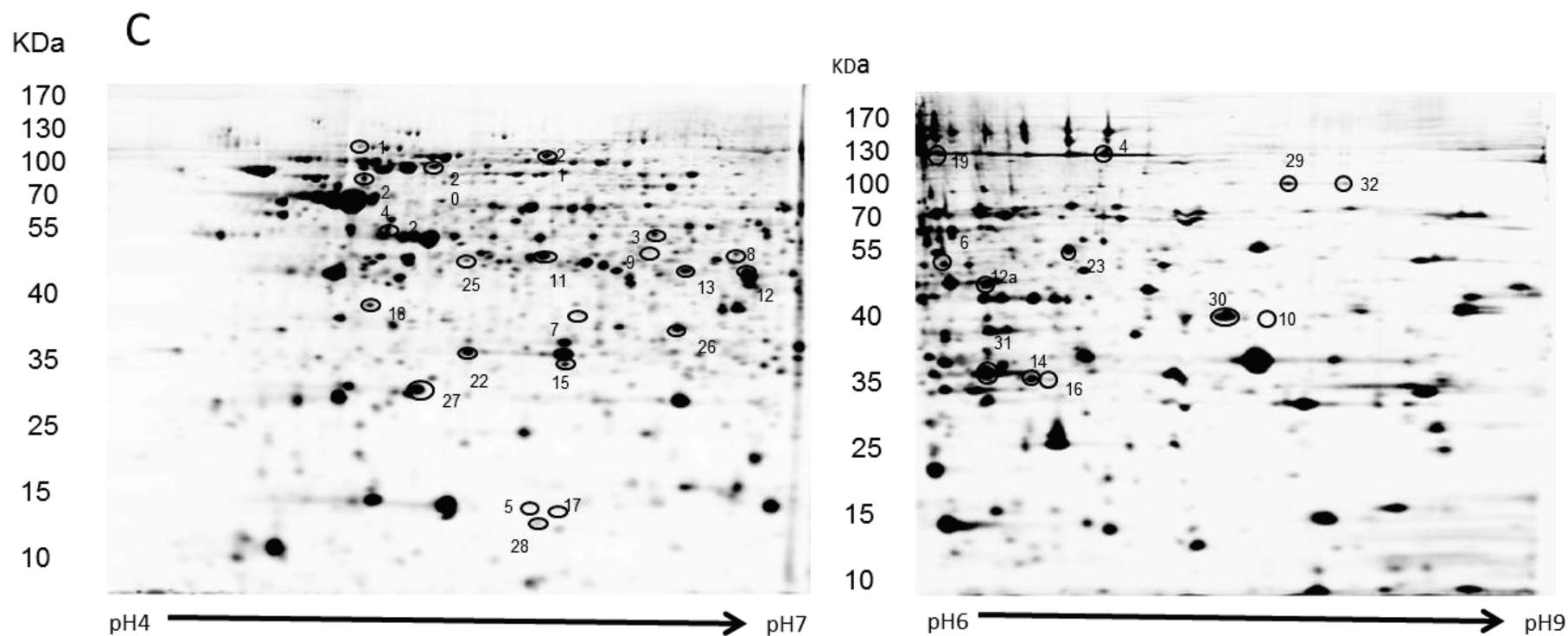


Figura 4-Imágenes representativa de los geles 2D- teñidos con colorantes fluorescentes para ambos rangos de pH estudiados. En la Figura A se observan los geles correspondientes a las muestras provenientes de cultivos planctónico. En verde se marcaron las proteínas de la cepa Bp 2723 y en rojo las proteínas de la cepa Bp Tohama I. En la figura B se observan los geles provenientes de las cepas cultivadas en biofilm. En verde se observan las proteínas provenientes de la cepa Bp 2723 y en rojo las provenientes de la cepa Bp Tohama I. En la Figura C se muestran los spots que fueron hallados diferencialmente expresados luego del análisis estadístico. Los spots fueron escindidos manualmente luego de teñir los geles con AgNO_3 para su posterior identificación.

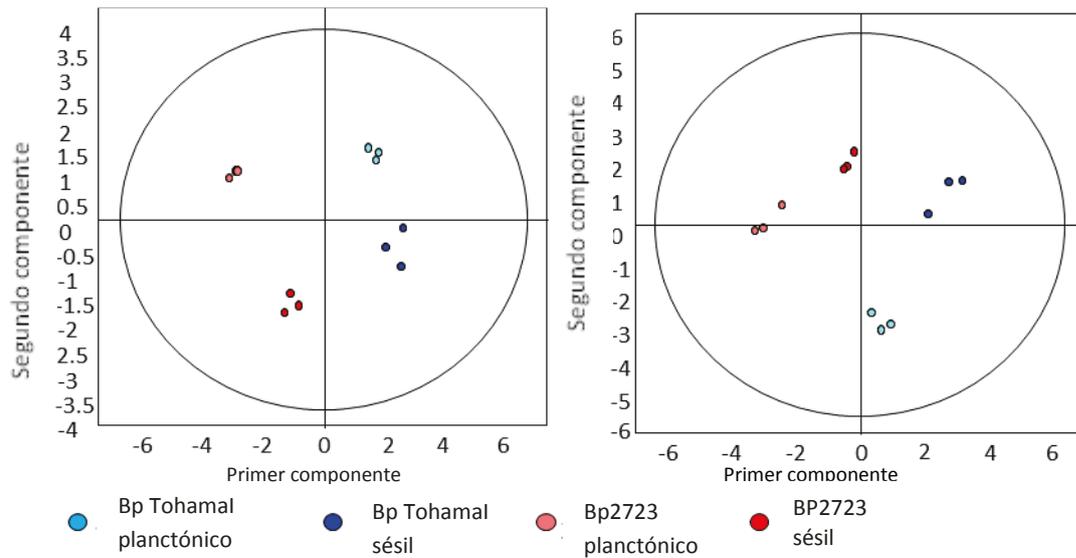


Figura 5. Análisis de componente principal: cada punto corresponde a un replicado de un grupo experimental basado en la expresión global de todos los spots expresados diferencialmente (ANOVA de una vía; $p < 0.05$).

Tabla 3. Spots totales y spots expresados diferencialmente en las dos condiciones de cultivo para la cepa Bp2723 respecto de la cepa *B. pertussis* Tohama I.

	pH4-7	pH6-9
Número total de spots	2041	2317
Número de spots encontrados en todos los geles	677	598
Spots expresados diferencialmente		
-Cultivo planctónico	↑ 16 ↓ 3	↑ 7 ↓ 5
-Cultivo en biofilm	↑ 12 ↓ 4	↑ 4 ↓ 5

II.3.4 Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente en *biofilm* y en cultivo planctónico por la cepa Bp2723 en relación a la cepa Tohama I

Los spots diferencialmente expresados fueron escindidos de los geles posteriormente a su tinción con AgNO_3 , luego de lo cual fueron objeto de un análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF siguiendo la técnica de la huella peptídica. Las proteínas fueron identificadas por comparación con la base de datos de *Bordetella pertussis* Tohama I. En la Tabla 4 se indican las proteínas identificadas y su categoría funcional, así como también su

código de acceso a la bases de datos de UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Muchas de las proteínas identificadas no pudieron ser asignadas a ninguna categoría funcional ya que corresponden a proteínas putativas. Un análisis comparativo con las bases de datos de proteínas anotadas para organismos procariotas conocidos en UniProt tampoco arrojó homología significativa. Las demás proteínas identificadas se pudieron dividir en cuatro posibles categorías funcionales; metabolismo y obtención de energía, síntesis de aminoácidos y proteínas, transporte y, la más interesante: virulencia. En este último grupo de proteínas fueron identificadas cuatro proteínas sobre expresadas en ambas condiciones de cultivos para la cepa Bp2723, ellas son: BcrH2, una chaperona del Sistema de Secreción Tipo III [136, 129]; OmpQ, una porina de membrana [122]; Vag8 y BrkA, autotransportadores y factores de resistencia séricos [116, 117, 139]. La expresión de todos estos factores de virulencia está regulada por el sistema de dos componentes BvgAS de *B. pertussis*. Este resultado nos llevó a evaluar la expresión de éstos y otros factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS mediante un análisis de transcriptómica.

Tabla 4. Se enumeran los spots diferencialmente regulados con más de 3 veces de relación de radio de volúmenes, junto con el nombre de la proteína identificada, su número de acceso, su valor de radio de expresión en las diferentes condiciones de cultivo así como también su peso molecular y pI teóricos.

Spot #	Nombre/probable función	Número de acceso a UniProtKB	Nivel de expresión relativo en biofilm	Nivel de expresión relativo en cultivo planctónico	MW (KDa)/Teórico	PI/Teórico
Metabolismo y producción de energía						
1	Aconitato hidratasa 2	Q7VX06	2,63	5,71	93,17	5,2
2	Dihidrolipoamida succinil transferasa, component del complejo 2-oxoglutarateo dehidrogenasa	Q7VZ17	3,91	4,31	42,82	5,4
3	Citrato sintasa	Q7VWA4	3,34	1,5	48,46	6
4	Putativa Aconitato hidratasa	Q7VX12	3,9	3,81	97,74	6,9
5	Lactoil glutatión liasa	Q7W0Q1	-3,66	-8,08	14,88	5,6
6	Alcohol dehidrogenasa clase III	Q7VT06	-1,5	-3,43	39,41	6,3
Biosíntesis de aminoácidos y proteínas						
7	Dihidrodipicolinato sintasa	Q7VXZ8	-3,82	-2,83	31,09	5,7
8	Aminotransferasa de aminoácidos aromáticos	Q7VXH5	-10,77	-12,42	43,09	6,1
9	Cistationina beta-liasa	Q7W0K3	1,29	3,26	43,32	5,9
10	Metionil-tRNA formiltransferasa	Q7VS89	-2,21	-4,3	32,73	8,6
Transporte						
11	Proteína de unión a leu/ile/val	Q7VYN1	1,26	3,68	39,61	6,3
12	Proteína de unión a sulfato	Q7VZE6	1,71	4,26	37,91	7,8
12a	Proteína de unión a sulfato		1,17	3,23		
13	Proteína periplásmica de unión a aminoácidos	Q7VS83	1,43	4,43	36,14	6,6
14	Proteína putativa componente ABC, de unión a ATP	Q7VVD3	-1,37	-4,3	26,05	6,8
15	Transportador ABC de unión a ATP	Q7VTG4	2,98	6	25,57	5,6
16	Proteína periplásmica de unión a molibdato	Q7VUJ3	-1,44	6	26,45	8,7
Virulencia						
17	Proteína putativa regulatoria	Q84CS3	3,11	3,27	14,64	5,7
18	Porina de membrana externa Q	Q45342	3,87	7,68	39,16	5,6
19	Autotransportador Vag8	Q8VV95	2,98	5,92	94,88	6,3
20	Autotransportador BrkA	F4LE36	4,81	3,96	103,38	6,6
Procesos celulares						
Estrés y regulación						
21	Proteasa putativa Zinc	Q7VVY4	1,55	3,26	101,11	6
22	Proteína antioxidante	Q7VZE7	3,58	6	23,77	5,6
23	Proteína Chaperona DnaJ	Q7VVY3	3,6	1,99	41,16	6,7
Otras						
24	Proteína putativa no caracterizada	Q7VSD3	2,83	3,28	68,65	5,1
25	Proteína putativa exportada	Q7VTG5	-1,19	3,01	43,19	5,9
26	Proteína putativa exportada	Q7VV70	1,62	3,56	28,74	7,8
27	Proteína putativa no caracterizada	Q7VTS0	-3,61	1,26	19,83	5,3
28	Proteína putativa exportada	Q7VWQ4	2,38	6,55	16,82	9,3
29	Putative uncharacterized protein	Q7VV97	2,77	3,42	61,71	8,5
30	Proteína putativa exportada	Q7VSH0	-1,13	-3,31	33,45	9
31	Proteína putativa exportada	Q7VSM1	2,62	6,92	28,52	7,8
32	Proteína putativa no caracterizada	Q7VV97	-7,52	-9,09	61,71	8,5

II.3.5 Análisis de expresión génica utilizando la técnica de PCR en tiempo real.

Si bien la expresión de proteínas es una herramienta importante para conocer el fenotipo diferencial entre estas dos cepas, resulta substancial considerar que en este caso solo se ha evaluado la expresión de proteínas solubles y que ciertos factores de virulencia podrían no detectarse en los geles 2D por ser proteínas exportadas y/o expresadas en membrana, como las adhesinas y las toxinas. Por esta razón se decidió llevar a cabo un estudio adicional de la expresión de los genes regulados positivamente por el sistema BvgAS. Se recurrió entonces a la técnica de amplificación por PCR en tiempo real de los siguientes genes:

- genes codificantes para los cuatro factores de virulencia hallados sobre-expresados en los estudios de proteómica: *bcrh2*, *ompQ*, *vag8* y *brkA*;
- otros genes de virulencia regulados por el sistema BvgAS: *bsp22*, codificante para la proteína Bsp22, secretada por el Sistema de Secreción Tipo III (45); *prn*, codificante para la proteína PRN, autotransportador e importante adhesina de *B. pertussis* (46); *fhaB*, codificante para la principal adhesina de *B. pertussis*, FHA (47, 48), proteína de membrana y secretoria (49); *fim2* y *fim3* (50, 51), codificante para Fim2 y Fim3, importantes adhesinas bacterianas; y *ptxS*, codificante para PT (toxina pertussis), principal toxina de *B. pertussis* (52, 53).

Los cebadores utilizados fueron diseñados utilizando el programa Netprimer y se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

- que la longitud de los cebadores se encuentre entre 17 y 21 pares de bases;
- que no formen dímeros;
- que la diferencia entre las temperaturas de *annealing*; de los dos cebadores sea de $\pm 1^{\circ}\text{C}$;
- que la zona de amplificación se encuentre aproximadamente en la zona media del gen;
- que el segmento amplificado se encuentre entre 70 y 150 pares de bases;

Los cebadores fueron testeados utilizando ADN genómico para determinar cualitativamente su eficiencia así como también para determinar su temperatura de *annealing*. En todos los casos 58°C resultó una buena temperatura y fue la que se utilizó en las amplificaciones en tiempo real. La preparación del ADNc fue realizada en dos etapas, una primera etapa de aislamiento de ARN utilizando Trizol, luego de la cual se midió la concentración de ARN a través de la absorción a 280nm (Nanodrop, Thermo Scientific), se observaron las muestras

en geles de agarosa para analizar la calidad del RNA aislado (ej. Figura 6), y luego se procedió al tratamiento con DNAsa y la realización de la retro-transcripción.

Una vez obtenidos los ADNc, se determinó cuantitativamente la eficiencia de los cebadores. Para ello se realizaron ampliaciones para cada juego de cebadores utilizando como molde el ADNc puro, y diluido 10, 100 y 1000 veces por duplicado técnico. Con los datos obtenidos se construyeron las curvas logCt vs dilución, se determinó la pendiente de la curva y se calculó la eficiencia utilizando la siguiente ecuación:

$$E = \left(1 - 10^{-\frac{1}{s}}\right) \quad (1)$$

Donde E es la eficiencia y s la pendiente de la curva logCT vs. Dilución.

En un caso, la eficiencia de los cebadores para el gen problema no coincidió con la eficiencia de los cebadores para el gen *house keeping* (que fue del 100%); esto fue tenido en cuenta para el tratamiento de los resultados, ya que se tuvo que recurrir al modelo de Pfaffl⁽¹⁾.

$$E = \frac{(E_{gen\ problema})_{gen\ house\ keeping}^{\Delta CP}}{(E_{gen\ house\ keeping})_{gen\ house\ keeping}^{\Delta CP}} \quad (2)$$

Una vez obtenidos estos resultados se procedió a la realización de las PCR en tiempo real para determinar los valores de Ct de cada gen en cada condición estudiada, así fue que se realizaron determinaciones para 11 genes por triplicado para las siguientes muestras:

- Bp Tohama I proveniente de 24 h de cultivo planctónico
- Bp Tohama I proveniente de 72 h de cultivo en biofilm
- Bp2723 proveniente de 24 h de cultivo planctónico
- Bp2723 proveniente de 72 h de cultivo en biofilm

Los resultados del análisis utilizando el modelo de $\Delta\Delta Ct$ o Pfaffl se observan en la Figura 7. Se observa que en los cultivos planctónicos sólo cuatro genes se encontraron sobre expresados en el aislado clínico (*fim2*, *vag8*, *brkA* y *bcrH2*), tres de estos genes codifican para proteínas que habían sido observadas como *up* reguladas en el análisis proteómico 2D. Cuando se analizaron las diferencias de expresión entre ambas cepas cultivadas en *biofilm* se pudo observar que todos los genes, a excepción de *ompQ*, se encuentran sobre expresados en las células sésiles del aislado clínico. Muy importante resultó el hecho de observar una sobre expresión de los transcritos de las cuatro adhesinas: FHA, Fim, PRN y BipA. Estos resultados

conjuntamente con los expuestos anteriormente indicarían que el aumento en la expresión de varios factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS, entre ellos fuertes adhesinas, podría contribuir a explicar el aumento de la formación de *biofilm* por parte del aislado clínico Bp2723.

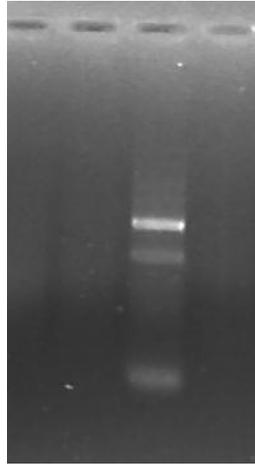


Figura 6. Análisis de calidad del RNA purificado. Gel representativo donde se observa una muestra de ARN recientemente purificado. Se pueden observar las tres bandas esperadas de ARN ribosomal.

RESULTADOS

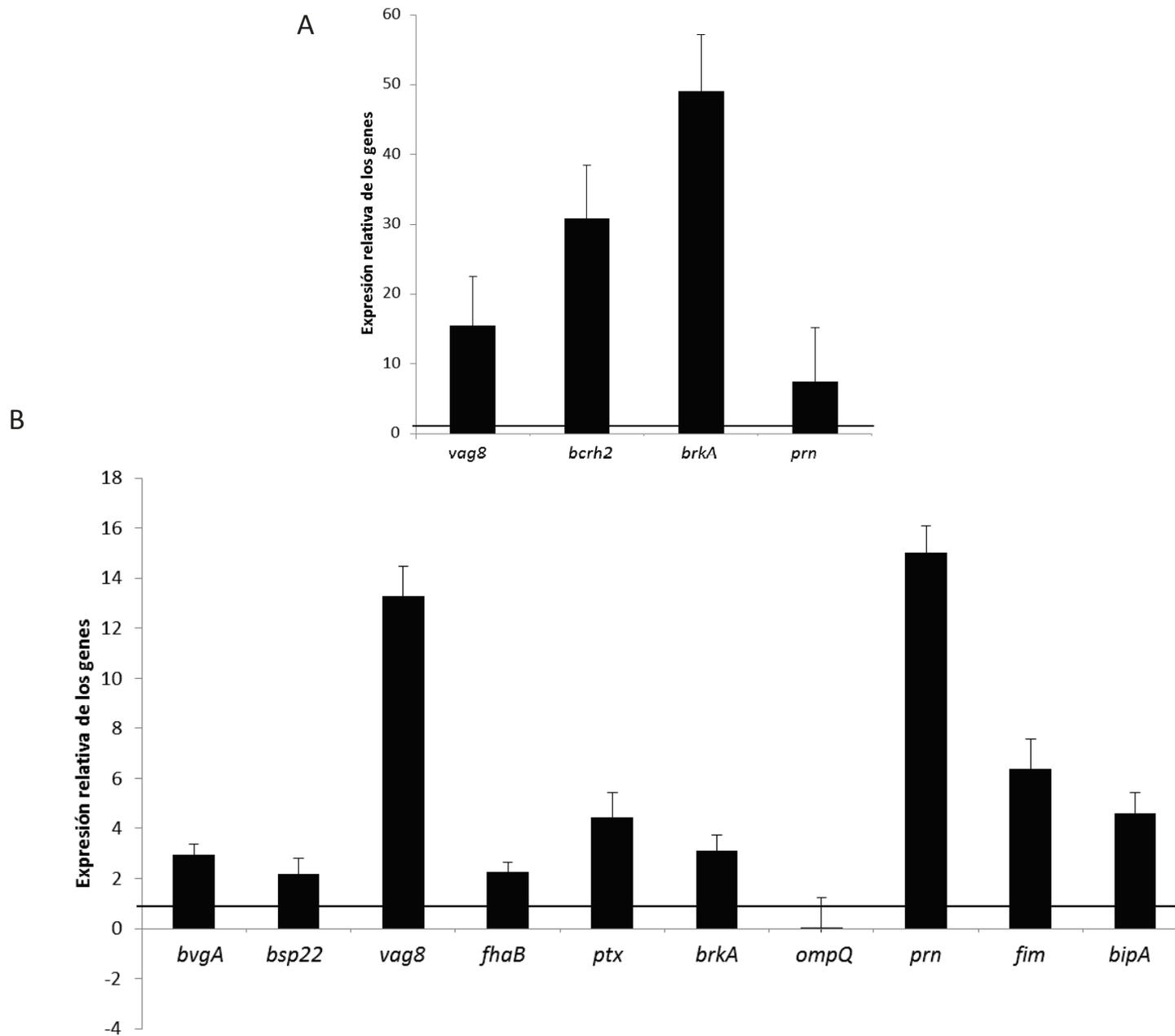


Figura 7. Expresión relativa de los genes analizados por PCR en tiempo real. Las columnas representan la expresión relativa de los genes y corresponden a un promedio de nivel de expresión de la cepa Bp2723 en relación a la cepa *B. pertussis* Tohama I, en las condiciones de cultivo (A)- planctónico y (B)-*biofilm*

1 **II.3.5 Secuenciamiento de los genes del sistema BvgAS y factores de virulencia en el** 2 **aislado clínico Bp2723**

3 En vista de los resultados obtenidos se trató de determinar si el aumento en la expresión de
4 algunos factores de virulencia en la cepa Bp2723 estaba asociado a alguna mutación
5 específica en la secuencia de las regiones promotoras de algunos de sus genes de virulencia
6 o la secuencia codificante de los mismos. De esta forma se pudo secuenciar, mediante una
7 cooperación con el grupo del Dr. Frits Mooi (*National Institute for Public Health and the*
8 *Environment, Bilthoven, the Netherlands*), el genoma completo del aislado clínico Bp2723. Al
9 realizarse la comparación entre los *contigs* obtenidos y la secuencia de la cepa *B. pertussis*
10 Tohama I (NCBI: 2929) se observó que no existían diferencias en las secuencias de los genes
11 analizados, a excepción de una única mutación puntual en la posición 2113 del gen
12 codificante para la proteína sensora BvgS donde se encontró la presencia de una A por una
13 G. Llamativamente esta mutación había sido descrita previamente por un grupo de
14 investigación en Francia, el cual había reportado que la misma daba lugar a un cambio de un
15 aminoácido en la posición 705 de la proteína correspondiente de una lisina (K) por ácido
16 glutámico (E) (54). La región donde se encuentra la mutación es la región *linker* de la
17 proteína, contigua a la región anclada a la membrana e inmediatamente anterior al dominio
18 autofosforilante del sensor y que ha sido descrito como actor mecánico influyente en la
19 autofosforilación de su dominio contiguo (55). Ante estos resultados se realizó la
20 amplificación del gen BvgS para el resto de las cepas clínicas estudiadas y
21 sorprendentemente se observó que todas ellas presentaban la misma mutación singular en
22 la posición 2113 (Fig. 8-9).

CAPÍTULO II

RESULTADOS

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bp162  CGGCGCCAGATCCGCCAGCGCAAGCGGGCCGAGCGGGCGCTGAACGACCAGCTGGAATTTCATGCGCGTGCTCATCGACGGCACGCCTAACCCCATCTATG
Bp3495 CGGCGCCAGATCCGCCAGCGCAAGCGGGCCGAGCGGGCGCTGAACGACCAGCTGGAATTTCATGCGCGTGCTCATCGACGGCACGCCTAACCCCATCTATG
Bp462  CGGCGCCAGATCCGCCAGCGCAAGCGGGCCGAGCGGGCGCTGAACGACCAGCTGGAATTTCATGCGCGTGCTCATCGACGGCACGCCTAACCCCATCTATG
Bp892  CGGCGCCAGATCCGCCAGCGCAAGCGGGCCGAGCGGGCGCTGAACGACCAGCTGGAATTTCATGCGCGTGCTCATCGACGGCACGCCTAACCCCATCTATG
Bp2930 CGGCGCCAGATCCGCCAGCGCAAGCGGGCCGAGCGGGCGCTGAACGACCAGCTGGAATTTCATGCGCGTGCTCATCGACGGCACGCCTAACCCCATCTATG
Bp2723 CGGCGCCAGATCCGCCAGCGCAAGCGGGCCGAGCGGGCGCTGAACGACCAGCTGGAATTTCATGCGCGTGCTCATCGACGGCACGCCTAACCCCATCTATG
Bp1938 CGGCGCCAGATCCGCCAGCGCAAGCGGGCCGAGCGGGCGCTGAACGACCAGCTGGAATTTCATGCGCGTGCTCATCGACGGCACGCCTAACCCCATCTATG
Bp492  CGGCGCCAGATCCGCCAGCGCAAGCGGGCCGAGCGGGCGCTGAACGACCAGCTGGAATTTCATGCGCGTGCTCATCGACGGCACGCCTAACCCCATCTATG
Bp TohamaI CGGCGCCAGATCCGCCAGCGCAAGCGGGCCGAGCGGGCGCTGAACGACCAGCTGGAATTTCATGCGCGTGCTCATCGACGGCACGCCTAACCCCATCTATG

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bp162  TGC GCGATAAGGAAGGCCGCATGCTGTGTGTGCAATGACGCCACCCTGCGACACCTTTTGGCGTGACTGCCGATGCGGTACTGGGGCAAGACCATTCCGGAAGC
Bp3495 TGC GCGATAAGGAAGGCCGCATGCTGTGTGTGCAATGACGCCACCCTGCGACACCTTTTGGCGTGACTGCCGATGCGGTACTGGGGCAAGACCATTCCGGAAGC
Bp462  TGC GCGATAAGGAAGGCCGCATGCTGTGTGTGCAATGACGCCACCCTGCGACACCTTTTGGCGTGACTGCCGATGCGGTACTGGGGCAAGACCATTCCGGAAGC
Bp892  TGC GCGATAAGGAAGGCCGCATGCTGTGTGTGCAATGACGCCACCCTGCGACACCTTTTGGCGTGACTGCCGATGCGGTACTGGGGCAAGACCATTCCGGAAGC
Bp2930 TGC GCGATAAGGAAGGCCGCATGCTGTGTGTGCAATGACGCCACCCTGCGACACCTTTTGGCGTGACTGCCGATGCGGTACTGGGGCAAGACCATTCCGGAAGC
Bp2723 TGC GCGATAAGGAAGGCCGCATGCTGTGTGTGCAATGACGCCACCCTGCGACACCTTTTGGCGTGACTGCCGATGCGGTACTGGGGCAAGACCATTCCGGAAGC
Bp1938 TGC GCGATAAGGAAGGCCGCATGCTGTGTGTGCAATGACGCCACCCTGCGACACCTTTTGGCGTGACTGCCGATGCGGTACTGGGGCAAGACCATTCCGGAAGC
Bp492  TGC GCGATAAGGAAGGCCGCATGCTGTGTGTGCAATGACGCCACCCTGCGACACCTTTTGGCGTGACTGCCGATGCGGTACTGGGGCAAGACCATTCCGGAAGC
Bp TohamaI TGC GCGATAAGGAAGGCCGCATGCTGTGTGTGCAATGACGCCACCCTGCGACACCTTTTGGCGTGACTGCCGATGCGGTACTGGGGCAAGACCATTCCGGAAGC

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bp162  CAACGTGGTGGGCGACCCGGCGCTGGCCCGCAAATGCACGAGTTCCTGCTCACGCGCGTGGCCGCCGAGCGCGAGCCGCGCTTCGAGGACCGCGATGTC
Bp3495 CAACGTGGTGGGCGACCCGGCGCTGGCCCGCAAATGCACGAGTTCCTGCTCACGCGCGTGGCCGCCGAGCGCGAGCCGCGCTTCGAGGACCGCGATGTC
Bp462  CAACGTGGTGGGCGACCCGGCGCTGGCCCGCAAATGCACGAGTTCCTGCTCACGCGCGTGGCCGCCGAGCGCGAGCCGCGCTTCGAGGACCGCGATGTC
Bp892  CAACGTGGTGGGCGACCCGGCGCTGGCCCGCAAATGCACGAGTTCCTGCTCACGCGCGTGGCCGCCGAGCGCGAGCCGCGCTTCGAGGACCGCGATGTC
Bp2930 CAACGTGGTGGGCGACCCGGCGCTGGCCCGCAAATGCACGAGTTCCTGCTCACGCGCGTGGCCGCCGAGCGCGAGCCGCGCTTCGAGGACCGCGATGTC
Bp2723 CAACGTGGTGGGCGACCCGGCGCTGGCCCGCAAATGCACGAGTTCCTGCTCACGCGCGTGGCCGCCGAGCGCGAGCCGCGCTTCGAGGACCGCGATGTC
Bp1938 CAACGTGGTGGGCGACCCGGCGCTGGCCCGCAAATGCACGAGTTCCTGCTCACGCGCGTGGCCGCCGAGCGCGAGCCGCGCTTCGAGGACCGCGATGTC
Bp492  CAACGTGGTGGGCGACCCGGCGCTGGCCCGCAAATGCACGAGTTCCTGCTCACGCGCGTGGCCGCCGAGCGCGAGCCGCGCTTCGAGGACCGCGATGTC
Bp TohamaI CAACGTGGTGGGCGACCCGGCGCTGGCCCGCAAATGCACGAGTTCCTGCTCACGCGCGTGGCCGCCGAGCGCGAGCCGCGCTTCGAGGACCGCGATGTC

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bp162  ACGCTGCACGGCCGCACCCGCCATGTCACCAGTGGACGATTCCTCCGTACGGCGACTCGCTGGGGCAACTCAAGGGCATCATCGGCCGTGGATCGACATCA
Bp3495 ACGCTGCACGGCCGCACCCGCCATGTCACCAGTGGACGATTCCTCCGTACGGCGACTCGCTGGGGCAACTCAAGGGCATCATCGGCCGTGGATCGACATCA
Bp462  ACGCTGCACGGCCGCACCCGCCATGTCACCAGTGGACGATTCCTCCGTACGGCGACTCGCTGGGGCAACTCAAGGGCATCATCGGCCGTGGATCGACATCA

```

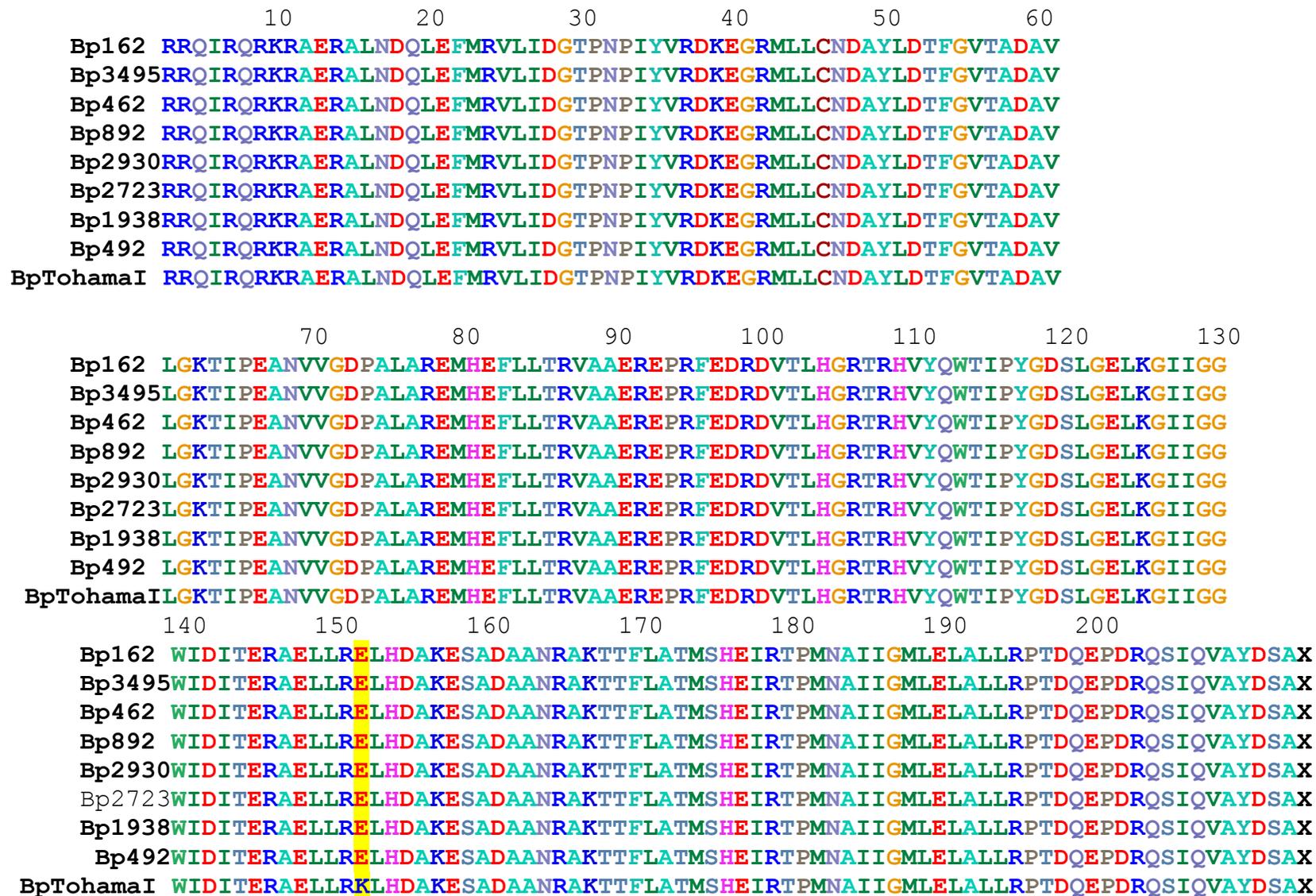



Figura 9. Segmento de la secuencia de la proteína BvgS donde se observa que la mutación en la secuencia codificante genera en todas las cepas clínicas un intercambio de una K por un E en el dominio PAS.

II.3.6 Formación de *biofilm* por parte de la cepa mutante BpK₇₀₅→E y ensayos de adhesión con bacterias moduladas.

Como próximo paso del trabajo de Tesis se decidió estudiar si la mutación en el gen *BvgS* tenía algún efecto en relación a la formación de *biofilm*. A tal fin, el aislado clínico Bp2723 y las cepas *B. pertussis* Tohama I, Bp K₇₀₅→E (recibida desde Francia) y BPSM fueron crecidas en *biofilm* adheridas a perlas de polipropileno en sistema de agitación por *roller drums* y cultivo semi-batch. El objetivo del experimento consistió en evaluar la formación de *biofilm* luego de 72 h de cultivo entre el aislado clínico y una cepa derivada de Tohama que porta la misma mutación en el gen *bvgS*. El estudio realizado permitió demostrar que la formación de *biofilm* de la cepa Bp2723 era mayor que la de la cepa de referencia, pero no se observaron diferencias significativas entre la biomasa generada por las otras tres cepas entre sí (Figura 10). Este resultado indica que la mutación estudiada no estaría directamente asociada al aumento en la formación de *biofilm* observado en los aislados clínicos.

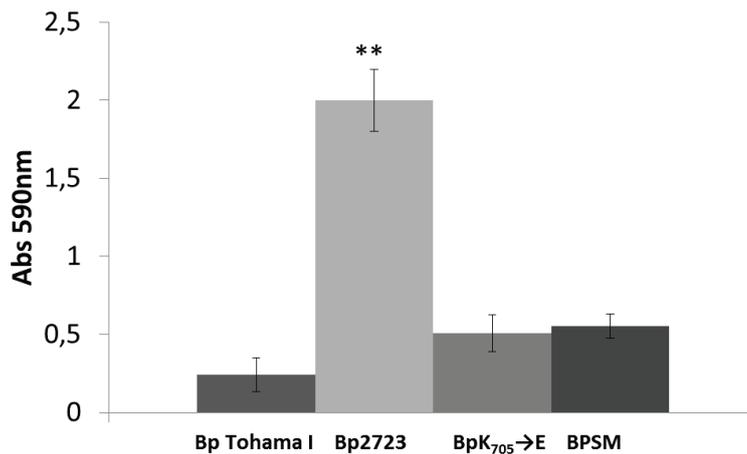


Figura 10. Formación de *biofilm* evaluado por tinción con cristal violeta 0,1%. Se observaron diferencias significativas únicamente en el caso de la cepa clínica Bp2723 que produce mayor biomasa que cualquiera de las demás cepas estudiadas.

En paralelo a estos ensayos, y conociendo la información publicada por el grupo del Dr. Herrou, quienes indican que la mutación encontrada en el gen codificante para la proteína *BvgS* está asociada a una respuesta más rápida frente a los agentes de modulación como el $MgSO_4$ (54), se decidió proseguir estudiando posibles efectos de esta mutación sobre la capacidad de formación de *biofilm*. Debido a que durante el trabajo diario en el laboratorio se había observado una modulación más rápida de las cepas clínicas, respecto de la cepa de referencia, establecido por una inhibición más rápida de la presencia del halo de hemólisis

en placas de cultivo ABGs, producto de la ausencia de la expresión de la toxina Adenilato Ciclasa, es que se decidió realizar un ensayo de adhesión a perlas de polipropileno utilizando como células de partida las cuatro cepas mencionadas en el ensayo anterior pero previamente moduladas por crecimientos consecutivos de 24 h en medio de cultivo SS con la adición de $MgSO_4$ 40mM. Para el estudio de adhesión los organismos modulados que se obtuvieron fueron incubados en un medio SS libre de agentes modulantes y se evaluó la adhesión a una superficie abiótica en las nuevas condiciones. Se utilizaron perlas de polipropileno como soporte y se tomaron muestras (perlas) cada 30 min para evaluar mediante tinción con CV la biomasa adherida. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 11. Se puede ver que, si bien las cuatro cepas alcanzan valores similares de adhesión al cabo de 4 h de incubación, tanto las cepas Bp2723 como al cepa Bp K₇₀₅→E presentaron una mayor velocidad de pegado al soporte que las cepas BPSM y *B. pertussis* Tohama I. Como puede apreciarse en la Figura 11, existe una diferencia marcada en la cinética entre un grupo y el otro para comenzar a generar una pendiente en la absorción de cristal violeta. Las cepas Bp K₇₀₅→E y BP2723 comienzan a mostrar dicho incremento en la pendiente a los 30 min., mientras que las cepas BPSM y BP Tohama I presentan un período de entre 120 y 150 min, sugiriendo un período de adaptación al medio sin agentes modulantes mayor. El fenómeno de adhesión estudiado, es gobernado por la expresión de adhesinas.

Una adaptación más rápida en la respuesta a la modulación junto a un aumento en la expresión de factores de virulencia, demostrado para la cepa Bp2723, podrían conferirle a la esta cepa y probablemente a los demás aislados clínicos que también poseen la mutación una mayor eficiencia en la infección. Para tener mayor precisión en este sentido se deberán realizar estudios en modelos murinos, los cuales serán concretados a la brevedad.

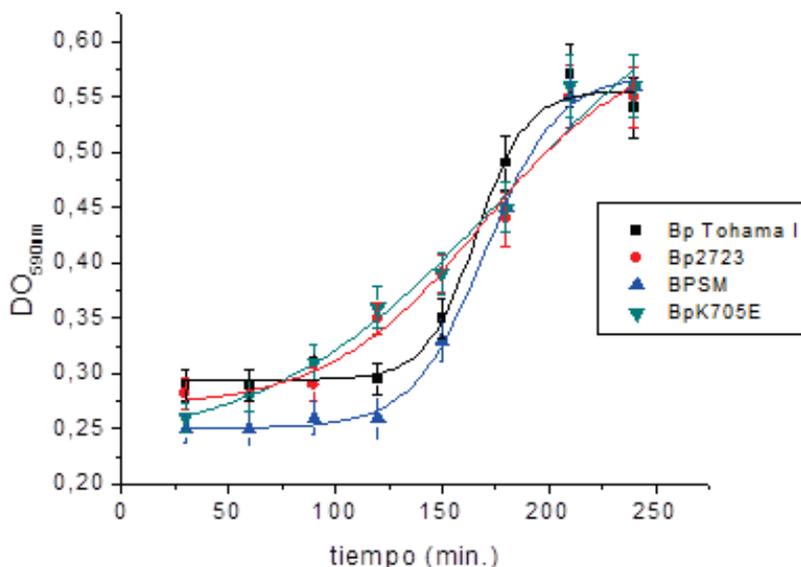


Figura 11. Ensayo de adhesión a perlas de polipropileno utilizando como inóculo cultivos modulados de *B. pertussis*. Las cepas Bp2723 y Bp K₇₀₅→E (líneas roja y verde) muestran un perfil más rápido de adhesión comparado con las cepas BPSM y Bp Tohama I (líneas azul y negra) que no poseen la mutación en el gen codificante para la proteína BvgS.

II.4 DISCUSIÓN

Si bien pertussis ha sido tradicionalmente considerada una enfermedad aguda, es evidente que la bacteria, después de más de 60 años de vacunación sistemática, no ha podido todavía ser erradicada de su hospedador natural. En este sentido, las vacunas actuales no resultan efectivas para controlar eficazmente a estos organismos. Dilucidar los mecanismos moleculares que le permiten a estas bacterias persistir en el tracto respiratorio constituye un interesante desafío para poder implementar nuevas estrategias profilácticas y de tratamiento. Desde la re-emergencia de pertussis a nivel mundial ha existido un gran esfuerzo por avanzar en el esclarecimiento de las estrategias que adoptan estas bacterias frente a la vacunación. Este conocimiento permitiría una mejor evaluación de las fórmulas de las vacunas actualmente en uso y tal vez rediseñar el calendario de vacunación vigente. Muchos grupos alrededor del mundo han postulado la modificación antigénica como una de las principales causas de adaptación de las cepas circulantes a la vacunación masiva. Se ha demostrado en este sentido que muchas cepas clínicas han mutado varios de sus antígenos, incluyendo Toxina pertussis, Fim y PRN especialmente luego de la introducción del uso masivo de las vacunas acelulares (56-62). Si bien estos cambios podrían explicar la evasión de la bacteria a los ciclos de vacunación, nosotros consideramos que pueden existir mecanismos complementarios de adaptación que le faciliten a *B. pertussis* evadir la respuesta inmune y persistir en el hospedador. En esta dirección hipotetizamos que la vida en *biofilm* puede constituir uno de estos mecanismos. En nuestro laboratorio se ha demostrado la capacidad de la cepa de referencia Tohama I para formar *biofilm* tanto sobre superficies abióticas (polipropileno, vidrio, poliestireno) como bióticas, (modelos murinos). Sin embargo, se ha reportado que la cepa de referencia no es representativa de los organismos circulantes en la población y a partir de esta premisa se decidió estudiar el comportamiento de aislados clínicos en cuanto a la formación de *biofilm*. Los resultados reportados en este capítulo corresponden a una caracterización de la capacidad de crecer adheridos a perlas de polipropileno de ocho aislados clínicos que corresponden a una colección de cepas aisladas de pacientes con tos convulsa en el Hospital de Niños Sor Maria Ludovica de La Plata. Se ha demostrado que los mismos presentan una mayor capacidad de formación de *biofilm* sobre una superficie abiótica en comparación a la cepa de referencia. Dentro del grupo de aislados estudiados se seleccionó a la cepa circulante Bp2723 para

realizar estudios moleculares con el objetivo de entender mejor los mecanismos que le permiten formar una cantidad de biomasa sénil cinco veces superior a la que produce la cepa de referencia en las mismas condiciones experimentales. Los estudios de proteómica revelaron interesantes diferencias en el perfil de expresión de proteínas de este aislado respecto de la cepa *B. pertussis* Tohama I. Los análisis de componente principal indicaron que las mayores diferencias se asocian a la diferencia entre las cepas y luego a las condiciones de crecimiento. La mayoría de las 32 proteínas que se han encontrado diferencialmente expresadas entre estas cepas, crecidas tanto en *biofilm* como en condiciones plantónicas, corresponden a proteínas metabólicas, especialmente enzimas involucradas en la obtención de energía y proteínas de transporte. Aunque no se ha podido determinar específicamente una única vía metabólica que se encuentre exacerbada, es claro que las enzimas que se relacionan con la obtención de energía (dihidropalmitoil succinil transferasa y citrato sintasa) se encuentran sobre expresadas en la cepa Bp2723. Esto podría estar asociado con la alta velocidad de crecimiento y mayor capacidad de formación de biomasa del aislado clínico tanto en condiciones de crecimiento planctónico como en *biofilm*. Otro conjunto de proteínas que llamó nuestra atención y que se han encontrado sobre expresadas en la cepa Bp2723 en ambas condiciones de cultivo han sido cuatro factores de virulencia (BcrH2, OmpQ, Vag8 y BrkA) regulados positivamente por el sistema regulatorio de dos componentes BvgAS. Este sistema de regulación ha sido descrito como determinante en la formación de *biofilm* en la especie *B. pertussis*. Si el sistema no se encuentra activo, la bacteria es incapaz de formar *biofilm* (63, 64). Dada la importancia de este resultado, se decidió evaluar a nivel transcripcional el grado de expresión génica de un conjunto de factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS. Para este análisis se incluyeron los genes codificantes para las proteínas que observamos sobre expresadas en los geles 2D, así como también genes codificantes para proteínas de membrana o secretorias que podrían no haberse detectado en nuestros estudios sobre la fracción proteica citosólica. El análisis transcripcional de los genes estudiados mostró una buena correlación entre la expresión a nivel proteico y de los respectivos transcritos de sus genes codificantes para el caso de las proteínas BrkA, Vag8 y BcrH2 en el cultivo planctónico de la cepa clínica; los dos primeros mostraron la misma correlación cuando se compararon los cultivos en *biofilm*. En el caso de OmpQ y BcrH2 en cultivos en *biofilm* tal correlación no fue observada. En relación a esto resultan interesante resaltar que experimentos realizados en nuestro grupo aun no

publicados muestran que la expresión del gen *ompQ* en *biofilms* de *B. bronchiseptica* es máxima a las 48 h y disminuye a las 72 h, esto podría explicar la disminución observada de la expresión relativa de *ompQ* que podría no traducirse aun a las 72h en una disminución en la expresión de la proteína.

Otros genes codificantes de factores de virulencia que se observaron con mayor expresión relativa en la cepa clínica en cultivo sésil en relación a la cepa de referencia fueron las adhesinas FHA, Fim, PRN e incluso BipA. Todas estas adhesinas han sido relacionadas a la formación de *biofilm* en *B. pertussis*. FHA ha sido ampliamente estudiada en este sentido y se ha demostrado que es una de las adhesinas más importantes que interviene en diferentes etapas del desarrollo del *biofilm* tanto en cultivos *in vitro* como en cultivos *in vivo* realizados en la cavidad nasal de ratones. Ha sido involucrada no solo en la primera etapa de adhesión a la superficie sino también como factor necesario para el establecimiento de uniones célula-célula en *biofilms* en desarrollo (63, 67). La participación de PRN en la formación de *biofilm* ha sido demostrada a través del estudio del desarrollo de *biofilm* por parte de una cepa mutante para la expresión de la misma, resultando el *biofilm* formado significativamente menor al producido por la cepa salvaje. Esta proteína también ha sido observada sobre expresada en estudios de proteómica previamente reportados en células séviles de *B. pertussis* Tohama I cuando se las comparó con su contraparte planctónica (63). Un efecto similar de disminución parcial de la formación de *biofilm* ha sido observado para una cepa mutante en la expresión de Fim (44). Un dato adicional en el caso de esta última adhesina es en relación a su posible rol en la formación de fibras largas, que serían estructuras fundamentales de los cimientos del *biofilm* formado por *B. pertussis*. Tales fibras estarían generadas conjuntamente con la proteína Bsp22. En este sentido, se ha demostrado que un sistema regulatorio diferente del BvgAS estimularía la expresión de estos dos factores de virulencia que formarían estructuras de tipo filamentosas y que contribuirían a la formación del típico *biofilm* de *B. pertussis* (68). En el caso de la cepa Bp2723, tanto *bsp22* como *fim* se encontraron sobre expresados en cultivos séviles. A su vez, el gen codificante para BipA, otra importante adhesina, se encuentra expresado en las células séviles de la cepa clínica. Esta proteína está fuertemente relacionada a la formación de *biofilm*, especialmente en la fase intermedia y es, junto con FHA, la responsable de la capacidad auto-aglutinante de *B. pertussis* (69, 70). Si bien es regulada por el sistema BvgAS, su expresión es máxima en fase intermedia, por lo que llama la atención su sobre expresión conjunta con genes de virulencia

tardíos como *ptx*, codificante para la TP (71). Es interesante resaltar que en un trabajo publicado por nuestro laboratorio ya se había reportado una sobre expresión de esta proteína en el *biofilm* de *B. pertussis* Tohama I, cuando se lo comparó con su contraparte células planctónicas (65). Considerando toda esta información parecería que la sobre expresión de factores de virulencia en las células sésiles de la cepa Bp2723, especialmente de adhesinas estimularía la formación de uniones entre las bacterias y con el substrato así como también favorecería el desarrollo de filamentos largos que mantendrían unida la estructura del *biofilm*. De la misma manera, el aumento en la expresión de enzimas involucradas en el catabolismo bacteriano podrían contribuir con el aumento en la velocidad de crecimiento y la formación de *biofilms* más robustos.

En este trabajo se pudo demostrar que el aumento de la expresión de varios factores de virulencia dependientes del sistema BvgAS no está directamente relacionado a mutaciones en dicho sistema de regulación, en genes estructurales y/o en las regiones promotoras respectivas. La única mutación hallada, sorprendentemente presente en todas las cepas clínicas estudiadas no demostró relación directa con la cantidad de biomasa formada en *biofilm*. Esta mutación corresponde a un cambio de Lysina por Ácido Glutámico en la posición 705 de la proteína reguladora BvgS y fue interesantemente descrita por Herrou y col. en 2009 [53]. Si bien se ha reportado que la misma no afecta la virulencia de la cepa, ya que los ensayos de infección pulmonar en modelos murinos no indicaron diferencias en las UFC mL⁻¹ en comparación a la cepa salvaje, sí se ha probado que confiere a la bacteria un fenotipo de respuesta rápida a los agentes modulantes como el MgSO₄ y el Ácido Nicotínico. Esta propiedad puede ser considerada como una importante ventaja adaptativa en sí misma. Como es sabido, el mecanismo de transmisión de pertussis de un paciente a otro es a través de la inhalación de micro gotas de saliva, y en este proceso se ha postulado la intervención de *B. pertussis* en su fase avirulenta (Bvg⁻) o intermedia (Bvg^I). Si alguna de estas fases es la que corresponde a la forma en que se transmite la bacteria, entonces una rápida adaptación a un nuevo nicho, factible de colonizar, desencadenando en un corto período de tiempo la síntesis de adhesinas que aseguren el pegado irreversible a una superficie blanco le otorgaría a la bacteria altas probabilidades de anclarse a un nicho, que mediante acciones de *shear* hidromecánico trata de eliminarlas. De esta forma, estas bacterias ven favorecido su posterior desarrollo de *biofilm*. Otra posibilidad es que la bacteria se transmita en fase intermedia y se ubique en un nicho donde por las condiciones de temperatura no pueda

modular a fase virulenta, pero en este caso podría quedar retenida por la expresión de BipA. Cuando las condiciones se tornen favorables estos organismos podrían pasar a fase virulenta e iniciar la colonización. Los resultados de nuestra investigación demuestran que la evolución de estas bacterias muestra un gran impacto sobre los mecanismos de adhesión y formación de *biofilm*, favoreciendo y potenciando la capacidad de las mismas de desarrollarse bajo esta forma de vida. Los resultados expuestos indican que la ventaja de la mutación presente en todos los aislados clínicos estudiados representa una capacidad de adherirse con mayor rapidez a una superficie abiótica cuando provienen de un cultivo en condiciones modulantes. De modo que esta capacidad podría representar una importante ventaja durante la interacción dinámica que mantiene el patógeno con su hospedador. Sumado a esto, los resultados observados indicarían un aumento significativo en la expresión de muchos factores de virulencia en el aislado clínico estudiado independiente de la mutación hallada.

Dado que se han descrito otros sistemas o posibles elementos regulatorios en *Bordetella*, que incluso regularían los mismos factores de virulencia que el sistema BvgAS, tales como el GMP-di cíclico (72), el p(pp)gpp (68), *small RNA* (73) y el sistema de dos componentes RisAS (74) consideramos que el efecto observado en la cepa clínica Bp2723 podría ser el resultado de la confluencia de varios efectores regulatorios. Deberán realizarse nuevos estudios para establecer cuáles elementos regulatorios determinan el comportamiento observado.

II.5 CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este capítulo permiten arribar a las siguientes conclusiones:

i)- Todas las cepas de *B. pertussis* aisladas de pacientes infectados en el Hospital de Niños Sor Maria Ludovica poseen una capacidad exacerbada de producir *biofilm* en cultivos abióticos cuando se las compara con la cepa vacunal *B. pertussis* Tohama I.

ii)-La cepa Bp2723, presenta un aumento en la velocidad de crecimiento en cultivo líquido, cuando se la compara con la cepa de referencia.

iii)- Los estudios de proteómica y de expresión génica (qRT-PCR) indican que existe una diferencia significativa en la expresión de factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS en la cepa Bp2723 que incluyen fuertes adhesinas y que podrían ser responsables del aumento en la formación de *biofilm* por parte de la cepa Bp2723, sumado a la alta velocidad de duplicación.

iv)- La única mutación hallada en los genes codificantes para factores de virulencia y sus regiones promotoras en la cepa Bp2723 encontrada en la región *linker* del gen codificante para la proteína sensora BvgS no se encuentra asociada a un aumento en la formación de *biofilm*.

v)- La mutación hallada si estaría asociada a una adhesión más rápida a sustratos abióticos cuando proviene de un cultivo con condiciones modulantes.

II.6 BIBLIOGRAFÍA

1. Mooi, F. R., van Loo, I. H., and King, A. J. (2001) Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: a cause for its reemergence?, *Emerg Infect Dis* 7, 526-528.
2. Heikkinen, E., Kallonen, T., Saarinen, L., Sara, R., King, A. J., Mooi, F. R., Soini, J. T., Mertsola, J., and He, Q. (2007) Comparative genomics of *Bordetella pertussis* reveals progressive gene loss in Finnish strains, *PLoS One* 2, e904.
3. King, A. J., van Gorkom, T., Pennings, J. L., van der Heide, H. G., He, Q., Diavatopoulos, D., Heuvelman, K., van Gent, M., van Leeuwen, K., and Mooi, F. R. (2008) Comparative genomic profiling of Dutch clinical *Bordetella pertussis* isolates using DNA microarrays: identification of genes absent from epidemic strains, *BMC Genomics* 9, 311.
4. Mooi, F. R., van Loo, I. H., van Gent, M., He, Q., Bart, M. J., Heuvelman, K. J., de Greeff, S. C., Diavatopoulos, D., Teunis, P., Nagelkerke, N., and Mertsola, J. (2009) *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence, *Emerg Infect Dis* 15, 1206-1213.
5. Mooi, F. R., van Oirschot, H., Heuvelman, K., van der Heide, H. G., Gaastra, W., and Willems, R. J. (1998) Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution, *Infect Immun* 66, 670-675.
6. de Greeff, S. C., Mooi, F. R., Westerhof, A., Verbakel, J. M., Peeters, M. F., Heuvelman, C. J., Notermans, D. W., Elvers, L. H., Schellekens, J. F., and de Melker, H. E. (2010) Pertussis disease burden in the household: how to protect young infants, *Clin Infect Dis* 50, 1339-1345.
7. Hellenbrand, W., Beier, D., Jensen, E., Littmann, M., Meyer, C., Oppermann, H., Wirsing von Konig, C. H., and Reiter, S. (2009) The epidemiology of pertussis in Germany: past and present, *BMC Infect Dis* 9, 22.
8. Bottero, D., Gaillard, M. E., Fingermann, M., Weltman, G., Fernandez, J., Sisti, F., Graieb, A., Roberts, R., Rico, O., Rios, G., Regueira, M., Binsztein, N., and Hozbor, D. (2007) Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms, and surfaceome analysis of vaccine and clinical *Bordetella pertussis* strains, *Clin Vaccine Immunol* 14, 1490-1498.
9. Armangil, D., Tekinalp, G., Yurdakok, M., and Yalcin, E. (2010) Maternal pertussis is hazardous for a newborn: a case report, *Turk J Pediatr* 52, 206-210.
10. O'Toole, G., Kaplan, H. B., and Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development, *Annu Rev Microbiol* 54, 49-79.
11. Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clin Microbiol Rev* 15, 167-193.
12. Mishra, M., Parise, G., Jackson, K. D., Wozniak, D. J., and Deora, R. (2005) The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*, *J Bacteriol* 187, 1474-1484.
13. Gurung, J., Khyriem, A. B., Banik, A., Lyngdoh, W. V., Choudhury, B., and Bhattacharyya, P. (2013) Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit, *Indian J Crit Care Med* 17, 214-218.
14. Ito, A., Taniuchi, A., May, T., Kawata, K., and Okabe, S. (2009) Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms, *Appl Environ Microbiol* 75, 4093-4100.
15. Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., and Ciofu, O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms, *Int J Antimicrob Agents* 35, 322-332.
16. Seal, B. S., Hiett, K. L., Kuntz, R. L., Woolsey, R., Schegg, K. M., Ard, M., and Stintzi, A. (2007) Proteomic analyses of a robust versus a poor chicken gastrointestinal colonizing isolate of *Campylobacter jejuni*, *J Proteome Res* 6, 4582-4591.
17. Wu, K., and Zhang, Y. (2007) Clinical application of tear proteomics: Present and future prospects, *Proteomics Clin Appl* 1, 972-982.

18. Kint, G., Sonck, K. A., Schoofs, G., De Coster, D., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S. C. (2009) 2D proteome analysis initiates new insights on the Salmonella Typhimurium LuxS protein, *BMC Microbiol* 9, 198.
19. Marcellin, E., Gruber, C. W., Archer, C., Craik, D. J., and Nielsen, L. K. (2009) Proteome analysis of the hyaluronic acid-producing bacterium, Streptococcus zooepidemicus, *Proteome Sci* 7, 13.
20. Miyamoto, K., Kosakai, K., Ikebayashi, S., Tsuchiya, T., Yamamoto, S., and Tsujibo, H. (2009) Proteomic analysis of Vibrio vulnificus M2799 grown under iron-repleted and iron-depleted conditions, *Microb Pathog* 46, 171-177.
21. Brickman, T. J., Cummings, C. A., Liew, S. Y., Relman, D. A., and Armstrong, S. K. (2011) Transcriptional profiling of the iron starvation response in Bordetella pertussis provides new insights into siderophore utilization and virulence gene expression, *J Bacteriol* 193, 4798-4812.
22. Aires, J., Anglade, P., Baraige, F., Zagorec, M., Champomier-Verges, M. C., and Butel, M. J. (2010) Proteomic comparison of the cytosolic proteins of three Bifidobacterium longum human isolates and B. longum NCC2705, *BMC Microbiol* 10, 29.
23. Vashist, J., Tiwari, V., Kapil, A., and Rajeswari, M. R. (2010) Quantitative profiling and identification of outer membrane proteins of beta-lactam resistant strain of Acinetobacter baumannii, *J Proteome Res* 9, 1121-1128.
24. Cash, P. (2009) Proteomics in the study of the molecular taxonomy and epidemiology of bacterial pathogens, *Electrophoresis* 30 Suppl 1, S133-141.
25. Graham, R., Graham, C., and McMullan, G. (2007) Microbial proteomics: a mass spectrometry primer for biologists, *Microb Cell Fact* 6, 26.
26. Patton, W. F. (2002) Detection technologies in proteome analysis, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 771, 3-31.
27. Hamdan, M., and Righetti, P. G. (2002) Modern strategies for protein quantification in proteome analysis: advantages and limitations, *Mass Spectrom Rev* 21, 287-302.
28. Wen, Z. T., Yates, D., Ahn, S. J., and Burne, R. A. (2010) Biofilm formation and virulence expression by Streptococcus mutans are altered when grown in dual-species model, *BMC Microbiol* 10, 111.
29. Samaranayake, Y. H., Cheung, B. P., Yau, J. Y., Yeung, S. K., and Samaranayake, L. P. (2013) Human serum promotes Candida albicans biofilm growth and virulence gene expression on silicone biomaterial, *PLoS One* 8, e62902.
30. Neidig, A., Yeung, A. T., Rosay, T., Tettmann, B., Stempel, N., Rueger, M., Lesouhaitier, O., and Overhage, J. (2013) TypA is involved in virulence, antimicrobial resistance and biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa, *BMC Microbiol* 13, 77.
31. Pastar, I., Nusbaum, A. G., Gil, J., Patel, S. B., Chen, J., Valdes, J., Stojadinovic, O., Plano, L. R., Tomic-Canic, M., and Davis, S. C. (2013) Interactions of methicillin resistant Staphylococcus aureus USA300 and Pseudomonas aeruginosa in polymicrobial wound infection, *PLoS One* 8, e56846.
32. Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D., Wengenack, N. L., Rosenblatt, J. E., Cockerill, F. R., 3rd, and Smith, T. F. (2006) Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing, *Clin Microbiol Rev* 19, 165-256.
33. Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., and Pfaffl, M. W. (2005) Quantitative real-time RT-PCR--a perspective, *J Mol Endocrinol* 34, 597-601.
34. O'Toole, G. A., and Kolter, R. (1998) Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis, *Mol Microbiol* 28, 449-461.
35. Ehling-Schulz, M., Schulz, S., Wait, R., Gorg, A., and Scherer, S. (2002) The UV-B stimulon of the terrestrial cyanobacterium Nostoc commune comprises early shock proteins and late acclimation proteins, *Mol Microbiol* 46, 827-843.

36. Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., and Weiss, W. (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, *Electrophoresis* 21, 1037-1053.
37. Radwan, M., Miller, I., Grunert, T., Marchetti-Deschmann, M., Vogl, C., O'Donoghue, N., Dunn, M. J., Kolbe, T., Allmaier, G., Gemeiner, M., Muller, M., and Strobl, B. (2008) The impact of tyrosine kinase 2 (Tyk2) on the proteome of murine macrophages and their response to lipopolysaccharide (LPS), *Proteomics* 8, 3469-3485.
38. Grunert, T., Leitner, N. R., Marchetti-Deschmann, M., Miller, I., Wallner, B., Radwan, M., Vogl, C., Kolbe, T., Kratky, D., Gemeiner, M., Allmaier, G., Muller, M., and Strobl, B. (2011) A comparative proteome analysis links tyrosine kinase 2 (Tyk2) to the regulation of cellular glucose and lipid metabolism in response to poly(I:C), *J Proteomics* 74, 2866-2880.
39. Blum, H., Gross, H. J., and Beier, H. (1989) The expression of the TMV-specific 30-kDa protein in tobacco protoplasts is strongly and selectively enhanced by actinomycin, *Virology* 169, 51-61.
40. Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S., and Mische, S. M. (1999) Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity, *Electrophoresis* 20, 601-605.
41. Nicholson, T. L., Brockmeier, S. L., Loving, C. L., Register, K. B., Kehrl, M. E., Jr., Stibitz, S. E., and Shore, S. M. (2012) Phenotypic modulation of the virulent Bvg phase is not required for pathogenesis and transmission of *Bordetella bronchiseptica* in swine, *Infect Immun* 80, 1025-1036.
42. Conover, M. S., Redfern, C. J., Ganguly, T., Sukumar, N., Sloan, G., Mishra, M., and Deora, R. (2012) BpsR modulates *Bordetella* biofilm formation by negatively regulating the expression of the Bps polysaccharide, *J Bacteriol* 194, 233-242.
43. Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res* 29, e45.
44. Serra, D. O. (2008) Caracterización fenotípica de *Bordetella pertussis* creciendo en cultivos continuos en *biofilm*, *Tesis Doctoral de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP*.
45. Medhekar, B., Shrivastava, R., Mattoo, S., Gingery, M., and Miller, J. F. (2009) *Bordetella* Bsp22 forms a filamentous type III secretion system tip complex and is immunoprotective in vitro and in vivo, *Mol Microbiol* 71, 492-504.
46. Inatsuka, C. S., Xu, Q., Vujkovic-Cvijin, I., Wong, S., Stibitz, S., Miller, J. F., and Cotter, P. A. (2010) Pertactin is required for *Bordetella* species to resist neutrophil-mediated clearance, *Infect Immun* 78, 2901-2909.
47. Arico, B., Nuti, S., Scarlato, V., and Rappuoli, R. (1993) Adhesion of *Bordetella pertussis* to eukaryotic cells requires a time-dependent export and maturation of filamentous hemagglutinin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9204-9208.
48. Relman, D. A., Domenighini, M., Tuomanen, E., Rappuoli, R., and Falkow, S. (1989) Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2637-2641.
49. Mazar, J., and Cotter, P. A. (2006) Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion, *Mol Microbiol* 62, 641-654.
50. Chen, Q., Decker, K. B., Boucher, P. E., Hinton, D., and Stibitz, S. (2010) Novel architectural features of *Bordetella pertussis* fimbrial subunit promoters and their activation by the global virulence regulator BvgA, *Mol Microbiol* 77, 1326-1340.
51. Loch, C. (1999) Molecular aspects of *Bordetella pertussis* pathogenesis, *Int Microbiol* 2, 137-144.
52. Bogdan, J. A., Nazario-Larrieu, J., Sarwar, J., Alexander, P., and Blake, M. S. (2001) *Bordetella pertussis* autoregulates pertussis toxin production through the metabolism of cysteine, *Infect Immun* 69, 6823-6830.
53. Gross, R., Carbonetti, N. H., Rossi, R., and Rappuoli, R. (1992) Functional analysis of the pertussis toxin promoter, *Res Microbiol* 143, 671-681.

54. Herrou, J., Debie, A. S., Willery, E., Renaud-Mongenie, G., Locht, C., Mooi, F., Jacob-Dubuisson, F., and Antoine, R. (2009) Molecular evolution of the two-component system BvgAS involved in virulence regulation in *Bordetella*, *PLoS One* 4, e6996.
55. Dupre, E., Wohlkonig, A., Herrou, J., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., and Antoine, R. (2013) Characterization of the PAS domain in the sensor-kinase BvgS: mechanical role in signal transmission, *BMC Microbiol* 13, 172.
56. Borisova, O., Kombarova, S. Y., Zakharova, N. S., van Gent, M., Aleshkin, V. A., Mazurova, I., and Mooi, F. R. (2007) Antigenic divergence between *Bordetella pertussis* clinical isolates from Moscow, Russia, and vaccine strains, *Clin Vaccine Immunol* 14, 234-238.
57. de Gouw, D., Diavatopoulos, D. A., Bootsma, H. J., Hermans, P. W., and Mooi, F. R. (2011) Pertussis: a matter of immune modulation, *FEMS Microbiol Rev* 35, 441-474.
58. de Greeff, S. C., de Melker, H. E., van Gageldonk, P. G., Schellekens, J. F., van der Klis, F. R., Mollema, L., Mooi, F. R., and Berbers, G. A. (2010) Seroprevalence of pertussis in The Netherlands: evidence for increased circulation of *Bordetella pertussis*, *PLoS One* 5, e14183.
59. Fingerhann, M., Fernandez, J., Sisti, F., Rodriguez, M. E., Gatti, B., Bottero, D., Graieb, A., Gaillard, M. E., Ayala, S. G., Mooi, F. R., Lopardo, H., and Hozbor, D. (2006) Differences of circulating *Bordetella pertussis* population in Argentina from the strain used in vaccine production, *Vaccine* 24, 3513-3521.
60. Mastrantonio, P., Spigaglia, P., van Oirschot, H., van der Heide, H. G., Heuvelman, K., Stefanelli, P., and Mooi, F. R. (1999) Antigenic variants in *Bordetella pertussis* strains isolated from vaccinated and unvaccinated children, *Microbiology* 145 (Pt 8), 2069-2075.
61. Heikkinen, E., Xing, D. K., Olander, R. M., Hytonen, J., Viljanen, M. K., Mertsola, J., and He, Q. (2008) *Bordetella pertussis* isolates in Finland: serotype and fimbrial expression, *BMC Microbiol* 8, 162.
62. Mosiej, E., Augustynowicz, E., Zawadka, M., Dabrowski, W., and Lutynska, A. (2011) Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates circulating in Poland after 50 years of whole-cell pertussis vaccine use, *J Clin Microbiol* 49, 1452-1457.
63. Irie, Y., Mattoo, S., and Yuk, M. H. (2004) The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*, *J Bacteriol* 186, 5692-5698.
64. Serra, D., Bosch, A., Russo, D. M., Rodriguez, M. E., Zorreguieta, A., Schmitt, J., Naumann, D., and Yantorno, O. (2007) Continuous nondestructive monitoring of *Bordetella pertussis* biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy and other corroborative techniques, *Anal Bioanal Chem* 387, 1759-1767.
65. Serra, D. O., Lucking, G., Weiland, F., Schulz, S., Gorg, A., Yantorno, O. M., and Ehling-Schulz, M. (2008) Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*, *Proteomics* 8, 4995-5010.
66. Nakamura, M. M., Liew, S. Y., Cummings, C. A., Brinig, M. M., Dieterich, C., and Relman, D. A. (2006) Growth phase- and nutrient limitation-associated transcript abundance regulation in *Bordetella pertussis*, *Infect Immun* 74, 5537-5548.
67. Serra, D. O., Conover, M. S., Arnal, L., Sloan, G. P., Rodriguez, M. E., Yantorno, O. M., and Deora, R. (2011) FHA-Mediated Cell-Substrate and Cell-Cell Adhesions Are Critical for *Bordetella pertussis* Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and in the Mouse Nose and the Trachea, *PLoS One* 6, e28811.
68. Sugisaki, K., Hanawa, T., Yonezawa, H., Osaki, T., Fukutomi, T., Kawakami, H., Yamamoto, T., and Kamiya, S. (2013) Role of (p)ppGpp in biofilm formation and expression of filamentous structures in *Bordetella pertussis*, *Microbiology* 159, 1379-1389.
69. Deora, R. (2004) Multiple mechanisms of bipA gene regulation by the *Bordetella* BvgAS phosphorelay system, *Trends Microbiol* 12, 63-65.
70. Deora, R. (2002) Differential regulation of the *Bordetella* bipA gene: distinct roles for different BvgA binding sites, *J Bacteriol* 184, 6942-6951.

71. Deora, R., Bootsma, H. J., Miller, J. F., and Cotter, P. A. (2001) Diversity in the Bordetella virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene, *Mol Microbiol* 40, 669-683.
72. Sisti, F., Ha, D. G., O'Toole, G. A., Hozbor, D., and Fernandez, J. (2013) Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in Bordetella bronchiseptica, *Microbiology* 159, 869-879.
73. Hot, D., Slupek, S., Wulbrecht, B., D'Hondt, A., Hubans, C., Antoine, R., Locht, C., and Lemoine, Y. (2011) Detection of small RNAs in Bordetella pertussis and identification of a novel repeated genetic element, *BMC Genomics* 12, 207.
74. Stenson, T. H., Allen, A. G., Al-Meer, J. A., Maskell, D., and Peppler, M. S. (2005) Bordetella pertussis risA, but not risS, is required for maximal expression of Bvg-repressed genes, *Infect Immun* 73, 5995-6004.

CAPÍTULO III

Estudio de la presencia de factores de virulencia en la superficie de células individuales de *B. pertussis*. Introducción a la Microscopía de Fuerza Atómica

Índice

III.1 Microscopía de Fuerza Atómica (MFA)	99
III.1.1 Fundamento	99
III.1.2 Los componentes del MFA	100
III.1.3 Fuerzas que operan entre la punta y la muestra	102
III.1.4 Los cantilevers	104
III.1.5 Modos de operación del MFA	104
III.1.6. Imagen de Force Volume (Force Volume Imaging)	107
III.1.7. Estudios de propiedades nanomecánicas mediante MFA	109
III.1.8. Espectroscopia de Fuerzas	113
III.2 BIBLIOGRAFÍA	114

Comentarios

Los resultados expuestos en el capítulo anterior indicarían que un aumento en la expresión de factores de virulencia, principalmente adhesinas en la cubierta de células de la cepa clínica Bp2723 le conferirían a las mismas una mayor capacidad para desarrollar un *biofilm*. La presencia de “un mayor número de adhesinas” implicaría en consecuencia tener más ventajas en las etapas de adhesión y de estructuración del *biofilm* maduro. Además se debería tener en cuenta en este análisis las posibles ventajas que la formación de un *biofilm* le aportaría a estas bacterias en relación a los tratamientos con antibióticos y frente al sistema inmune del hospedador. Las técnicas que se utilizaron para evaluar la expresión de factores de virulencia fueron los estudios de proteómica y qRT-PCR. Si bien éstas poseen alta sensibilidad, requieren de la utilización de métodos invasivos para la obtención de resultados. El procesamiento de los cultivos puede tardar uno o dos días y la cantidad de cultivo inicial deber ser considerablemente alta. Por estos motivos se decidió complementar los estudios realizados con la utilización de una técnica no invasiva y de resolución nanométrica para estudiar la presencia de factores de virulencia en células de *B. pertussis*. Para tal fin la técnica elegida fue la Microscopia de Fuerza Atómica, una metodología que permite identificar la presencia de factores de virulencia en la superficie de las bacterias y realizar medidas en ambientes muy semejantes a los fisiológicos. El objetivo final de estos estudios fue el de desarrollar un método no invasivo y rápido de caracterización de cepas de *B. pertussis* circulantes en la población.

Se plantearon objetivos de corto y largo plazo:

- Los objetivos de corto plazo incluyeron: estudiar la expresión y distribución de la principal adhesina bacteriana (FHA), en la superficie de células individuales pertenecientes a

la cepa adaptada al laboratorio *B. pertussis* Tohama I. Se eligió utilizar en primera instancia dicha cepa ya que la misma posee baja patogenicidad en comparación a los aislados clínicos, ha sido ampliamente caracterizada desde su aislamiento en el año 1950 y por el hecho de que se dispone en el laboratorio de una cepa mutante defectiva en la expresión de la adhesina en estudio. Conjuntamente con la caracterización de la distribución espacial se planteó lograr una caracterización temporal de la localización de la adhesina en la superficie de células individuales.

- Los objetivos de largo plazo incluyen: lograr la identificación de FHA y de otros factores de virulencia así como estudiar su dinámica temporal en la superficie de aislados clínicos de *B. pertussis*, de modo de conseguir el desarrollo de una herramienta que conjuntamente con las técnicas moleculares disponibles permitiera una caracterización rápida de las cepas circulantes en la comunidad.

En los próximos dos capítulos se exponen los experimentos realizados en función de cumplimentar los objetivos de corto plazo y se espera poder continuar en los próximos años con los experimentos que ayuden a resolver los objetivos de largo plazo.

A continuación se expondrán los fundamentos básicos de la técnica utilizada.

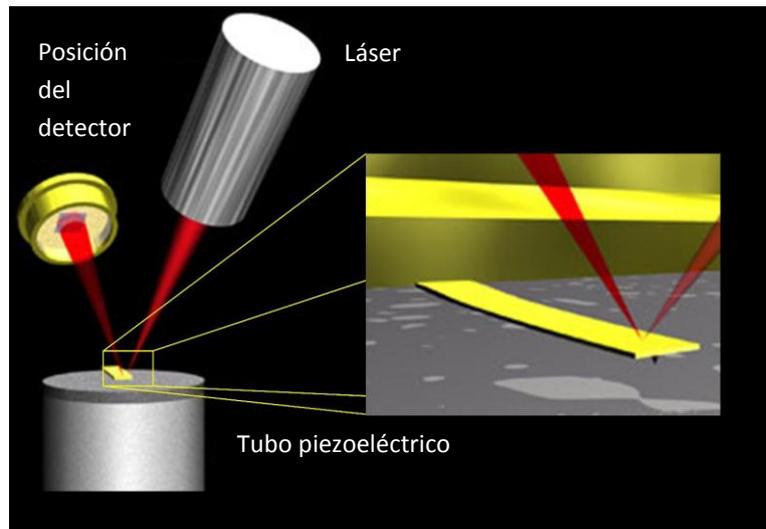
III.1 Microscopía de Fuerza Atómica (MFA)

III.1.1 Fundamento

El Microscopio de Fuerza Atómica (MFA) es un equipo que pertenece a los microscopios de barrido por sondas (del inglés *Scanning Probe Microscopes*). Fue desarrollado en 1986 por Binnig, Quate y Gerber (2) para poder obtener imágenes de alta resolución en muestras no conductoras ya que su antecesor, el Microscopio de Efecto Túnel (STM), si bien podía ofrecer una resolución mayor que la de los microscopios electrónicos, requería que las muestras fueran conductoras. Con la invención del MFA, se abrió un nuevo campo de estudio de materiales biológicos, ya que permite trabajar en un ambiente líquido, con lo que las medidas pueden ser realizadas en condiciones semejantes a las fisiológicas (3-5). Este equipo permite no solo obtener imágenes de altísima resolución sino que además es apropiado para realizar estudios novedosos de las propiedades mecánicas de moléculas, células, biosuperficies, etc (6-9). Asimismo, a través de la Espectroscopia de Fuerzas permite identificar y cuantificar las fuerzas existentes al interaccionar diferentes moléculas y analizar el plegamiento y desplegamiento de proteínas y otras biomoléculas (10-12).

En el MFA una punta de radio de curvatura muy pequeño (2-20nm) recorre la muestra de manera que ambas se encuentren en contacto o a una distancia muy pequeña (0,5-10,0 nm), manteniendo la fuerza aplicada o la distancia entre ambas constante. Cuando la punta, que está sostenida en el extremo de un soporte flexible llamado *cantilever* se mueve como consecuencia de haber encontrado una superficie con relieve o depresión se produce una deflexión, positiva o negativa que es transmitida a un detector y de esta manera se genera una imagen de la topografía de la muestra. Casi todos los MFA utilizan un sistema de detección mediante el reflejo de un rayo láser en la parte posterior de la punta soportada sobre el *cantilever*. Brevemente, el rayo láser se hace incidir sobre la superficie reflectora de un *cantiléver*. Luego de ser reflejado, el láser es direccionado por medio de un espejo e incide en un fotodetector, que transforma la señal óptica en eléctrica. A través del *software* se fija un valor de potencial en el fotodiodo que establece la condición de operación a una fuerza de interacción constante. Cuando ocurren modificaciones de esta condición debido a la topografía de la muestra, un sistema de retroalimentación permite restablecerla modificando la distancia punta-muestra a través del movimiento del barredor piezoeléctrico

o escáner solidario a la punta o a la muestra dependiendo del diseño del microscopio. (Figura 1) (4).



Creado por David Basech del Instituto de Tecnología de California

Figura 1. Esquema de funcionamiento del MFA. Se observa el láser que incide en la superficie reflectora del *cantilever* y es direccionado hacia el fotodetector.

III.1.2 Los componentes del MFA

Los elementos que componen un MFA son una base, un barredor piezoeléctrico o escáner y una cabeza óptica (Figura 2). La base contiene los circuitos electrónicos que le permiten conectarse a la unidad de control, el escáner es un elemento piezoeléctrico tubular que genera movimientos en los ejes z , x e y cuando se le aplica una diferencia de potencial eléctrico. El escáner puede ser solidario a la punta o a la muestra dependiendo del modelo de MFA del que se trate y es el elemento de regulación con el cual la punta o la muestra se alejan o se acercan para mantener la fuerza constante durante la medida. Finalmente, la cabeza óptica posee ella misma varios componentes, un láser, un espejo y un detector. Los detectores son fotodiodos que transforman una señal láser en potencial eléctrico. Existen fotodiodos de dos y de cuatro sectores. Este último diseño permite obtener además de resolución en dirección z , el seguimiento de las torsiones laterales de la punta.

En la Figura 3 se puede observar un MFA *Multimode* acoplado a una unidad de control Nanoscope V (marca Bruker, Santa Bárbara, USA) con el que se realizaron la mayoría de las medidas que se presentan en este trabajo de Tesis. Se observa una unidad de control conectada a la base del microscopio, sobre la que descansa el barredor piezoeléctrico encima del cual se coloca la muestra, soportada sobre un portamuestras imantado. La cabeza óptica se encuentra fijada mediante dos resortes. Las puntas o sensores de fuerza

van montadas en un portapuntas que se coloca encima de la muestra. Los portapuntas pueden ser de dos tipos (ver Figura 2): abiertos, si se van a realizar las medidas en aire o cerrados si se va a trabajar en un ambiente líquido. Este último tipo de portapuntas se denomina celda de líquidos y posee dos orificios que permiten el ingreso y salida de las soluciones, facilitando de esta manera mantener hidratada la muestra mientras se realizan las medidas y también introducir nuevas soluciones durante el transcurso del experimento.

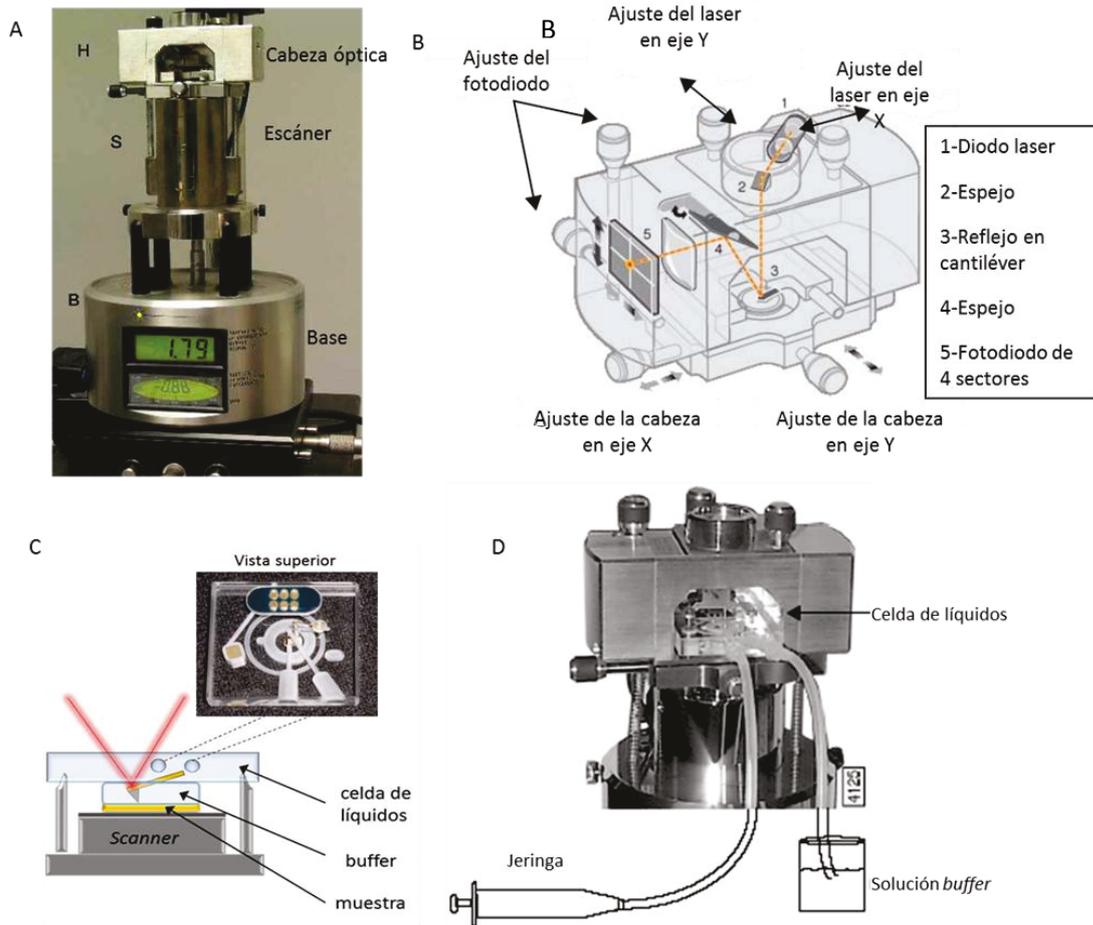


Figura 2. Componentes del MFA: (A) base, barredor piezoeléctrico y cabezal óptico, (B) cabeza óptica con sistema de láser, espejos y detector y (C) celda de líquidos y esquema de montaje sobre un barredor piezoeléctrico solidario a la muestra. Por los dos canales señalados ingresan y salen las soluciones durante la medida como se ejemplifica en D.

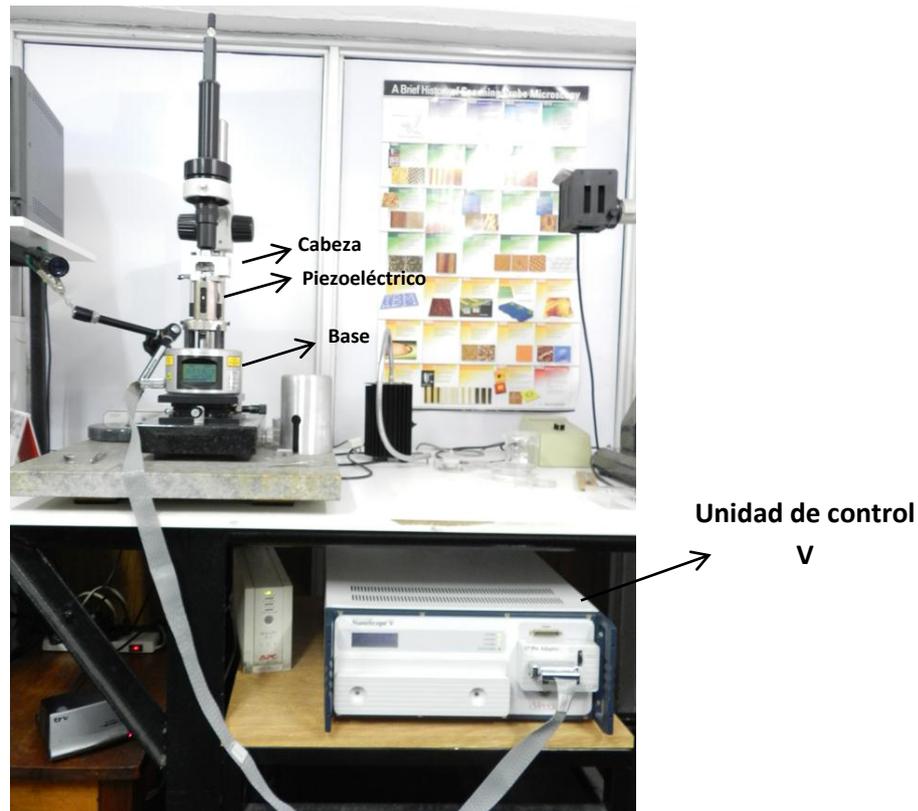


Figura 3. Microscopio *Multimode* acoplado a la unidad de control V, Bruker. Se observa la base del microscopio, el piezoeléctrico solidario a la muestra, la cabeza óptica y una cámara de video utilizada para observar la muestra y la punta simultáneamente.

III.1.3 Fuerzas que operan entre la punta y la muestra

Como se explicó anteriormente, la sonda o punta acoplada al *cantilever* barre la muestra y sensa las fuerzas de interacción que existen entre ellas, que idealmente corresponden a las fuerzas de interacción entre los átomos superficiales de la punta y los átomos superficiales de la muestra. Para el estudio de estas fuerzas intermoleculares, se utilizan los modelos de energía potencial. Uno de los modelos más aceptados es el propuesto por Lennard-Jones en 1924, que propone que la energía potencial entre dos átomos modelizados como dos esferas, se describe con la siguiente ecuación (1, 13, 14):

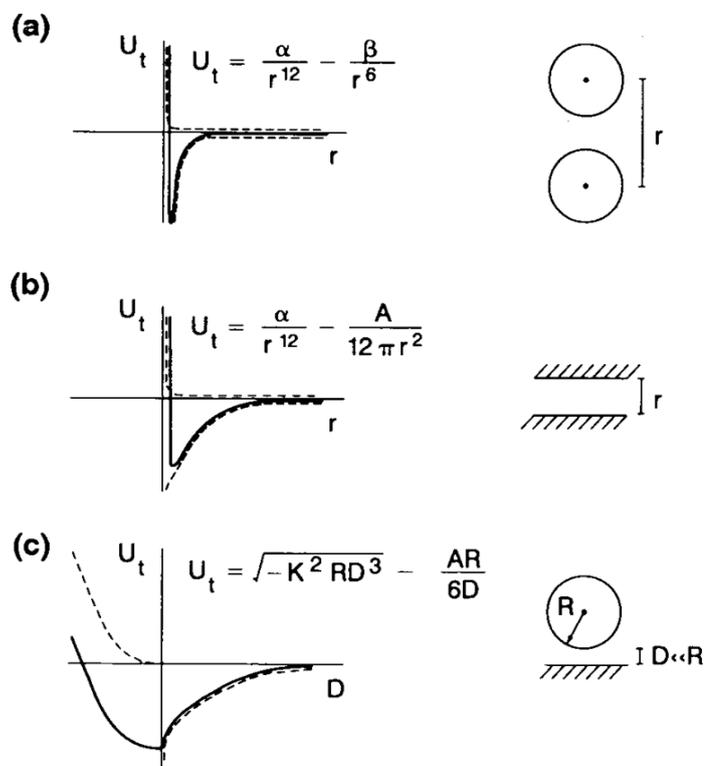
$$V(r) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (1)$$

Donde r es la separación entre los átomos, ϵ es la energía potencial en el mínimo, y σ es el diámetro molecular efectivo. La función que representa la ecuación de Lennard-Jones se

puede observar también en la Figura 4 (a). A distancias largas, las fuerzas que predominan son de tipo atractivo y su comportamiento se rige con el término $(\sigma/r)^6$, que representa el comportamiento de energía de las interacciones de tipo van der Waals. Cuando la distancia entre los átomos es igual al diámetro molecular efectivo, la energía potencial es 0 y a partir de este momento, las fuerzas gobernantes de la interacción comienzan a ser repulsivas, debido a la superposición de orbitales electrónicos como describe el principio de exclusión de Pauli.

La ecuación 1 puede ser modificada considerando otras geometrías de la punta y la muestra de manera que las funciones obtenidas sean más adecuadas para la geometría real, tal como se muestra en la Figura 4 b y c:

Figura 4



Donde U_t es la energía potencial de interacción y r o D las distancias entre los objetos que interactúan. Se debe tener en cuenta que la fuerza es la variación de la energía en función de la variación de la distancia (dU/dr). Imagen extraída de Scanning tunneling microscopy and spectroscopy: Theory, techniques, and applications (15).

III.1.4 Los *cantilevers*

Como se ha indicado anteriormente, la punta que se utiliza para recorrer la muestra está sostenida sobre soportes flexibles triangulares o rectangulares denominados *cantilevers*, que a su vez se encuentran unidos en forma solidaria a los extremos de una “oblea” o soporte que los sostiene. Típicamente, las medidas de la “oblea” son de 3,5 mm x 1,6 mm x 0,5 mm. En cada borde pueden encontrarse hasta cinco *cantilevers*, dependiendo del modelo que se elija. Las puntas, que normalmente tienen forma de pirámide, se encuentran orientadas hacia el lado de abajo del *cantilever*, de modo que cuando se coloca el portapuntas, la punta quede enfrentada a la muestra. Las puntas son estructuras muy pequeñas que normalmente tienen 5 μm de alto y un radio de curvatura variable de acuerdo a los modelos comerciales disponibles (Figura 5). Cuanto más aguda sea la punta mayor será la resolución obtenida ya que la cantidad de átomos que interactúan con la muestra será menor. Este es un parámetro muy importante a tener en cuenta en el momento de la elección de las puntas de acuerdo a los objetivos del experimento. El material más comúnmente empleado en la fabricación de los *cantilevers* para MFA, es el Si o Si_3N_4 , aunque también existen puntas de Au, Pt/Ir, diamante o puntas modificadas con películas magnéticas para aplicaciones específicas.

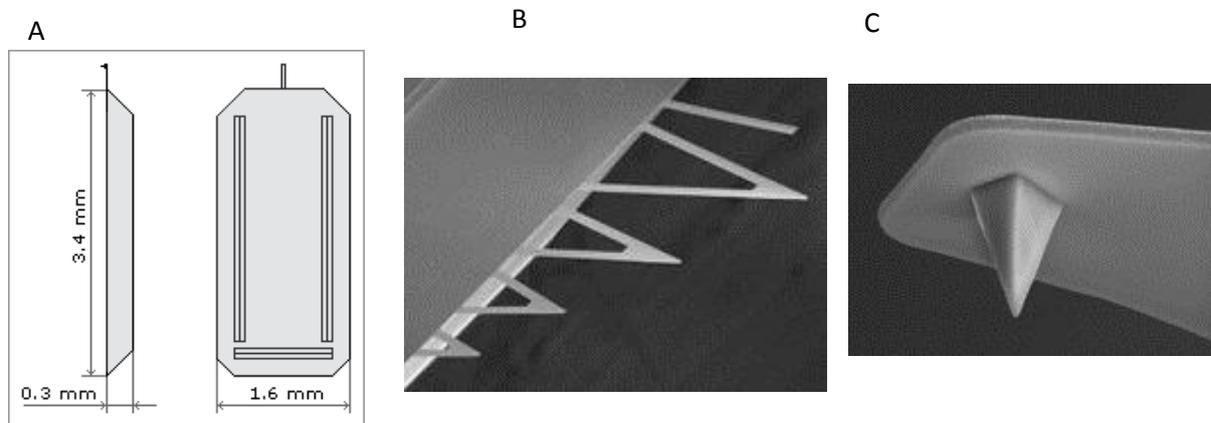


Figura 5. Esquema de una oblea y *cantilever* típico (A) e imágenes de los *cantilevers* triangulares y rectangulares de Si_3N_4 (B) así como también de la punta con la que se realizan las medidas (C), donde se observa su forma piramidal. (Imágenes tomadas de <http://www.bruker.com/>).

III.1.5 Modos de operación del MFA

Una vez que la muestra y la punta están montadas en el microscopio se debe elegir el régimen en el que se va a trabajar. Para estudios topográficos existen tres formas de trabajo, el modo contacto, en el que la punta y la muestra se encuentran muy cercanas unas a otras (<0,5nm) de manera que las fuerzas que intervienen en la interacción son de tipo repulsivas

(ver Figura 6), el modo de contacto intermitente, en el que la distancia punta-muestra es mayor (0,5-2nm) y las fuerzas de interacción gobernantes oscilan entre atractivas y repulsivas (Figura 6) o el modo no contacto en el que la distancia es mayor (2-10nm) y donde las fuerzas son de tipo atractivo de van der Waals (Figura 6). En el presente trabajo de Tesis se utilizó el modo contacto para realizar los experimentos utilizando el MFA y es por eso que a continuación se explica con mayor detalle.

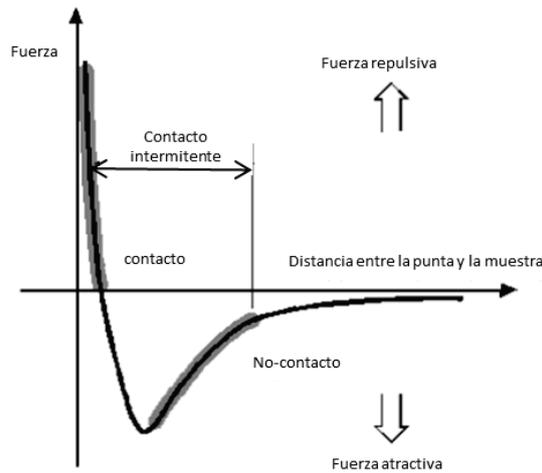


Figura 6. Representación de las fuerzas de interacción gobernantes en los diferentes modos de trabajo del MFA.

Modo Contacto: bajo este régimen, la punta y la muestra se encuentran interaccionando en la zona repulsiva mientras que la punta recorre la muestra en las direcciones x e y . A través del *software* se mantiene un valor de deflexión constante en el *cantilever*, de tal manera que la distancia punta-muestra sea la misma durante todo el barrido. El valor de deflexión constante elegido se denomina *setpoint* y para mantenerlo invariable, existe un mecanismo de retroalimentación que realiza un seguimiento continuo de la posición del láser incidente en el fotodetector (restando los valores de detección del cuadrante superior e inferior del detector) y modificando, según sea necesario, la posición en el eje z del piezoeléctrico para mantener la condición de deflexión constante. Con los datos de desplazamiento vertical para cada punto ($x; y$) se grafica la imagen topográfica de la muestra. También se obtienen imágenes de deflexión para cada uno de los puntos que conforman la imagen (normalmente 512x512), con los que se construye una imagen comúnmente denominada imagen de señal de error (*deflection error*) de la que no se puede extraer información cuantitativa pero que es más útil a la hora de identificar estructuras presentes en las muestras ya que se resaltan,

en esta imagen las zonas de los bordes. Esta situación ocurre ya que en los bordes, al ser zonas donde se producen cambios bruscos de altura, el mecanismo de retroalimentación no alcanza a corregir la deflexión en el tiempo de barrido y esto se observa como un cambio de contraste en la imagen (4).

Otro tipo de imagen que se puede obtener en este modo de operación son las imágenes de fricción, que se generan a partir de la resta de la señal incidente en los cuadrantes izquierdo y derecho del fotodetector. Esta imagen ofrece información acerca de las fuerzas laterales que operan entre la punta y la muestra (16).

Dado que el sistema funciona manteniendo a la punta en contacto directo con la muestra se debe tener en cuenta que se corre el riesgo de dañar la muestra si es demasiado blanda o de dañar la punta durante el barrido si la muestra es demasiado rígida.

Además de utilizarse este modo de operación para la obtención de imágenes topográficas, se puede aprovechar la flexibilidad de los *cantilevers* para ser utilizados como un sensor de fuerzas. Al ser estructuras deformables y elásticas, los *cantilevers* pueden ser considerados como resortes y su comportamiento puede ser modelado utilizando la Ley de Hooke (14):

$$F = -k x \quad (2)$$

Donde F es la Fuerza, k es la constante de resorte y x es la magnitud de la deflexión del *cantilever*. La constante de resorte (k) es propia de cada *cantilever* y depende de la geometría y dimensiones del mismo. Hoy en día existen en el mercado puntas que poseen constantes elásticas que van desde los 0,01 a los 50 N/m, de esta manera, dependiendo del *cantilever* elegido se pueden sentir fuerzas que van desde los pN hasta los μ N. Para poder cuantificar estas fuerzas, el equipo permite la obtención de las denominadas curvas de Fuerza vs. Distancia tal como la que se muestra en la Figura 7. Como allí se observa, la curva se construye registrando la deflexión del *cantilever* en la dirección z en un punto (x, y) definido en la superficie. En el momento en que la aproximación comienza, el valor de la deflexión es cero ya que la punta se encuentra lejos de la superficie (zona I en la Figura 7). Continuando con el acercamiento en la zona II, la punta encuentra el primer punto de contacto con la superficie. En este momento también es posible observar un pequeño pico por debajo de la línea de no contacto debido a la presencia de fuerzas atractivas que luego desaparecen debido al ingreso en el régimen repulsivo cuando prosigue la aproximación (zona III). Hasta este punto la curva se denomina curva de aproximación. Cuando la punta se

aleja de la superficie comienza a registrarse la curva de retracción que puede mostrar un pico de adhesión entre la punta y la muestra (zona IV). Al proseguir la retracción de la punta se vencen las fuerzas de adhesión y se recupera el comportamiento típico de la zona I donde no opera fuerza alguna. La cuantificación de la diferencia entre el punto mínimo de la curva de retracción y el valor de la deflexión en la zona de no-contacto (cero) nos indica la magnitud de la fuerza de interacción entre nuestra punta y la muestra (17, 18) (IV en el gráfico 7).

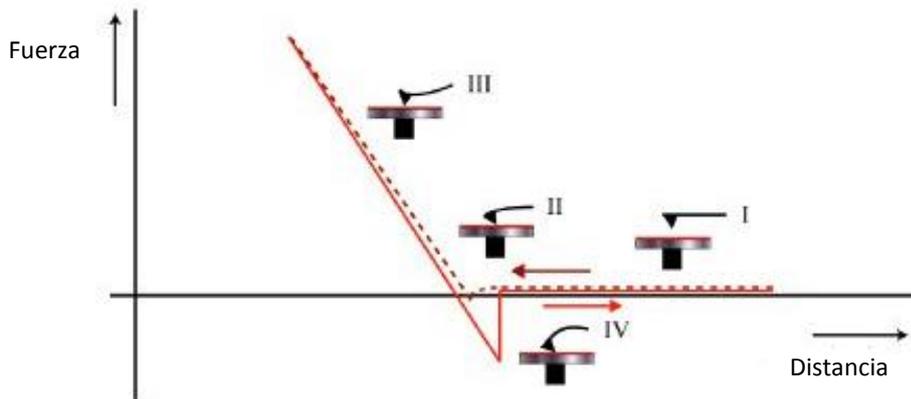


Figura 7. Curva de fuerza típica obtenida con el MFA. En ella se observan cuatro zonas. En la zona I la punta se encuentra alejada de la superficie, es la zona de no contacto. La zona II representa el punto de contacto inicial entre la punta y la muestra, a partir de allí, la zona III corresponde a la zona de contacto, donde gobiernan las fuerzas repulsivas. La zona IV, corresponde al punto de separación luego de la retracción de la punta. El pico que se observa corresponde a un evento de adhesión.

La utilización de las curvas Fuerza vs. Distancia representó el inicio del campo de la Espectroscopia de Fuerzas, que dio origen a la nanoindentación y al estudio de las fuerzas de interacción intermoleculares así como también al estudio de los perfiles de plegamiento y desplegamiento de proteínas (10). En este trabajo se utilizaron las técnicas de nanoindentación (19), Espectroscopia de Fuerzas y Mapeo de Reconocimiento Molecular utilizando puntas modificadas químicamente (20). A continuación se describen brevemente los fundamentos de estas metodologías.

III.1.6. Imagen de *Force Volume* (*Force Volume Imaging*)

Una imagen de *Force Volume* (FV), combina la obtención de una imagen topográfica con la adquisición de curvas de fuerza. Una curva de fuerza típica registra información en el eje z;

en una imagen de FV, se combina esta información con los puntos x , y de recorrido a lo largo de la muestra. De esta manera se obtiene un arreglo $(x; y; z)$ de los valores de deflexión del *cantilever*, tal como se observa en la Figura 8.A. La imagen topográfica se construye considerando el valor de deflexión máximo del *cantilever*, que es mantenido constante y cuyo valor se elige de manera de realizar una fuerza adecuada para no dañar la muestra. Asociada a la imagen de topografía, el FV permite obtener imágenes de fuerza a valores de z constantes, son las denominadas imágenes de fuerza que brindan información cualitativa de la interacción entre la punta y la muestra (una imagen representativa de la imagen de fuerza se observa en la Figura 8.B)(1)

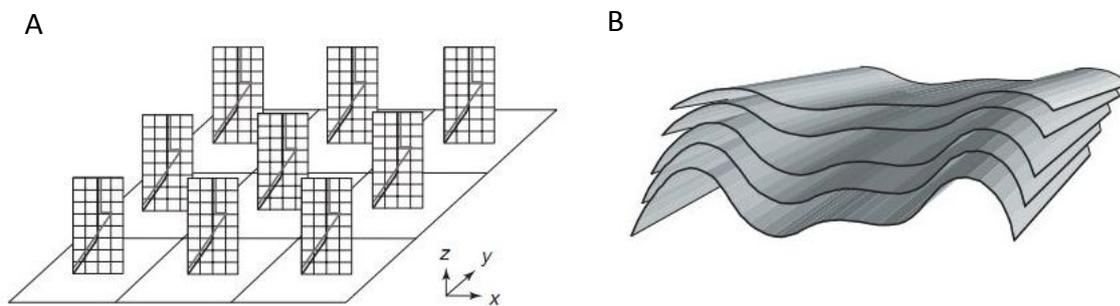


Figura 8.A Esquema representativo de una imagen de FV, en cada pixel definido en la superficie se realiza una curva de fuerzas. La Figura B representa la imagen de fuerza, cada valor de distancia en z se encuentra asociado a un valor de interacción punta-muestra. Las imágenes fueron tomadas de la revisión publicada por Hienz y Hoh (1).

Debido a la gran cantidad de información que se registra en este tipo de imágenes, el tiempo de adquisición es mucho mayor al de una imagen topográfica común y dependiendo de la velocidad a la que se realicen las curvas de fuerza será el tiempo necesario para que se adquieran. Es por esto que existe un número limitado de píxeles por imagen, que depende del microscopio con el que se trabaje. El microscopio *Nanoscope V* con el que se realizaron la mayoría de las medidas de esta Tesis, permite realizar imágenes de FV con arreglos que van desde 16×16 , 32×2 hasta 64×64 píxeles. Una vez adquirida la imagen, la misma puede ser visualizada con el *software* de análisis y allí se pueden observar, la imagen de topografía, las curvas de fuerza, que pueden ser seleccionadas manualmente en el punto x , y que uno desee y la imagen de fuerza, que uno puede modificar manualmente al elegir diferentes valores de z (ver Figura 9).

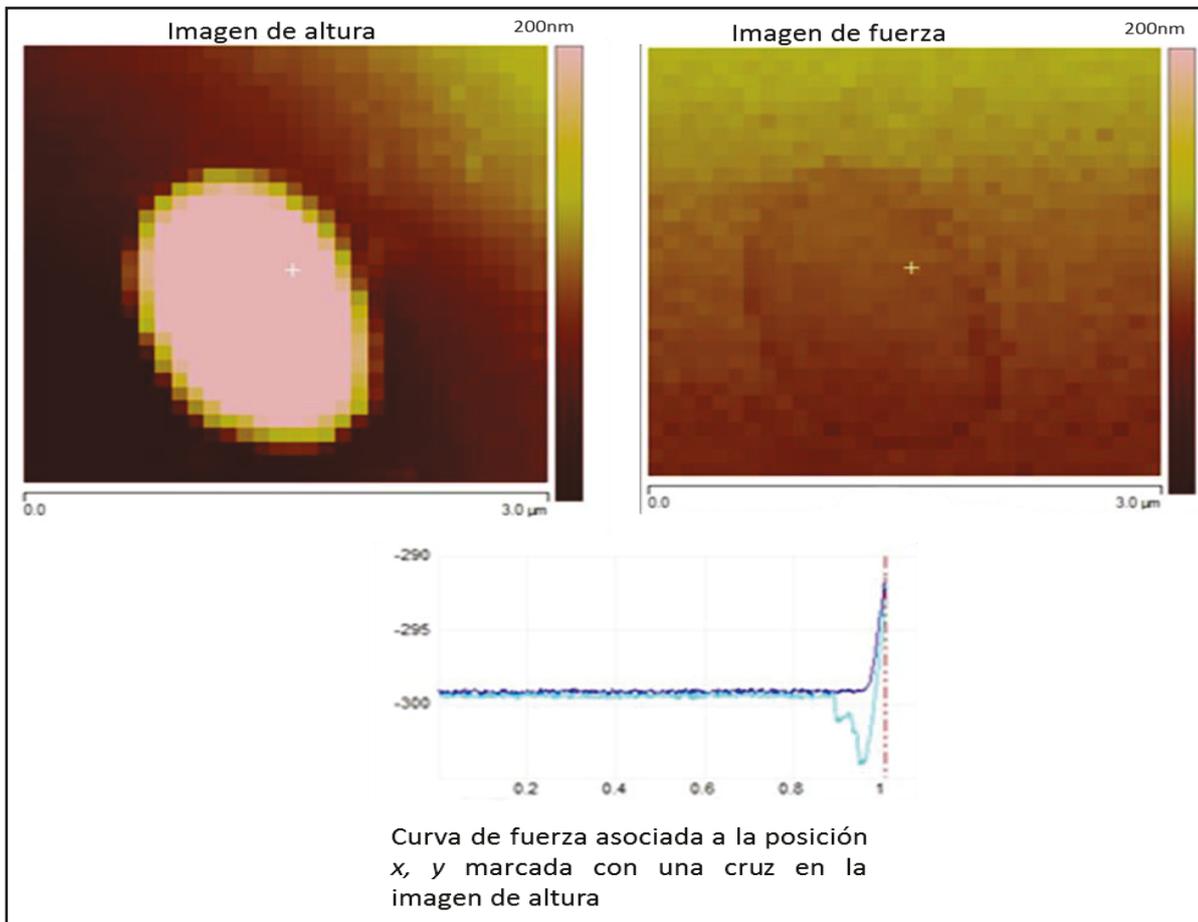


Figura 9. Imagen de FV representativa donde se observa la silueta de una bacteria en el canal de topografía. En el canal de fuerza se observa la misma silueta aunque la imagen corresponde a la interacción punta-muestra para el valor de z elegido en el canal de curva de fuerza, línea punteada (abajo a la izquierda).

III.1.7. Estudios de propiedades nanomecánicas mediante MFA

El segmento de aproximación de las curvas de fuerza, como se explicó anteriormente, registra la deflexión del cantiléver desde su posición de no contacto hasta un valor fijado en la zona de contacto. De esta manera, si la muestra es más blanda que la punta, la misma actuará como un indentador, penetrando en la superficie. La información de dicho segmento puede ser analizada para determinar las propiedades mecánicas de las muestras, tales como la rigidez en términos del módulo de Young o la constante del resorte (21, 22).

Durante el desarrollo de esta Tesis se estudiaron las propiedades mecánicas de células bacterianas de *B. pertussis*. Las mismas demostraron poseer un comportamiento elástico dentro de los parámetros experimentales que se utilizaron para realizar las medidas. Por esta razón se explicarán a continuación los modelos matemáticos más aceptados para analizar el comportamiento a la compresión por parte de los materiales elásticos.

Los modelos típicos para el análisis de la respuesta mecánica de muestras elásticas son derivados de las teorías cuasi-estáticas para las cuales, en la deformación que ejerce un indentador de geometría esférica penetrando en una superficie rígida y plana, la constante elástica (K_M) del material viene dada por la siguiente ecuación (14):

$$K_M = 2A \frac{E}{1 - \nu^2} \quad (3)$$

Donde A es el área de contacto punta-muestra, E es el módulo de Young del material y ν es la relación de Poisson, que es característica de cada material y hace referencia a la resistencia a la deformación cuando se ejecuta una fuerza longitudinal. En un material idealmente rígido, el valor de ν es 0 y en el caso de materiales blandos, como los materiales biológicos el valor es de 0,5 (19). El área de contacto entre la punta y la muestra resulta, en la actualidad, imposible de determinar en tiempo real paralelamente a la realización de las medidas, es por esto que en los modelos de ajuste se propone una aproximación considerando el radio de curvatura de la punta o indentador.

Los modelos más utilizados para analizar la respuesta mecánica a partir de las curvas de aproximación consideran un régimen de mecánica elástica continua y son: el Modelo de Hertz y las modificaciones introducidas por Sneddon y el modelo de Johnson-Kendall-Roberts. A continuación se describen las características más importantes de dichos modelos:

- El modelo de Hertz, que es el más ampliamente utilizado, es aplicable a deformaciones pequeñas y considera una fuerza de interacción nula en la zona de contacto. Describe la deformación de una punta blanda de geometría esférica indentando en una superficie plana, dicha respuesta está regida por la siguiente ecuación (23):

$$\delta^2 = \frac{9(1 - \nu_{punta}^2)F^2}{16 E_{punta}^2 R} \quad (4)$$

Donde δ es la indentación, ν_{punta} es la relación de Poisson de la punta, y E_{punta} el módulo de Young de la punta. F es la fuerza aplicada y R el radio de curvatura de la punta.

En el caso de estudiar sistemas en los que el indentador sea rígido y la muestra blanda como es el caso de las células, el modelo de Hertz resulta inadecuado. Por esta razón, Sneddon introdujo modificaciones considerando una geometría esférica para el indentador

penetrando en una superficie blanda (14). De esta manera, $E_{muestra} \ll E_{punta}$ y ambos valores pueden ser relacionados con la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{E_{punta}} = \frac{1 - \mu^2_{muestra}}{E_{muestra}} \quad (5)$$

Las modificaciones de Sneddon además incluyeron modificaciones respecto de la geometría de la punta, considerando una geometría cónica o parabólica. Los modelos matemáticos que describen las modificaciones del modelo de Sneddon son (24):

Para el caso de indentadores de geometría cónica la ecuación es la siguiente

$$F = \frac{2E \tan \alpha}{\pi(1 - \nu^2)} \delta^2 \quad (6)$$

Donde E es el módulo de Young de la muestra, F es la fuerza, α es el ángulo medio de apertura del cono, δ es la indentación y ν la relación de Poisson de la muestra.

Y para el caso de indentadores de geometría parabólica la ecuación es la siguiente:

$$F = \frac{4\sqrt{R}}{3} E \delta^{3/2} \quad (7)$$

Donde E es el módulo de Young de la muestra, F es la fuerza, δ es la indentación y R es el radio de curvatura de la punta.

- El modelo de Johnson-Kendall-Roberts (JKR) describe la deformación de una esfera sobre una superficie plana, tal como es descrito originalmente por Hertz, aunque considera la presencia de fuerzas de interacción de corto alcance en el área de contacto entre el indentador y la muestra. Luego de introducida esta teoría varios trabajos demostraron que resulta muy adecuada para interpretar el comportamiento elástico cuando existen fuerzas atractivas de tipo Lennard-Jones pero falla en el caso de que se utilice un indentador de radio de curvatura muy pequeño. Matemáticamente el modelo se rige por la siguiente ecuación (14):

$$F = \frac{3EA}{2\pi R} \sqrt{1 - \delta^2} - \sqrt{F_{ad}} \frac{1}{\sqrt{1 - \delta^2}} \quad (8)$$

Donde F es la fuerza, E es el Módulo de Young, F_{ad} es la fuerza de adhesión entre la punta y la muestra, δ es la indentación, R el radio de la esfera y A es el área de contacto.

En este trabajo de Tesis se utilizó la aproximación de Hertz, considerando las modificaciones de Sneddon para analizar el comportamiento de la envoltura celular bacteriana ya que en las curvas obtenidas no se observaron aportes de fuerzas de interacción de corto alcance. No obstante, cuando el indentador penetró la capa externa de la célula (membrana externa y espacio intermembrana), el comportamiento observado en la curva de fuerzas de aproximación fue de tipo lineal. Esta respuesta a valores de indentación mayores, refleja las propiedades mecánicas de la membrana interna. Las respuestas lineales a la compresión pueden ser analizadas modelizando la punta y la muestra como dos resortes independientes, uno que se mueve en dirección a la muestra y otro que se encuentra fijo en la superficie. De esta manera, como se ejemplifica en la Figura 10, los resortes hacen contacto en el punto z_0 donde ninguno se encuentra comprimido. A medida que prosigue la aproximación punta-muestra, se mueve una distancia z negativa y ambos resortes comienzan a comprimirse. Las distancias de compresión del *cantilever*, d y de la muestra i , se miden desde el la base del resorte descomprimido hasta la base del resorte comprimido, tal como se observa en línea punteada en la Figura 10. A la magnitud de dicha medida la llamaremos $-z$. Considerando la ley de Hooke para resortes, la fuerza de compresión en cualquier posición del piezoeléctrico se describe como (25):

$$F(Z) = K_c d = K_M i \quad (9)$$

Donde K_c es la constante de resorte del *cantilever* y K_M de la muestra. Para dos resortes lineales en contacto, la compresión viene dada por:

$$Z = d + i \quad (10)$$

Si consideramos que la pendiente (s) de la curva deflexión vs z es la relación entre d e i , entonces la ecuación 10 puede ser reformulada como:

$$K_M = K_c \frac{s}{1+s} \quad (11)$$

De esta manera, la constante de resorte de la muestra puede ser calculada directamente de la curva Deflexión del *cantilever* vs. Z y se pueden estudiar propiedades de las células tales como la presión de turgencia.

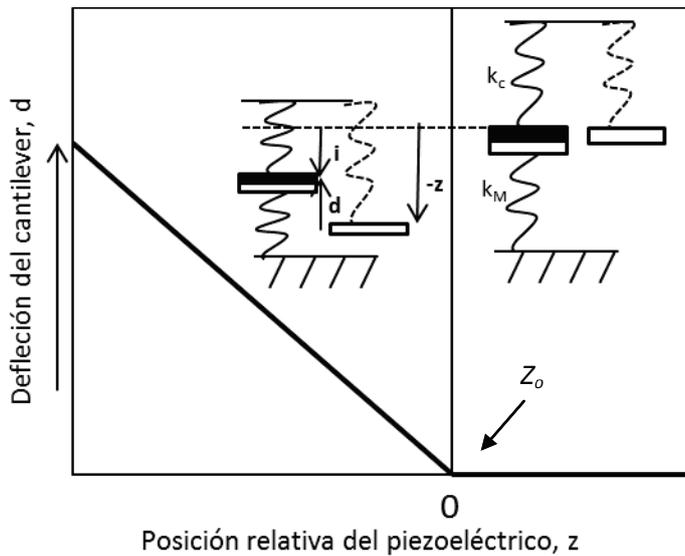


Fig. 10. Curva de deflexión vs posición del piezoeléctrico donde se observa un comportamiento lineal en la curva de aproximación. Tanto el indentador como la muestra se pueden considerar resortes que se comprimen mutuamente al ingresar en la zona de contacto. El punto z_0 representa el punto de contacto inicial.

III.1.8. Espectroscopia de Fuerzas

Como se expuso anteriormente, el *cantilever* del MFA puede ser considerado un sensor de fuerzas que, siguiendo la ley de Hooke (ecuación 2) puede ser utilizado para cuantificar la magnitud de la fuerza de interacción que existe entre la punta y la muestra.

Si se realizara un experimento donde se modificara químicamente el sensor, con un grupo químico deseado se podría, entonces, cuantificar la fuerza de interacción existente entre dicha funcionalidad química y otra que se encontrara en la superficie de la muestra. En este sentido, los primeros experimentos se realizaron utilizando modificaciones químicas de las puntas de MFA con grupos funcionales sencillos (NH_2 , COOH , CH_3) que se utilizaron para cuantificar las fuerzas de interacción que se ponen de manifiesto al interactuar con muestras modificadas con las esas mismas funcionalidades y así poder comprobar las interacciones existente entre los diferentes grupos (16). Este tipo de experimentos se denomina Microscopía de Fuerzas Químicas (en inglés, *Chemical Force Microscopy*). Poco tiempo después de la realización de estos experimentos, las técnicas de funcionalización de puntas de MFA se sofisticaron, permitiendo la modificación de las puntas con macromoléculas, tales como proteínas, polisacáridos, oligonucleótidos, etc. De esta manera se comenzaron a llevar a cabo los denominados ensayos de Espectroscopia de Fuerzas de Moléculas Únicas (en inglés, *Single Molecule Force Spectroscopy SMFS*). En la Figura 11 se pueden observar los mecanismos de funcionalización más utilizados para adherir moléculas de interés a las

puntas de los *cantilevers*. Los primeros ensayos de SMSF que se realizaron involucraron la cuantificación de la interacción del par molecular Biotina-Estreptavidina, ya que debido a su conocida interacción y sus múltiples aplicaciones en la biología molecular, resultaba un modelo de referencia muy interesante. Desde ese momento hasta nuestros días, numerosos pares ligando-receptor han sido evaluados a través de esta técnica, desde pares antígeno-anticuerpo hasta receptores neuronales-neurotransmisores (26, 27). Un paso muy interesante constituyó la utilización del MFA para el mapeo de moléculas en la superficie de células vivas, lo que se denominó ensayo de Mapeo de Reconocimiento Molecular (28, 29). Esta técnica abrió un enorme campo de investigación, especialmente en lo referido a la señalización y dinámica molecular en la superficie de las células. Constituye una herramienta muy importante en el estudio de los procesos celulares y de patogenia en el caso de microorganismos.

Por último, más recientemente y aún en desarrollo, se encuentra la técnica de Espectroscopia de Fuerzas de Células Únicas (en inglés, *Single Cell Spectroscopy*) que a través de la modificación del *cantilever*, esta vez no con moléculas, sino con células (ya sea eucariotas, fúngicas, bacterianas, etc), permite estudiar los procesos de interacción entre diferentes células e identificar el rol de diferentes moléculas en dicha interacción (29-31).

En el presente trabajo de Tesis se utilizó la técnica de Espectroscopia de Fuerza de Moléculas Únicas y la técnica de Mapeo de Reconocimiento Molecular para identificar la presencia de una proteína específica en la superficie de una bacteria de la especie *B. pertussis*.

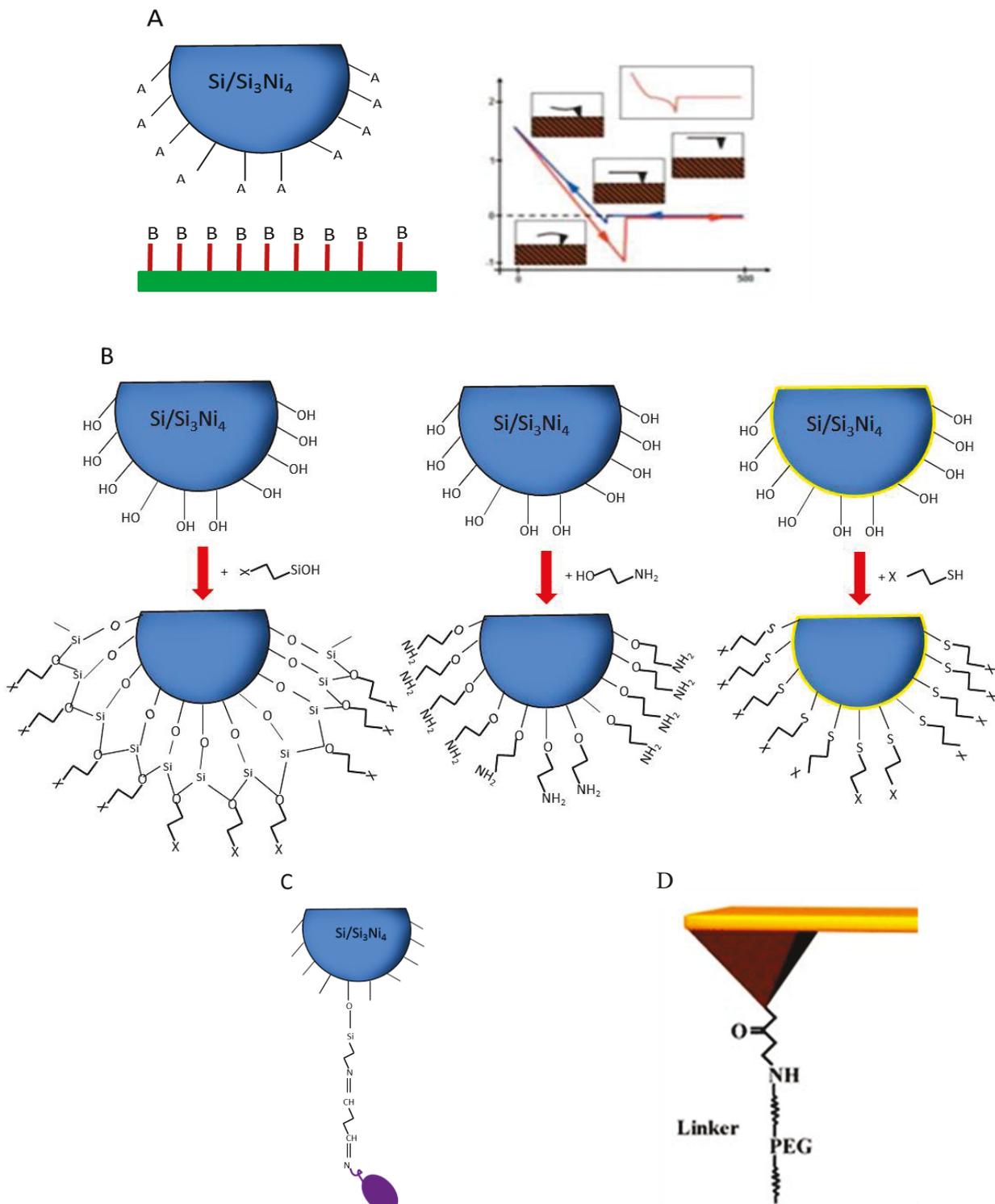


Figura 11- Esquema de un ensayo de Espectroscopia de Fuerzas en el que las moléculas presentes en la punta se hacen interaccionar a través de la realización de curvas de fuerza con las moléculas presentes en la superficie (A). Los métodos de funcionalización incluyen la funcionalización de puntas de Si o Si_3Ni_4 con silanos a los cuales es posible adherir nuevas moléculas. Otra posibilidad es la funcionalización de las mismas puntas a través de la esterificación con etanolaminas o la funcionalización de puntas recubiertas con una capa de oro utilizando diferentes tipos de tioles. En la figura C se observa la funcionalización de las puntas de MFA con proteínas a través de la utilización de glutaraldehído. La Fig. D representa un método muy utilizado, desarrollado para evitar las interacciones no específicas, a través de la funcionalización con un linker de polietilenglicol con diferentes funcionalidades en las extremidades que permite a las moléculas adheridas a él moverse con mayor libertad en la interacción.

III.2 BIBLIOGRAFÍA

1. Heinz, W. F., and Hoh, J. H. (1999) Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope, *Trends Biotechnol* 17, 143-150.
2. Quate, C. F., and Gerber, C. Atomic Force Microscope.
3. Cohen-Bouhacina T., M. A. (2008) AFM Imaging in Physiological Environment: From Biomolecules to Living Cells: Thermodynamic and Kinetic Considerations in Interfacial Self-Assembly, *Soft Matter Characterization: SpringerReference*
4. Arturo M. Baro , R. G. R., (Ed.) (2012) *Atomic Force Microscopy in Liquid: Biological Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
5. Alsteens, D., Dague, E., Verbelen, C., Andre, G., Dupres, V., and Dufrêne, Y. F. (2009) Nanoscale imaging of microbial pathogens using atomic force microscopy, *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 1, 168-180.
6. Arfsten, J., Leupold, S., Bradtmoller, C., Kampen, I., and Kwade, A. (2010) Atomic force microscopy studies on the nanomechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*, *Colloids Surf B Biointerfaces* 79, 284-290.
7. Gaboriaud, F., and Dufrene, Y. F. (2007) Atomic force microscopy of microbial cells: application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces, *Colloids Surf B Biointerfaces* 54, 10-19.
8. Hoh, J. H., and Schoenenberger, C. A. (1994) Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy, *J. Cell Sci.* 107, 1105-1114.
9. Parra, A., Casero, E., Lorenzo, E., Pariente, F., and Vazquez, L. (2007) Nanomechanical properties of globular proteins: lactate oxidase, *Langmuir* 23, 2747-2754.
10. Bornschlogl, T., and Rief, M. (2011) Single-molecule protein unfolding and refolding using atomic force microscopy, *Methods Mol Biol* 783, 233-250.
11. Bujalowski, P. J., and Oberhauser, A. F. (2013) Tracking unfolding and refolding reactions of single proteins using atomic force microscopy methods, *Methods* 60, 151-160.
12. Celik, E., and Moy, V. T. (2012) Nonspecific interactions in AFM force spectroscopy measurements, *J Mol Recognit* 25, 53-56.
13. lamichhane, d. K. a. s. K. (2011) A Brief Overview of AFM Force Distance Spectroscopy, *The Himalayan Ohysics II.*
14. B. Cappella, G. D. (1999) Force Distance Curves by Atomic Force Microscopy, *Surf. Sci. Rep.* 34, 1-104.
15. Bonnell, D. A., (Ed.) (1993) *Scanning tunneling microscopy and spectroscopy: Theory and applications*, Vol. XIV, VCH Publishers, New York.
16. C. Daniel Frisbie, L. F. R., Aleksandr Noy, Mark S. Wrighton, Charles M. Lieber. (1994) Functional Group Imaging by Chemical Force Microscopy, *Science, New Series* 265, 2071-2074.
17. Mitra, S. K., Hanson, D. A., and Schlaepfer, D. D. (2005) Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 56-68.
18. Budich, C., West, J., Lampen, P., and Deckert, V. Force microscopy analysis using chemometric tools.
19. Ebenstein, D. M., and Pruitt, L. A. (2006) Nanoindentation of biological materials, *Nano Today* 1, 26-33.
20. Fuhrmann, A., and Ros, R. (2010) Single-molecule force spectroscopy: a method for quantitative analysis of ligand-receptor interactions, *Nanomedicine (Lond)* 5, 657-666.
21. S. Kasas, G. L. a. G. D. (2013) mechanical properties of biological specimens explored by atomic force microscopy, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 46.
22. Roduit, C., Sekatski, S., Dietler, G., Catsicas, S., Lafont, F., and Kasas, S. (2009) Stiffness tomography by atomic force microscopy, *Biophys J* 97, 674-677.
23. M. Heuberger, G. D. a. L. S. (1995) Mapping the local Young's modulus by analysis of the elastic deformations occurring in atomic force microscopy *Nanotechnology* 6, 6-12.

24. Touhami, A., Nysten, B., and Dufrêne, Y. F. (2003) Nanoscale Mapping of the Elasticity of Microbial Cells by Atomic Force Microscopy, *Langmuir* 19, 4539-4543.
25. Velegol, S. B., and Logan, B. E. (2002) Contributions of Bacterial Surface Polymers, Electrostatics, and Cell Elasticity to the Shape of AFM Force Curves, *Langmuir* 18, 5256-5262.
26. Yersin, A., Hirling, H., Steiner, P., Magnin, S., Regazzi, R., Huni, B., Huguenot, P., De los Rios, P., Dietler, G., Catsicas, S., and Kasas, S. (2003) Interactions between synaptic vesicle fusion proteins explored by atomic force microscopy, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8736-8741.
27. Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K., and Evans, E. (1999) Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy, *Nature* 397, 50-53.
28. Dupres, V., Alsteens, D., Andre, G., and Dufrene, Y. F. (2010) Microbial nanoscopy: a closer look at microbial cell surfaces, *Trends Microbiol* 18, 397-405.
29. Lower, B. H., Yongsunthon, R., Shi, L., Wildling, L., Gruber, H. J., Wigginton, N. S., Reardon, C. L., Pinchuk, G. E., Droubay, T. C., Boily, J. F., and Lower, S. K. (2009) Antibody recognition force microscopy shows that outer membrane cytochromes OmcA and MtrC are expressed on the exterior surface of *Shewanella oneidensis* MR-1, *Appl Environ Microbiol* 75, 2931-2935.
30. Taubenberger, A. V., Hutmacher, D. W., and Muller, D. J. (2014) Single-cell force spectroscopy, an emerging tool to quantify cell adhesion to biomaterials, *Tissue Eng Part B Rev* 20, 40-55.
31. Beaussart, A., El-Kirat-Chatel, S., Herman, P., Alsteens, D., Mahillon, J., Hols, P., and Dufrene, Y. F. (2013) Single-cell force spectroscopy of probiotic bacteria, *Biophys J* 104, 1886-1892.

Capítulo IV

Estudio de las propiedades nanomecánicas de cubierta
de la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I
asociados a la presencia de la proteína FHA

Índice

IV.1 INTRODUCCIÓN	120
IV.2 MATERIALES Y METODOS	123
IV.2.1 Microorganismos y condiciones de cultivo.....	123
III.2.2 Preparación de las muestras para Microscopía de Fuerza Atómica	123
IV.2.3 Imágenes de MFA y medidas de Force Volume	124
IV.2.4 Análisis de las curvas de fuerza. Cálculo de Módulo de Young (E) y de la constante de resorte de las bacterias (K_b)	125
IV.2.5 Mapas de módulo de Young y K_b	127
IV.2.6 Análisis estadístico	127
IV.3 RESULTADOS	128
IV.3.1 Imágenes obtenidas con MFA de células salvajes y mutantes de Bordetella pertussis.	128
IV.3.2 Análisis de las curvas Fuerza vs. Distancia	130
IV.3.3 Cálculo de módulo de Young y K_b	131
IV.3.4 Análisis del comportamiento elástico de células individuales. Mapas de elasticidad.....	134
IV.4 DISCUSIÓN.....	140
IV.5 CONCLUSIONES	142
IV.6 BIBLIOGRAFIA.....	143

IV.1 INTRODUCCIÓN

Con el objeto de avanzar sobre los objetivos planteados en el Capítulo III se decidió estudiar la expresión de la proteína Hemaglutinina Filamentosa (FHA) mediante el empleo del MFA. La hipótesis original fue que la presencia de esta adhesina, a nivel de cubierta celular, modifica localmente las propiedades nanomecánicas de células individuales. A tales fines utilizando el MFA se buscó correlacionar la rigidez de la envoltura celular bacteriana con la posible localización de la adhesina FHA.

La Microscopia de Fuerza Atómica ha sido ampliamente utilizada en las últimas décadas para la caracterización nanomecánica de materiales biológicos (1-5). La posibilidad de realizar experimentos en un ambiente líquido permite aproximar las condiciones de medida al entorno fisiológico de las muestras ya que las mantiene en un ambiente similar al que encuentran en sus condiciones de vida natural (6, 7). Muchos grupos alrededor del mundo han utilizado esta metodología para estudiar la respuesta mecánica de bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos, virus, así como también de células animales (8-11). Se ha estudiado el efecto que produce la utilización de bactericidas o la influencia del pH en las propiedades mecánicas de células únicas como una medida de la integridad de la envoltura celular (3). Algunos trabajos recientes han dedicado esfuerzos al estudio comparativo de las propiedades mecánicas de cepas bacterianas que difieren en su virulencia y también se ha estudiado para *Escherichia coli* el efecto de la presencia de diferentes estructuras expuestas en la membrana, en relación a la respuesta mecánica de la bacteria (12-14).

Para el estudio de las propiedades mecánicas con el MFA se utiliza la punta del *cantilever* como un indentador y se analiza la respuesta del objeto indentado a través de la evaluación de las curvas de fuerza en su segmento de aproximación, que comprende el desplazamiento de la punta cuando se mueve desde el punto de no contacto hacia la muestra, hasta el momento en el cual se invierte el sentido del barrido en z. Una vez obtenidas las curvas, los datos se pueden ajustar con modelos que interpretan el fenómeno de indentación. En este trabajo las curvas de fuerza fueron analizadas utilizando el modelo de Hertz, que interpreta matemáticamente la respuesta de un objeto a la compresión de un indentador de geometría definida. Para poder aplicarlo, se deben cumplir las siguientes condiciones (15, 16);

- El indentador debe ser infinitamente duro en comparación a la muestra;
- El área de contacto debe ser constante y pequeña en comparación al tamaño de ambos objetos;

- La deformación debe ocurrir dentro de los límites de elasticidad del material.

Las curvas obtenidas con el MFA son curvas de Deflexión del *cantilever* vs Desplazamiento en Z, donde Z es la posición del piezoeléctrico el cual es solidario, en nuestros experimentos, al sistema de sostén de la muestra. Para poder obtener información a partir de esas curvas es necesario transformarlas en curvas de Fuerza vs Desplazamiento en Z, para lo cual se debe correlacionar la deflexión del *cantilever* con la fuerza aplicada, utilizando la ley de Hooke (ecuación 2 sección III)

$$F=-k x \quad (1)$$

Donde x es la deflexión, F es la fuerza y k es la constante de resorte o constante elástica del *cantilever*. Este dato representa una medida de la fuerza necesaria para deformar el material, y es imprescindible conocer su magnitud con exactitud para poder determinar la fuerza aplicada. Si bien los fabricantes de puntas de MFA indican una k estimada para sus productos, muchas veces no coincide con el valor real y es por esto que existen distintos procedimientos que permiten su determinación (17). Uno de los métodos más utilizados es el *thermal noise*, incorporado dentro de las herramientas técnicas y de *software* de muchos microscopios, permite un cálculo rápido de la constante de elasticidad que se puede realizar antes de comenzar con los experimentos. Brevemente, el método se basa en registrar la oscilación del *cantilever* en función del ruido térmico, a partir del cual se construye un gráfico de densidad espectral de potencias (en inglés, *Power Spectral Density*), que permite determinar la frecuencia de resonancia del *cantilever* a la temperatura de trabajo mediante el ajuste con una función matemática Lorentziana (18). Una vez conocida la constante de resorte real se pueden adquirir los datos de fuerza con la precisión necesaria.

En este capítulo se presentan resultados obtenidos a partir de la utilización de la metodología descrita anteriormente aplicada al estudio de las propiedades nanomecánicas de tres cepas diferentes de *Bordetella pertussis*: la cepa salvaje *B. pertussis* Tohama I , la cepa BPGR4, mutante para la expresión de la adhesina FHA y la cepa Bp537, una cepa mutante en fase avirulenta que carece no sólo de la expresión de la proteína FHA, sino también de otros factores de virulencia expresados en superficie y regulados por el sistema BvgAS. El objetivo general de esta etapa del trabajo fue establecer una metodología no destructiva que permita determinar cualitativamente el nivel de expresión de una proteína específica en la superficie bacteriana.

Los objetivos específicos de este capítulo fueron:

- Poner a punto una técnica de inmovilización de bacterias para su observación por Microscopía de Fuerza Atómica.
- Estudiar las propiedades nanomecánicas de células bacterianas individuales.
- Estudiar comparativamente el comportamiento mecánico de diferentes cepas de *Bordetella pertussis* que varían en su patrón de expresión de proteínas.
- Correlacionar espacialmente las propiedades nanomecánicas con la expresión de la proteína FHA.

IV.2 MATERIALES Y METODOS

VI.2.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

En esta etapa del trabajo se emplearon la cepa salvaje *B. pertussis* Tohama I, la cepa BPGR4, una cepa derivada de la *salvaje* BPSM (capítulo II), una cepa mutante para la expresión de la proteína FHA ($\Delta fhaB$, (19)) y la cepa Bp537, una cepa mutante bloqueada en fase avirulenta (Bvg^- , (20)). Todas ellas fueron cultivadas y mantenidas en placas de agar Bordet-Gengou (Difco *Laboratories*, Detroit, MI) suplementadas con 15% v v⁻¹ de sangre de carnero defibrinada (ABGs). Para los cultivos planctónicos, las bacterias fueron crecidas a 37°C en el medio SS. Las cepas mutantes se cultivaron en condiciones de restricción recomendadas para lo cual los medios de cultivo fueron suplementados con Estreptomicina, 50 µg/ mL en el caso de la cepa $\Delta fhaB$ y Kanamicina 40 µg/ mL en el caso de la cepa Bp537 (Sigma St. Louis, MO, USA). Los cultivos planctónicos fueron llevados a cabo a partir de colonias crecidas en placas ABGs y se realizaron en frascos Erlenmeyer de 100 mL de volumen total conteniendo 30 mL de medio de cultivo SS, bajo agitación (160 rpm) durante 24 h. Luego de ese tiempo, las células fueron cosechadas por centrifugación a 8000xg durante 10 min., lavadas con PBS estéril dos veces (8000xg 10 min.) y suspendidas en el mismo *buffer* a una DO final₆₅₀=1.

IV.2.2 Preparación de las muestras para Microscopía de Fuerza Atómica

Luego de lavadas, las células fueron adheridas electrostáticamente a vidrios porta objetos de 1cmx1cm previamente incubados con una solución acuosa de Polietilenimina (PEI, Sigma Aldrich) 0,1% p/v (13, 21). Brevemente, se cortaron los vidrios portaobjetos en dimensiones de 1cmx1cm aproximadamente, se lavaron con una solución acuosa de etanol 96%v/v y luego con agua Milli-Q. Posteriormente se colocaron en un agitador orbital a baja velocidad mientras se adicionaban gotas de solución de PEI 0,1%. Los vidrios se agitaron durante 5 min en estas condiciones y luego se dejaron secar a 37° C durante 15 min. Una vez secos, se incubaron con 50 µL de suspensión bacteriana durante 2,5 h para finalmente ser enjuagados enérgicamente con agua Milli-Q. Para ser transportadas, las muestras se colocaron en una caja de Petri junto con un algodón mojado para generar una cámara húmeda y evitar su deshidratación.

IV.2.3 Imágenes de MFA y de *Force Volume*

Las curvas de fuerza utilizadas para la caracterización de las propiedades nanomecánicas de las células fueron obtenidas utilizando la herramienta *Force Volume Imaging* (FV) de un microscopio *Multimode* acoplado a una unidad de control *Nanoscope V* (Bruker, Santa Barbara, CA). Como se indicó en el capítulo III, el uso de la herramienta FV permite obtener una gran cantidad de curvas de fuerza en el área seleccionada.

Cada vidrio conteniendo las células adheridas fue fijado a un portamuestras utilizando una cinta adhesiva de doble faz e inmediatamente transferido a la celda de líquidos del microscopio. Las medidas fueron realizadas en presencia de *buffer* PBS; para ello, 200 μ L de la solución de *buffer* fueron ingresados a la celda a través de una jeringa de 1mL, el exceso de *buffer* circuló hacia el exterior de la cámara mediante una manguera de silicona ubicada en el orificio de salida. De esta manera las células se mantuvieron en solución durante todo el tiempo que duraron los experimentos.

Todas las medidas fueron realizadas utilizando puntas de Nitruro de Silicio (NP-10, Veeco) con radio nominal entre 20 y 60nm (datos del fabricante). En el comienzo de cada experimento se calibró la sensibilidad de la detección realizando una curva de fuerzas sobre una superficie limpia de mica (SPI V-1). Se requiere de una superficie rígida tal como la mica para que no ocurran fenómenos de indentación y de este modo, la deflexión del *cantilever* se corresponda con la distancia de movimiento del piezoeléctrico. La calibración es necesaria para determinar la relación entre la medida original registrada por el fotodetector en Voltios y la medida de distancia de movimiento en Z del piezoeléctrico. Una vez determinada la sensibilidad del detector, se utilizó el método de *Thermal Tune* para determinar la constante de resorte del *cantilever* que en todos los casos estuvo entre 0,12 y 0,35 N/m. Para comprobar el comportamiento elástico de las muestras (bacterias), se determinó el módulo de Young a diferentes velocidades de barrido, para ello se realizaron varias curvas de fuerza sobre una misma célula variando su velocidad de barrido en Z entre 0,1 y 2 Hz.

Habiendo comprobado que las muestras no se deformaban de manera irreversible en las condiciones experimentales ensayadas, se adquirieron las imágenes para estudiar las propiedades nanomecánicas, las mismas se realizaron en modo contacto manteniendo una fuerza mínima aplicada para evitar dañar las muestras. Una vez obtenida una imagen adecuada de una bacteria se realizó una imagen de FV con arreglo de 32x32 pixeles a una velocidad de barrido en Z de 1Hz para obtener las curvas de aproximación.

IV.2.4 Análisis de las curvas de fuerza. Cálculo de Módulo de Young (E) y de la constante de resorte de las bacterias (K_b)

Las curvas Fuerza vs Desplazamiento en Z se exportaron en formato txt para poder ser analizadas utilizando un software desarrollado en el laboratorio por el Dr. Federico Castez. El punto de contacto de las curvas de aproximación fue determinado manualmente localizando el punto a partir del cual la curva comienza a levantarse de la línea de no contacto (ver Figura 1, punto (d_0, z_0)). Todas las curvas presentaron un comportamiento no lineal a bajas fuerzas, que se relacionó con el comportamiento mecánico de la envoltura celular y un comportamiento lineal, a altas fuerzas, asociado a la presión de turgencia del citoplasma bacteriano. Estos dos segmentos de las curvas fueron ajustados con modelos adecuados para calcular el módulo de Young y la constante de resorte de la bacteria (15, 16, 22).

Para aplicar los modelos de ajuste, las curvas de Fuerza vs Desplazamiento en Z fueron convertidas en curvas de Fuerza vs. Indentación. Este último parámetro fue calculado midiendo la diferencia del desplazamiento en Z a fuerza constante entre una curva realizada sobre una bacteria y una curva realizada sobre una superficie rígida (Figura 1). Calculando punto a punto este valor se obtuvieron los datos de indentación para construir las curvas Fuerza vs Indentación. Las mismas fueron, luego, ajustadas en su zona no lineal empleando el modelo de Hertz (3, 23) que permitió determinar el módulo de Young. De acuerdo a la geometría del indentador existen distintas relaciones entre la fuerza aplicada y la indentación (16). En nuestro caso el mejor ajuste fue obtenido con el modelo que considera una geometría cónica para la punta y que sigue la ecuación:

$$F = \frac{2E \tan \alpha}{\pi(1-\nu^2)} \delta^2 \quad (2)$$

Donde F es la fuerza aplicada, α es el ángulo de apertura del cono de la punta (53° , calculado a partir de mediciones realizadas sobre imágenes SEM de los *cantilevers* utilizados), ν es la relación de *Poisson*, que para materiales biológicos es 0,5 (24) y δ es la indentación. Esta ecuación ya fue discutida para los modelos de Hertz en el capítulo III.

La porción lineal de la curva que se observa a valores de fuerza mayores fue ajustada siguiendo la ley de Hooke para dos resortes en serie (ver capítulo III) y a partir de ella se calculó la constante de resorte de la bacteria (K_b) considerando la constante del *cantilever* (K_c) utilizado y siguiendo la ecuación (discutida previamente en el Capítulo III) (23):

$$K_b = K_c \frac{s}{1-s} \quad (3)$$

Donde s es la pendiente de la región lineal del gráfico F vs δ , K_c es la constante de resorte del cantiléver y K_b la constante de resorte de la bacteria, que es directamente proporcional con la presión de turgencia del citoplasma bacteriano (25).

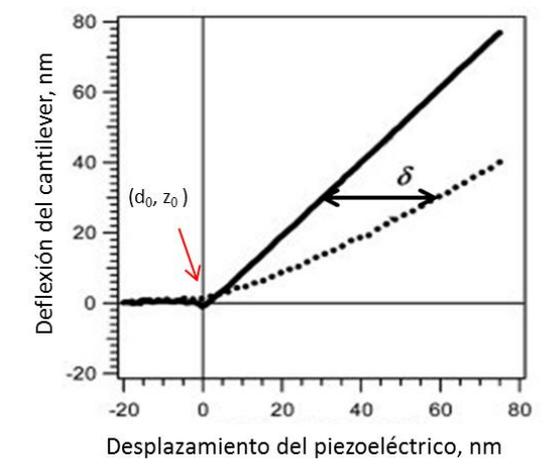


Figura 1. Curva de deflexión vs desplazamiento en Z del piezoeléctrico donde (d_0, z_0) corresponde al punto de contacto. Calculando la diferencia en Z a una deflexión constante entre una superficie rígida (línea continua) y una blanda (línea punteada) se puede determinar el valor de indentación (δ).
Imagen Modificada de Ahmed Touhami y col., Langmuir 2003, 19, 4539-4543)

Los experimentos se organizaron de la siguiente manera: en una primera etapa se analizaron 60 células por cepa, para cada una de cuales se adquirió una curva de fuerza, obteniéndose la estadística del comportamiento mecánico de una cantidad significativa de individuos de cada población. Luego se realizó un análisis en el que se estudiaron células únicas. Sobre cada una de ellas se adquirieron entre 100 y 200 curvas que se analizaron para calcular el módulo de Young y la constante de resorte. Para cada cepa se estudiaron 6 células individuales provenientes de tres cultivos independientes (2 células por cultivo). De esta manera se analizó la respuesta mecánica dentro de una célula individual intentando relacionarla con el comportamiento colectivo de las 60 células estudiadas anteriormente. Los resultados del análisis de E de bacterias individuales se representaron en histogramas donde la cantidad de eventos fue normalizada por el valor máximo de eventos en cada caso ya que no todas las células estudiadas poseen la misma cantidad de curvas analizadas.

IV.2.5 Mapas de módulo de Young y K_b

Cada valor de E fue correlacionado con la posición espacial de la curva de fuerza a partir de la cual fue calculado (coordenada x , y en la imagen de FV) y se construyeron de esta manera mapas de elasticidad para células individuales donde se graficaron en escala de cyan a azul los valores comprendidos entre 0,15 y 0,5 MPa y en escala de magenta a rojo los valores comprendidos entre 0,5 y 1,0 MPa. Además se construyeron mapas de K_b correlacionadas con las posiciones x , y de regiones rígidas y blandas de una célula individual de manera de establecer la existencia o no de correlaciones entre E y K_b .

IV.2.6 Análisis estadístico

Para determinar diferencias entre los valores promedio de E y K_b para cada cepa se realizó un test de ANOVA de una vía. El mismo test fue realizado para establecer diferencias en la longitud de las células estudiadas. Se consideraron diferencias significativas cuando el valor p fue $\leq 0,05$. El test de Turkey fue aplicado *post-hoc* para establecer diferencias de a pares considerando $p \leq 0,05$.

IV.3 RESULTADOS

IV.3.1 Imágenes obtenidas con MFA de células salvajes y mutantes de *Bordetella pertussis*.

Una de las mayores ventajas que nos ofrece el MFA es la posibilidad de obtener imágenes en medio líquido, posibilitando así mantener a las células vivas durante el experimento (6, 7). Para determinar si nuestro método de inmovilización para bacterias fue exitoso se realizaron varias imágenes de las muestras adheridas electrostáticamente al vidrio funcionalizado con PEI. En ellas no se detectó arrastre del material y fue posible conservar la morfología de las células en barridos consecutivos de una misma zona así como también se observó que las bacterias no cambiaban de posición o de tamaño. En la Fig. 2(A-C), se pueden observar imágenes representativas de los preparados donde se ve que las células se distribuyen de dos maneras, formando agregados en la superficie o distribuyéndose como células individuales. Una observación más detallada nos permitió concluir que las células presentaron una forma coco-bacilar, esperable para bacterias del género *Bordetella* (26). Se determinó el valor medio de longitud de las células utilizando la herramienta *cross section* del *software Nanoscope7.3*. En la figura 3 se observa una imagen representativa del análisis realizado; la herramienta permite hacer un corte transversal de la imagen determinando la sección a analizar mediante una línea cuya orientación y longitud se establecen manualmente. De esta manera se analizaron 50 bacterias diferentes para cada cepa y se obtuvieron valores de longitud que no difirieron significativamente uno del otro, siendo el promedio de $0,9 \pm 0,2 \mu\text{m}$, consistente con los datos de bibliografía para esta especie (27). Luego del experimento se levantaron las células de los vidrios con un hisopo y se utilizaron para inocular asépticamente varias placas de agar Bordet-Gengou suplementadas con sangre de carnero. Se incubaron 24 h a 37°C. Luego de este tiempo fue posible detectar desarrollo de *B. pertussis* en las placas, demostrando que las bacterias se mantienen vivas durante el tiempo del experimento.

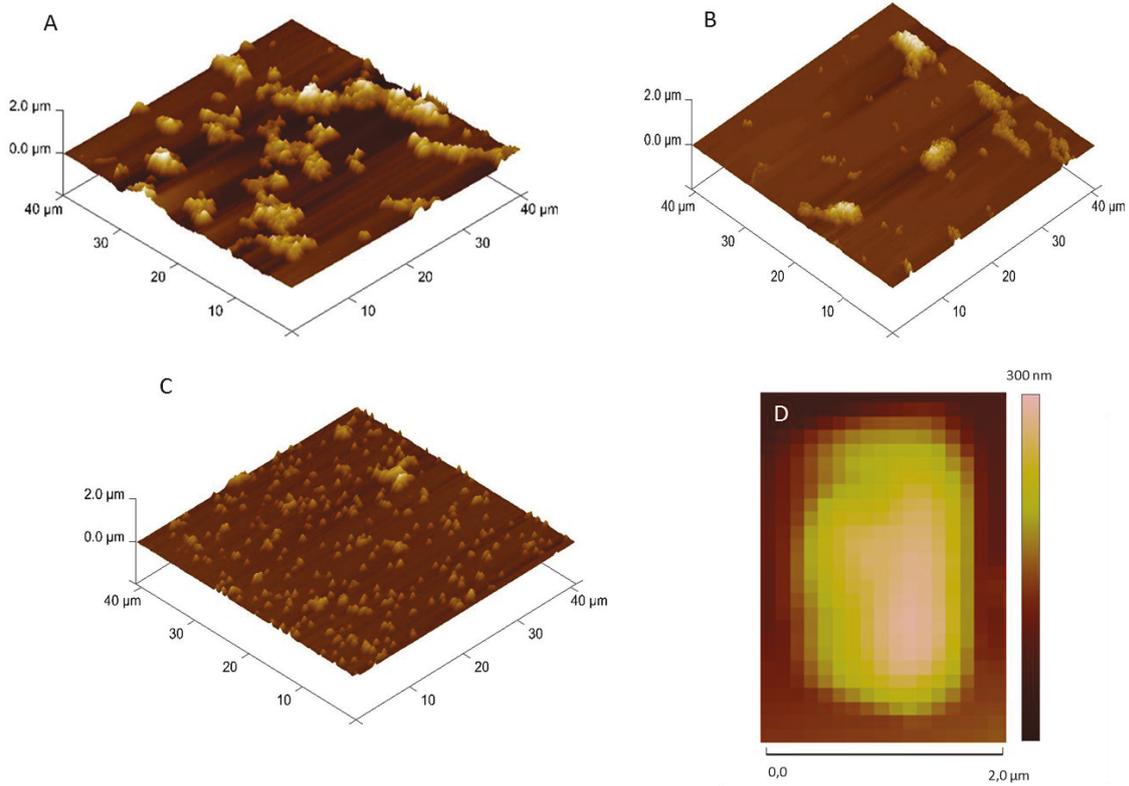


Figura 2. Imágenes de células adheridas a vidrios recubiertos con solución PEI 0.1%. A) *Bp* Tohama I, B) $\Delta fhaB$ C) *Bp537* y D) Imágenes de altura de *Force volume* realizado sobre una célula de *B. pertussis*.

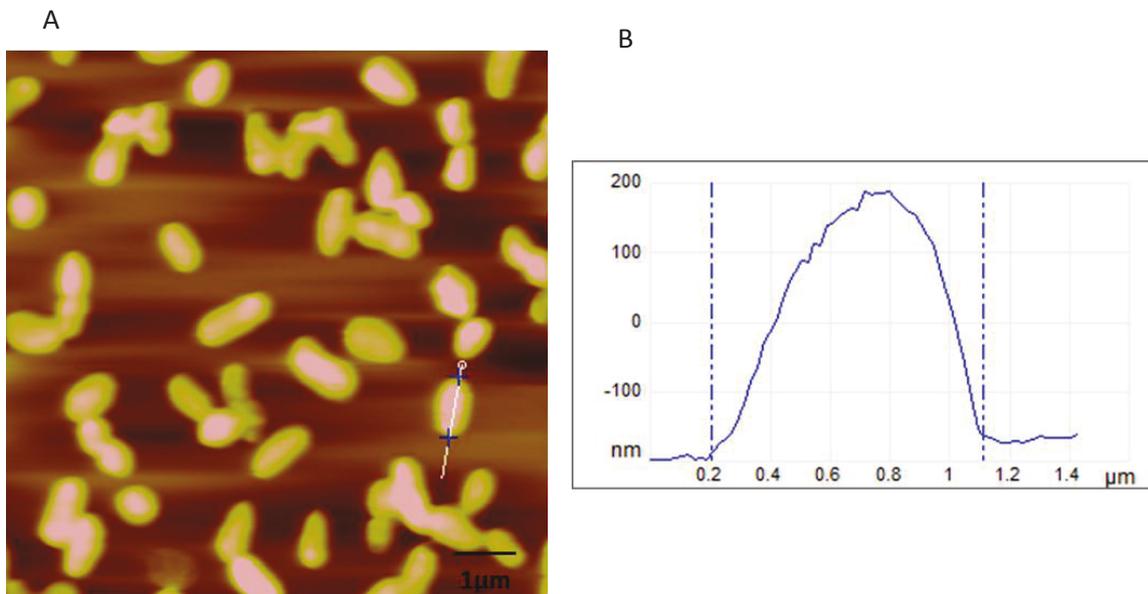


Figura 3. A Imagen de altura donde se observan células de *B. pertussis* adheridas al vidrio. Sobre una de ellas se traza una línea blanca de manera manual para analizar su perfil de alturas en la imagen de *cross section* (B). En dicha imagen se puede determinar los extremos de la célula y calcular su longitud. En el caso de la bacteria seleccionada, la longitud entre los extremos es de 0,9 μm.

Luego de la puesta a punto del proceso de inmovilización, se procedió a la realización de las curvas de fuerza sobre la superficie bacteriana. Para ello se utilizó la herramienta de *Force Volume Imaging* (FV). Como ya se mencionó anteriormente, esta herramienta permite generar una imagen topográfica simultáneamente con el registro de las curvas de fuerza en cada uno de los 16x16, 32x32 o 64x64 pixeles de la región estudiada. En nuestro caso, las imágenes de FV que se realizaron no superaron los 32x32 pixeles para lograr compatibilizar la resolución espacial requerida con el tiempo de medida. De esta manera se consiguió una relación óptima de los parámetros de modo que la interacción punta muestra no fuera excesiva en tiempo para evitar inducir cambios artificiales en el sistema. Una imagen de FV típica de una bacteria de *Bordetella pertussis* se observa en la Fig.2 (D).

IV.3.2 Análisis de las curvas Fuerza vs. Distancia

El análisis de las curvas de fuerza realizadas sobre la superficie de las células de *B. pertussis* a través de la utilización de la herramienta de FV nos permitió conocer el comportamiento mecánico de las bacterias con una resolución entre 80 y 100 nanómetros. En una etapa inicial y previamente a la realización de los ajustes matemáticos se analizaron cualitativamente las curvas Fuerza vs Desplazamiento en Z. En la Figura 4 se puede observar un gráfico representativo de las curvas de fuerza obtenidas para los diferentes substratos; mica, células de *B. pertussis* Tohama I, células de Bp537 y de $\Delta fhaB$. En todos los casos se puede observar que las curvas exhiben dos comportamientos diferentes a medida que el indentador penetra en su superficie. Un comportamiento no lineal dentro de los primeros 100nm y un comportamiento lineal en el resto de la curva. Estos dos sectores pueden ser correlacionados con diferentes estructuras de la bacteria. La medida del ancho del segmento no lineal (correlacionado con el ancho de la envoltura celular) puede ser calculado a través de la diferencia entre el punto de contacto ($d_0; z_0$) y la extrapolación del ajuste lineal (3) como se esquematiza en la figura 4-(b). Este cálculo fue realizado para las tres cepas y se obtuvo un promedio de 55 ± 23 nm para la cepa *B. pertussis* Tohama I; 120 ± 19 nm para la cepa $\Delta fhaB$ y 137 ± 29 nm para la cepa Bp537. Esta diferencia en el espesor del segmento que fue marcadamente mayor en el caso de las cepas mutantes, puede estar relacionada a la menor densidad de proteínas en la superficie de estas células, ya que estas estructuras, más rígidas (28-30) impiden la penetración de la punta al indentar en la superficie.

Este análisis semi-cuantitativo de las curvas de fuerza nos indicó que existen diferencias en la respuesta a la compresión por parte de las distintas cepas. Posteriormente se analizó cuantitativamente la información de las curvas para obtener los valores del módulo de Young para cada cepa y obtener el perfil de elasticidad en dominios nanométricos de las bacterias.

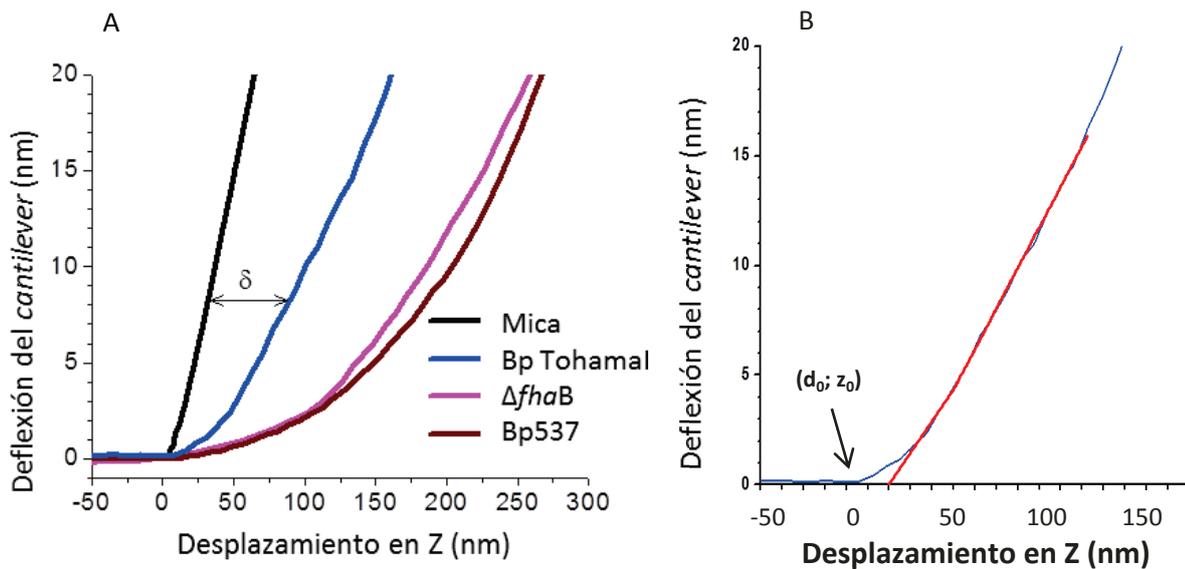


Figura 4. (A) Curvas de deflexión de *cantilever* vs. Desplazamiento en Z realizadas sobre una superficie rígida (mica) (línea negra), sobre una célula de *B. pertussis* Tohamal (línea azul), sobre una célula $\Delta fhaB$ (línea magenta) y sobre una célula Bp537 (línea marrón). La indentación de la punta puede ser calculada a partir de la diferencia de desplazamiento del piezoeléctrico (Z) entre la superficie rígida y la superficie blanda (bacteria) a fuerza constante. En la Fig. B se observa cómo se determina el ancho de la envoltura celular calculando la distancia entre el punto de extrapolación del ajuste lineal y el punto de contacto $(d_0; z_0)$.

IV.3.3 Cálculo de módulo de Young y K_b

Las curvas Fuerza vs Indentación fueron graficadas para cada cepa y se realizaron los ajustes matemáticos descritos anteriormente que permitieron determinar el módulo de Young y K_b utilizando las ecuaciones 2 y 3. Para calcular el módulo de elasticidad, E (según la ecuación 2), es necesario conocer el ángulo de apertura medio del cono, geometría con la cual se modelizó el indentador (punta) utilizado. Para ello realizamos imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) con el objetivo de determinar las dimensiones de la punta. En la figura 5 se muestran imágenes SEM representativas, donde se puede observar que los lados de la base de la pirámide miden $5\mu\text{m}$ y la generatriz mide $5,5\mu\text{m}$. Con estos valores se

calculó la altura del cono aplicando el teorema de Pitágoras y con esos datos se determinó el ángulo de apertura medio (α) utilizando la siguiente ecuación, que resultó ser 53° :

$$\alpha = 2 \times \arctan (r/h)$$

donde h es la altura, g la generatriz y r el radio medio de la base .

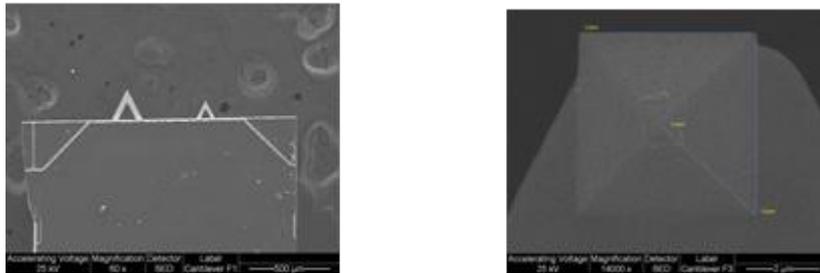


Figura 5. Imágenes SEM de un cantiláver y puntas NP-10, utilizadas para obtener los resultados presentados en este capítulo.

En una primera etapa se calcularon los valores de K_b y E a partir de las curvas de fuerzas provenientes de 60 células diferentes para cada cepa realizando los ajustes lineales y no lineales, como se observa en la figura 6. Los valores de K_b promedio para las tres cepas estudiadas (*B. pertussis* Tohama I, $\Delta fhaB$ y Bp 537) no mostraron diferencias significativas (ANOVA, $p \leq 0,05$), y variaron entre 0,044 y 0,058 N/m. Estos valores se encuentran en acuerdo con valores publicados para otras bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* (0,044 N/m) (23) y *Shewanella putrefaciens* (0,058N/ m) (3). La similitud en los valores de constante de resorte entre las cepas no llama la atención si se considera que representa la respuesta a la compresión de la membrana interna y que es una medida proporcional a la presión de turgencia de la célula. Al encontrarse las bacterias de las diferentes cepas sometidas a las mismas condiciones de presión osmótica, resulta esperable que este valor no cambie.

Respecto de los valores de E, *B. pertussis* Tohama I mostró diferencias significativas respecto de las dos cepas mutantes cuyos valores promedio no difirieron entre sí (ANOVA, Turkey; $p \leq 0,05$). Los resultados que se muestran en la figura 6 indican que el valor promedio de E para la cepa salvaje fue de $0,44 \pm 0,23$ MPa; el de la cepa $\Delta fhaB$ fue de $0,18 \pm 0,09$ MPa y el valor medio para la cepa Bp537 fue de $0,11 \pm 0,06$ MPa. Llama la atención la gran desviación estándar en el caso de la cepa *B. pertussis* Tohama I; que podría estar reflejando o bien la

heterogeneidad de valores de elasticidad entre células o la heterogeneidad de los valores dentro de cada célula individual. Para dilucidar cuál de las dos opciones es la responsable de la gran amplitud en valores de elasticidad en la cepa *B. pertussis* Tohama I, se realizaron estudios de elasticidad de células individuales. Para ello se obtuvieron imágenes de FV de 32x32 píxeles en una zona que contuviera una célula individual, de esta manera fueron analizadas seis células diferentes para cada cepa.

Cabe destacar que los valores de E en cualquiera de las cepas no variaron significativamente al cambiar la velocidad de barrido en Z durante la realización de las curvas de fuerza, razón por la cual se considera que las medidas fueron realizadas dentro de los límites de elasticidad de las células.

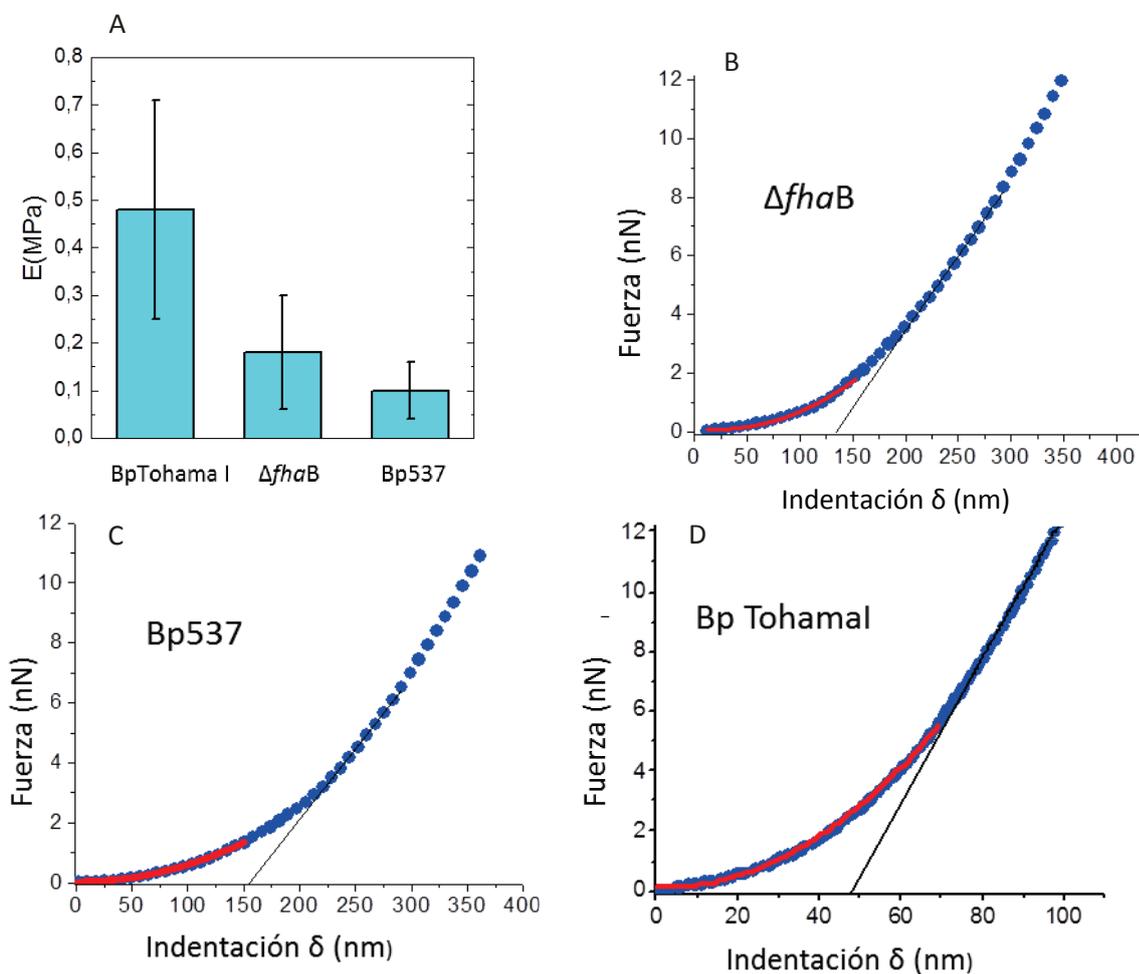


Figura 6. A Valores de módulo de Young promedio para cada cepa obtenidos a partir del análisis de 60 células individuales para cada caso. Curvas de Fuerza vs. Indentación obtenidas para las cepas $\Delta fhaB$ (B), Bp537 (C) y Bp Tohamal (D). Las curvas rojas corresponden al ajuste realizado siguiendo el modelo de Hertz a partir del cual se calcula el módulo de Young (E) y las líneas negras corresponden al ajuste lineal a partir del cual se calcula la constante de resorte de la célula (K_b). La extrapolación del ajuste lineal hacia el eje x indica el espesor de la envoltura bacteriana.

VI.3.4 Análisis del comportamiento elástico de células individuales. Mapas de elasticidad.

En la Figura 7 se muestran los histogramas de los módulos de Young (E) representativos del análisis de células individuales. Se puede observar que en el caso de las células correspondientes a la cepa Bp537 (A) y la cepa $\Delta fhaB$ (B), los histogramas muestran una distribución monomodal alrededor de un valor más probable de aproximadamente 0,11 y 0,22 MPa respectivamente. Las distribuciones pudieron ser ajustadas adecuadamente con una función de distribución LogNormal, la cual es ampliamente utilizada para el ajuste de datos biológicos (31) y que resulta adecuada en este caso ya que no incluye valores negativos carentes de sentido físico. Los valores promedio de E obtenidos a partir del análisis de las células individuales se corresponden con los que se obtuvieron del análisis de curvas individuales realizadas sobre 60 células diferentes (Fig. 6.A), lo cual es consistente con el pequeño valor de desviación estándar obtenido en el análisis previamente descrito (ver Figura 6) que reflejaba la homogeneidad en el comportamiento elástico de la envoltura celular de las cepas mutantes. En el caso de bacterias individuales correspondientes a la cepa *B. pertussis* Tohama I, los resultados no fueron tan homogéneos. En la figura 7 (C, D, E) se observan tres histogramas diferentes correspondientes todos ellos a distintas células de esta cepa. El histograma mostrado en la Figura 7.C es representativo del análisis de tres células. En él se pueden diferenciar dos distribuciones, una con un valor más probable alrededor de 0,22MPa y otra distribución con un valor más probable de 0,66MPa. Ambas distribuciones pudieron ser ajustadas con la función LogNormal, aunque en el caso de los valores más bajos de E el ajuste mostró un valor apartado del valor más probable, lo cual se puede atribuir a la poca cantidad de eventos presentes en esa zona del histograma. Los otros dos histogramas (7-D y 7-E) son representativos cada uno de una célula individual y, si bien en ellos no fue posible diferenciar dos poblaciones, las distribuciones son más anchas (llegan hasta valores de 1MPa) que aquellas correspondientes a las cepas mutantes (con valores máximos en 0,5MPa). Las poblaciones pudieron ser correctamente ajustadas con la función LogNormal. Estos resultados muestran claramente que existe una diferencia en la elasticidad de las envolturas entre la cepa salvaje y las cepas mutantes. (Continúa en Pag.129)

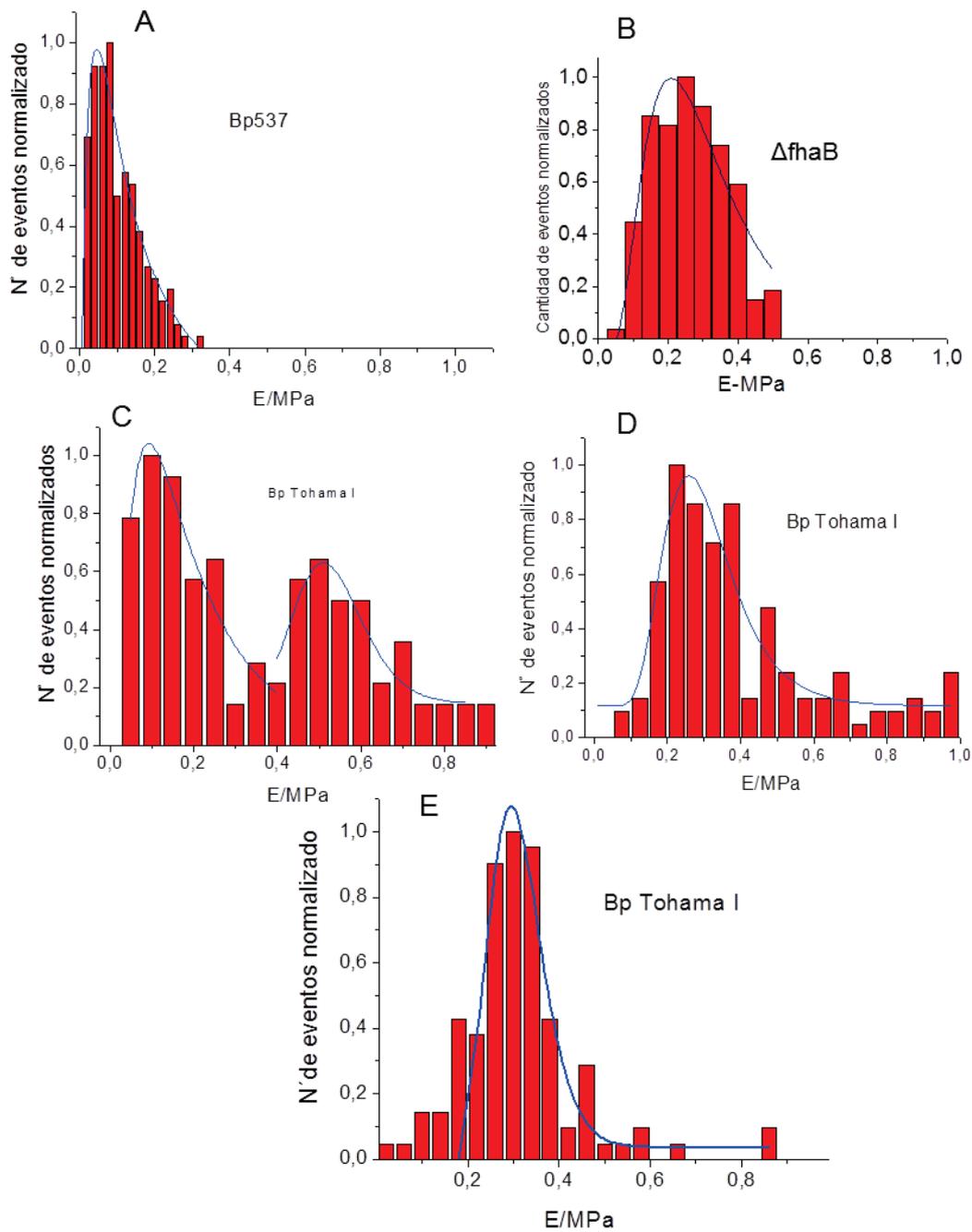


Figura 7. Histogramas de células únicas representativas para las seis células analizadas para la cepa Bp537 (A), para la cepa $\Delta fhaB$ (B) y tres histogramas representativas de las seis células analizadas para *B. pertussis* Tohama I (C, D, E). En cada caso, se observan los histogramas ajustados con una distribución LogNormal. Se puede observar como la mayor variabilidad en las distribuciones se encuentra en las células de la cepa *B. pertussis* Tohama I.

Considerando los resultados obtenidos, encontramos dos cuestiones llamativas en el análisis estadístico de las distribuciones del módulo de Young en la cepa salvaje:

- Valores entre 0,2 y 0,3 MPa observados en las tres cepas y consistentes con valores ya publicados para otras bacterias Gram-negativas estudiadas con la misma técnica (3, 22),
- Valores altos de módulo de Young (0,6-0,7MPa) únicamente observados en la cepa *B. pertussis* Tohama I.

Para entender cuál es la causa de la presencia de estos altos valores de E en la cepa *B. pertussis* Tohama I es importante considerar las diferencias que existen entre las tres cepas estudiadas. La cepa salvaje expresa en superficie varios factores de virulencia, como son las proteínas FHA, Vag8, Fim, PRN, etc. (32-34). Ninguna de ellas se encuentra expresada en la mutante de fase avirulenta Bp537 y en la cepa mutante $\Delta fhaB$ solamente existe un bloqueo en la expresión de la proteína FHA. Debido a que no se observaron diferencias significativas en los valores de E entre las cepas mutantes y que la proteína FHA es la única proteína que se encuentra ausente en la superficie de ambas cepas en comparación a la cepa salvaje, pensamos que es la responsable del aumento de rigidez observado en ésta última. De esta manera, los valores más rígidos observados en el histograma de las células de *B. pertussis* Tohama I fueron asociados a regiones de la envoltura donde se encontraría expresada la proteína FHA. Para determinar su localización y organización espacial decidimos graficar los valores de elasticidad en un mapa bidimensional de las bacterias estudiadas. Para conseguirlo, utilizamos la propiedad de la imagen de FV de correlacionar cada una de las curvas de fuerza adquiridas con una coordenada x, y . De este modo, para cada valor de E calculado a partir de una curva Fuerza vs Indentación se determinó una coordenada espacial y así se construyeron los mapas que se observan en la Figura 8. Allí podemos observar la imagen de FV, los histogramas de E asociados y sus correspondientes mapas de elasticidad para dos bacterias pertenecientes a la cepa salvaje. De la observación de los mapas se puede concluir que los valores de E no se encuentran homogéneamente distribuidos ya que existen dos zonas que se pueden definir claramente, una que abarca los valores entre 0,15 y 0,5 MPa (azules) y otra zona que abarca los valores entre 0,5 y 1 MPa (rojos). Esta distribución no fue observada en el caso de las células pertenecientes a las cepas mutantes como se puede ver en la Figura 9.

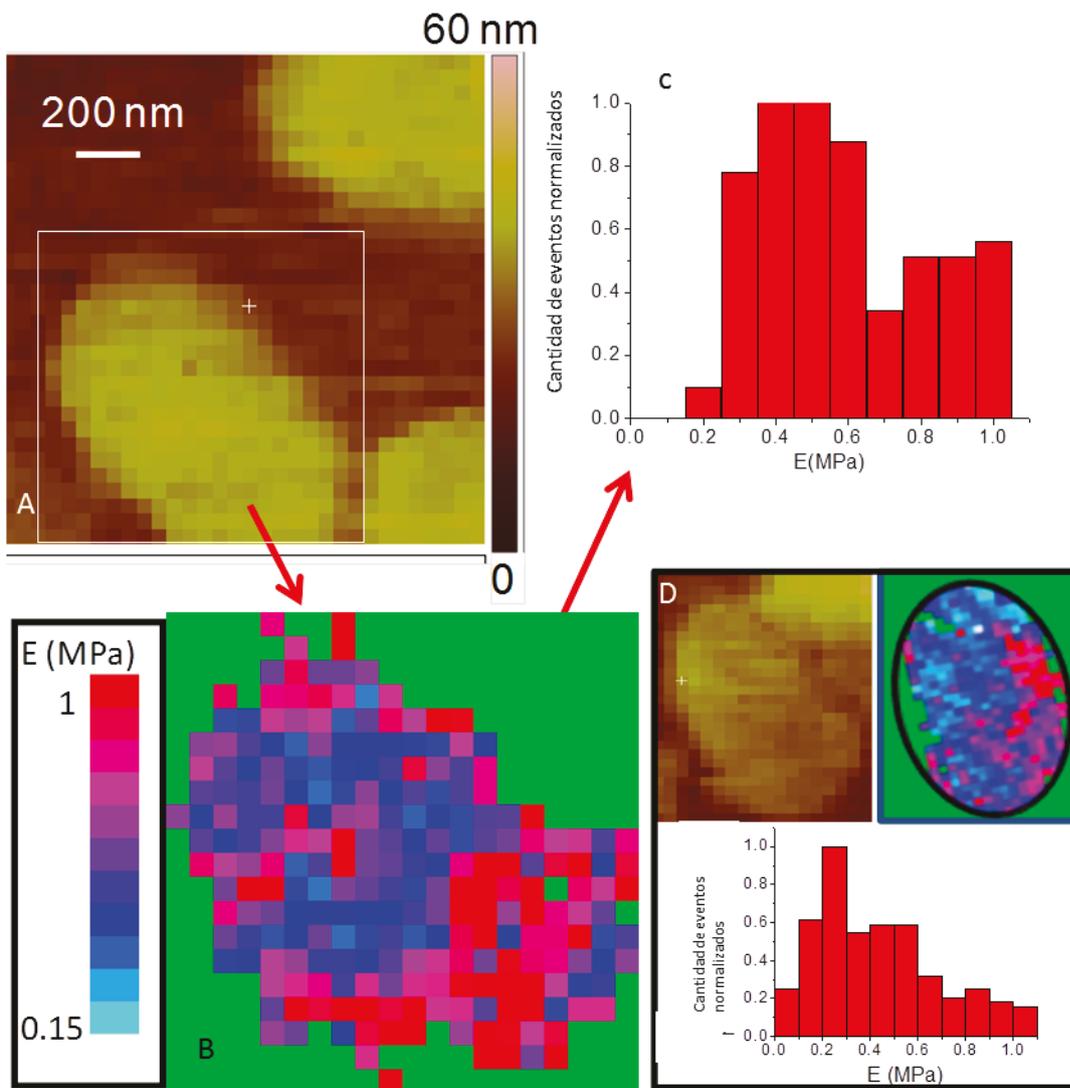


Figura 8. Imagen de FV realizada sobre células de *Bp Tohamal* (A), el mapa de elasticidad correspondiente a la bacteria recuadrada (B) donde se puede observar como los dominios rígidos no se encuentran homogéneamente distribuidos. En la figura 8 (C) se observa el histograma de módulos de Young asociado a la célula analizada. En la figura (D) se observa el mismo análisis para una célula diferente de *Bp Tohamal*.

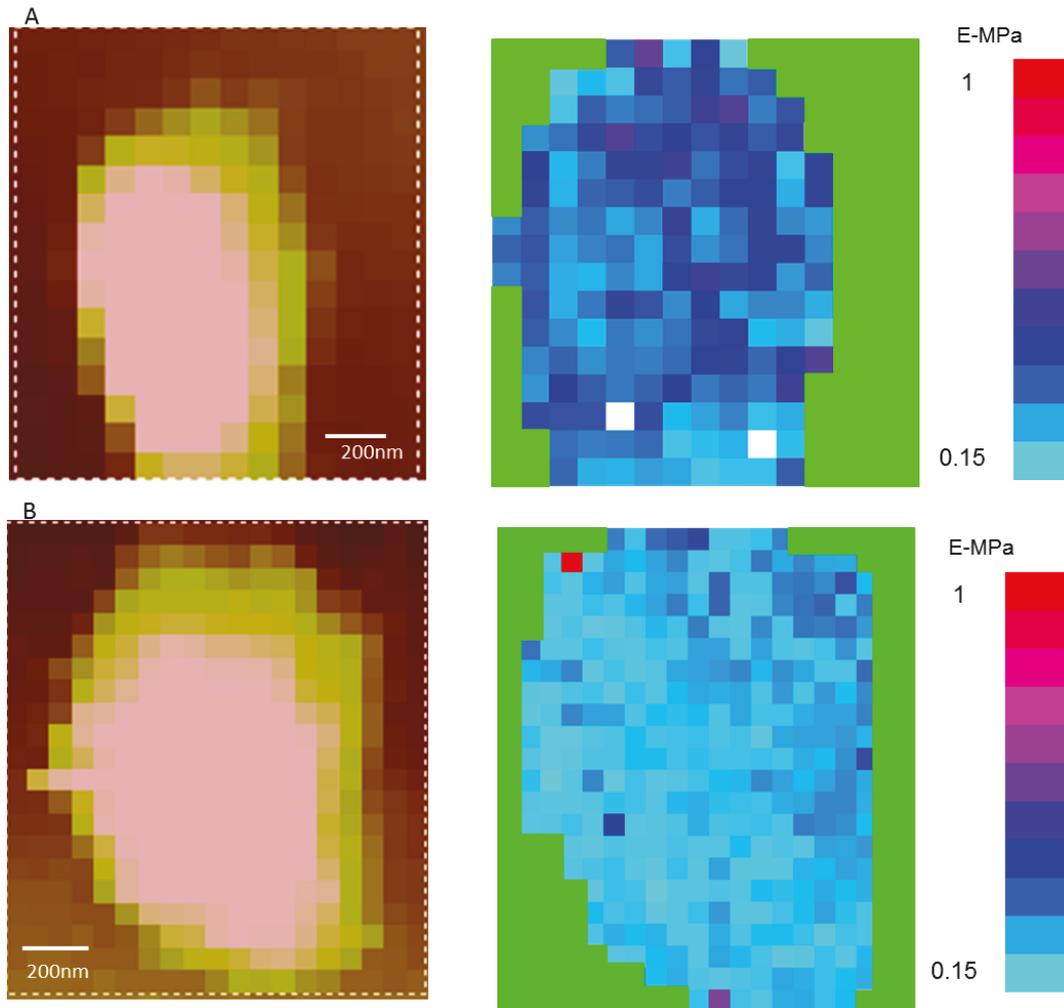


Figura 9. Imágenes de FV y mapas de elasticidad representativos de las células correspondientes a las cepas $\Delta fhaB$ (A) y Bp537 (B). En ambas cepas se observan únicamente valores menores a 0,5 MPa.

Para corroborar que los dominios rígidos fueran una respuesta de la envoltura celular y no que estuvieran influenciados o enmascarados por la existencia de componentes rígidos en interior del citoplasma, elegimos dos regiones del mapa de elasticidad que difirieran en sus propiedades elásticas, uno correspondiente a una zona rígida y otro correspondiente a una zona blanda y graficamos para cada una de ellas los mapas de valores de K_b obtenidos utilizando la ecuación 3. Observamos que la constante de resorte de la célula (K_b) posee valores similares en ambos casos (Figura 10), por lo tanto los dominios rígidos observados en la superficie serían consecuencia únicamente de la presencia de algún componente propio de la envoltura, tal como lo es la proteína FHA.

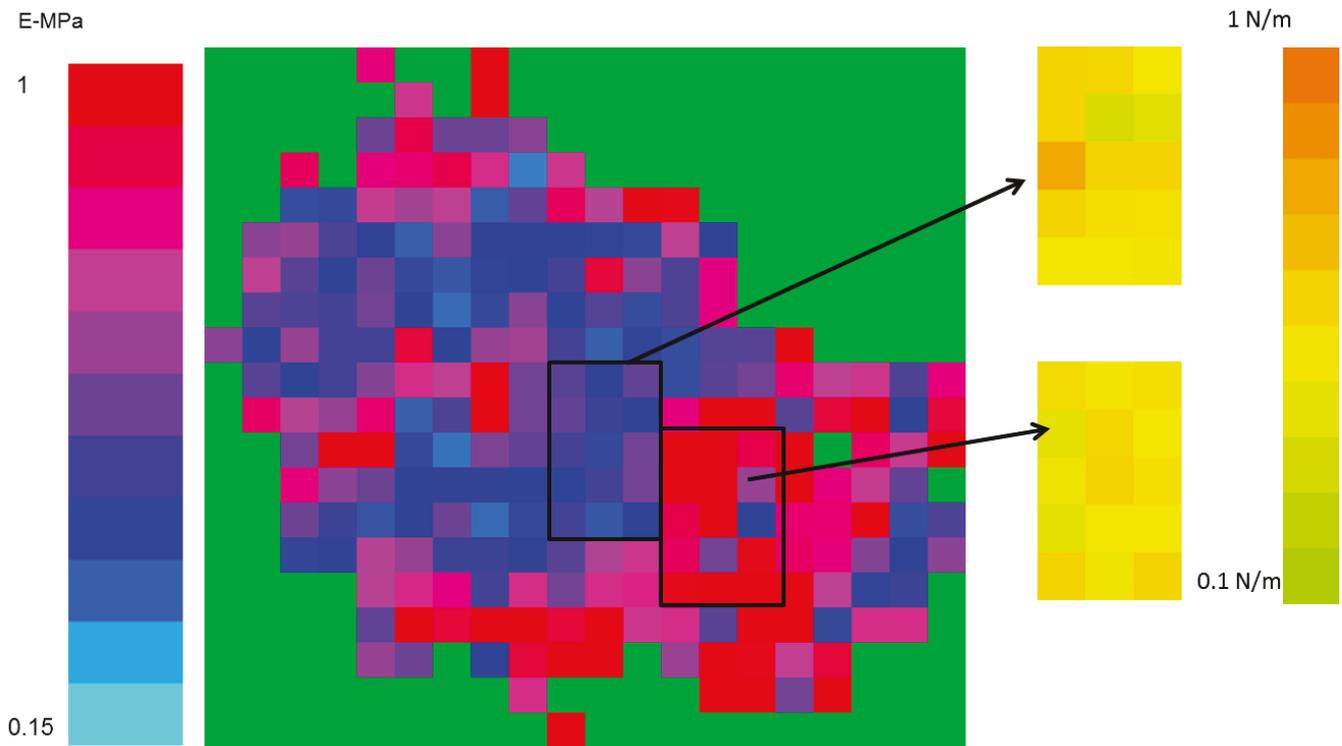


Figura 10. Mapa de elasticidad de una célula de Bp Tohamal y mapas de constante de resorte K_b asociados a regiones rígidas y blandas de la célula. Como puede observarse no varían los valores de K_b en las regiones seleccionadas.

IV.4 DISCUSIÓN

El uso del MFA para el estudio de microorganismos ha dejado de involucrar únicamente la obtención de imágenes topográficas de alta resolución desde hace ya varios años. Las enormes ventajas que brinda este equipo para el estudio de estructuras finas de la superficie microbiana, como pueden ser las adhesinas, pilis, flagelos, etc. han convertido al instrumento en una herramienta muy poderosa para el estudio de los mecanismos infectivos de importantes patógenos (11, 35-37). La capacidad de realizar experimentos en medio líquido constituye una gran ventaja sobre otras técnicas microscópicas ya existentes (6, 7).

Los resultados que se expusieron en este capítulo comprenden un estudio de la topografía y propiedades nanomecánicas de varias cepas de *Bordetella pertussis* en condiciones fisiológicas. La observación topográfica no mostró grandes diferencias con las imágenes obtenidas por otras microscopías respecto de la estructura de las células. La forma y el tamaño resultaron acordes con datos previamente publicados (27) y no fue posible identificar estructuras finas en la superficie de las bacterias. Este último dato resulta esperable en el caso de imágenes realizadas en modo contacto en medio líquido debido a la gran interacción de la punta y la muestra que dificulta la observación en alta resolución de los componentes de membrana. Los barridos consecutivos de la punta en contacto con la muestra pueden generar el movimiento de estructuras superficiales que no se encuentran fuertemente adheridas a la membrana de la célula o en caso de extenderse por fuera de la envoltura puedan adquirir distintas configuraciones inducidas por el barrido de la punta (38, 39).

Los resultados obtenidos respecto del módulo de elasticidad (E) y de la constante de resorte (K_b) se encontraron en el rango de valores publicados para otras bacterias Gram negativas (3, 4, 9, 40, 41) aunque se observaron diferencias entre las cepas mutantes y la cepa salvaje, mostrando esta última valores de módulo de Young mayores. Este mismo fenómeno fue también descrito por Abu-Lail (12) quien encontró que las cepas más virulentas de *Listeria monocytogenes* muestran valores de elasticidad mayores. En nuestro caso, las cepas Bp537 y $\Delta fhaB$ mostraron una alta homogeneidad dentro de las distribuciones de E, a diferencia de la cepa *B. pertussis* Tohama I, que exhibió una gran heterogeneidad en su perfil de elasticidad superficial. Los valores más altos de E fueron asociados a la expresión de la proteína FHA. En relación a esto, los resultados muestran que la mayor rigidez se encuentra localizada en

regiones discretas de la envoltura celular, lo cual indicaría que la proteína formaría nanodominios en la superficie en lugar de expresarse homogéneamente en la misma. La expresión localizada de proteínas ha sido descrita ya para bacterias Gram negativas. En el caso de algunos autotransportadores, inclusive para *Bordetella pertussis* (como es el caso de BrkA, (42)) se ha reportado una preferente localización polar. Recientemente se ha utilizado la Espectroscopia de Fuerza Atómica para conocer la distribución de HBHA (proteína con función similar a FHA) en la superficie *Mycobacterium tuberculosis*. Los resultados indican que la proteína se encuentra alojada en regiones discretas de la envoltura (43). Utilizando la misma técnica Alsteens y col. han estudiado la re-organización de proteínas Als en la superficie de *Candida albicans* en respuesta al estímulo por estiramiento con una punta modificada con dicha proteína. Luego de la interacción se observó una clara reorganización de adhesinas de tipo amiloideo formando nanodominios (44). Otro caso interesante es el descrito para *S. salivarius*, para la cual se mostró que existe un reordenamiento de los componentes de la envoltura hasta lograr que la bacteria adopte su conformación energética más favorable. Este reordenamiento trae como consecuencia el aumento de la fuerza de interacción entre la bacteria y la superficie (45).

De igual manera, nuestros resultados indican que la proteína FHA estaría organizada en *clusters*, generando una gran ventaja para su función *in vivo*. FHA es la principal adhesina de *Bordetella pertussis*, es un factor de virulencia determinante en la formación de *biofilm*, no únicamente en el reconocimiento y adhesión inicial de las bacterias a las células del epitelio respiratorio a través de sus dominios RGD (46, 47), sino también en etapas posteriores del desarrollo del *biofilm* maduro (48). Asimismo, FHA es una proteína involucrada en la invasión celular que permite la posterior persistencia del patógeno en las células del sistema inmune (49). El ordenamiento en nanodominios, contrariamente a lo que ocurriría para una distribución aleatoria en la superficie, otorgaría a la célula una ventaja importante al generar una mayor fuerza de interacción focal con los tejidos, consecuencia de la suma de las interacciones individuales de las proteínas presentes en la superficie, favoreciendo de esta manera la etapa de adhesión, primer paso en el establecimiento de la infección.

IV.5 CONCLUSIONES

Los resultados expuestos en este capítulo y su posterior análisis nos permiten arribar a las siguientes conclusiones:

i)- Existen diferencias significativas entre los valores de módulo de Young para las tres cepas estudiadas, siendo la cepa *B. pertussis* Tohama I la que presenta valores mayores de rigidez en la envoltura celular.

ii)- Las diferencias encontradas en la población global se correlacionan con las características de elasticidad expuestas por células individuales para las tres cepas estudiadas.

iii)- Los valores más rígidos de módulo de Young encontrados en bacterias de la cepa *B. pertussis* Tohama I se asocian a la presencia de la proteína FHA en la superficie bacteriana.

iv)- La proteína FHA parecería estar organizada en nanodominios en lugar de encontrarse homogéneamente distribuida en la superficie celular.

IV.6 BIBLIOGRAFIA

1. Vadillo-Rodriguez, V., Beveridge, T. J., and Dutcher, J. R. (2008) Surface Viscoelasticity of Individual Gram-Negative Bacterial Cells Measured Using Atomic Force Microscopy, *J. Bacteriol.* **190**, 4225-4232.
2. Andreeva, N., Bassi, D., Cappa, F., Cocconcelli, P. S., Parmigiani, F., and Ferrini, G. (2010) Nanomechanical analysis of Clostridium tyrobutyricum spores, *Micron* **41**, 945-952.
3. Gaboriaud, F., Bailet, S., Dague, E., and Jorand, F. (2005) Surface Structure and Nanomechanical Properties of Shewanella putrefaciens Bacteria at Two pH values (4 and 10) Determined by Atomic Force Microscopy, *J. Bacteriol.* **187**, 3864-3868.
4. Vadillo-Rodriguez, V., Schooling, S. R., and Dutcher, J. R. (2009) In Situ Characterization of Differences in the Viscoelastic Response of Individual Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cells, *J. Bacteriol.* **191**, 5518-5525.
5. Hoh, J. H., and Schoenenberger, C. A. (1994) Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy, *J. Cell Sci.* **107**, 1105-1114.
6. Heinisch, J. J., Lipke, P. N., Beaussart, A., El Kirat Chatel, S., Dupres, V., Alsteens, D., and Dufrene, Y. F. (2012) Atomic force microscopy - looking at mechanosensors on the cell surface, *J Cell Sci* **125**, 4189-4195.
7. Abu-Lail, N. I., and Camesano, T. A. (2006) Specific and nonspecific interaction forces between Escherichia coli and silicon nitride, determined by poisson statistical analysis, *Langmuir* **22**, 7296-7301.
8. Schaap, I. A., Eghiaian, F., des Georges, A., and Veigel, C. (2012) Effect of envelope proteins on the mechanical properties of influenza virus, *J Biol Chem* **287**, 41078-41088.
9. Schaer-Zammaretti, P., and Ubbink, J. (2003) Imaging of lactic acid bacteria with AFM--elasticity and adhesion maps and their relationship to biological and structural data, *Ultramicroscopy* **97**, 199-208.
10. Beckmann, M. A., Venkataraman, S., Doktycz, M. J., Nataro, J. P., Sullivan, C. J., Morrell-Falvey, J. L., and Allison, D. P. (2006) Measuring cell surface elasticity on enteroaggregative Escherichia coli wild type and dispersin mutant by AFM, *Ultramicroscopy* **106**, 695-702.
11. Dupres, V., Alsteens, D., Andre, G., and Dufrene, Y. F. (2010) Microbial nanoscopy: a closer look at microbial cell surfaces, *Trends Microbiol* **18**, 397-405.
12. Park, B., and Abu-Lail, N. I. (2010) Variations in the nanomechanical properties of virulent and avirulent Listeria monocytogenes, *Soft Matter* **6**, 3898-3909.
13. Burks, G. A., Velegol, S. B., Paramonova, E., Lindenmuth, B. E., Feick, J. D., and Logan, B. E. (2003) Macroscopic and Nanoscale Measurements of the Adhesion of Bacteria with Varying Outer Layer Surface Composition, *Langmuir* **19**, 2366-2371.
14. Francius, G., Polyakov, P., Merlin, J., Abe, Y., Ghigo, J. M., Merlin, C., Beloin, C., and Duval, J. F. L. (2011) Bacterial surface appendages strongly impact nanomechanical and electrokinetic properties of escherichia coli cells subjected to osmotic stress, *PLoS ONE* **6**, e20066.
15. Radmacher, M., Fritz, M., Cleveland, J. P., Walters, D. A., and Hansma, P. K. (1994) Imaging adhesion forces and elasticity of lysozyme adsorbed on mica with the atomic force microscope, *Langmuir* **10**, 3809-3814.
16. Touhami, A., Nysten, B., and Dufrêne, Y. F. (2003) Nanoscale Mapping of the Elasticity of Microbial Cells by Atomic Force Microscopy, *Langmuir* **19**, 4539-4543.
17. Butt, C. a. K. (2005) Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications, *Surf. Sci. Rep.* **59**, 1-152.
18. <http://www.bruker.jp/axs/nano/imgs/pdf/AN090.pdf>.
19. Locht, C., Geoffroy, M. C., and Renaud, G. (1992) Common accessory genes for the Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the papC and papD gene families., *EMBO J.* **11**, 3175-3183.

20. Relman, D., Tuomanen, E., Falkow, S., Golenbock, D. T., Saukkonen, K., and Wright, S. D. (1990) Recognition of a bacterial adhesin by an integrin: Macrophage CR3 ($\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*, *Cell* 61, 1375-1382.
21. Vadillo-Rodríguez, V., Busscher, H. J., Norde, W., de Vries, J., Dijkstra, R. J. B., Stokroos, I., and van der Mei, H. C. (2004) Comparison of Atomic Force Microscopy Interaction Forces between Bacteria and Silicon Nitride Substrata for Three Commonly Used Immobilization Methods, *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5441-5446.
22. Polyakov, P., Soussen, C., Duan, J., Duval, J. F. L., Brie, D., and Francius, G. (2011) Automated Force Volume Image Processing for Biological Samples, *PLoS ONE* 6, e18887.
23. Velegol, S. B., and Logan, B. E. (2002) Contributions of Bacterial Surface Polymers, Electrostatics, and Cell Elasticity to the Shape of AFM Force Curves, *Langmuir* 18, 5256-5262.
24. Ebenstein, D. M., and Pruitt, L. A. (2006) Nanoindentation of biological materials, *Nano Today* 1, 26-33.
25. Arnoldi, M., Fritz, M., Bäuerlein, E., Radmacher, M., Sackmann, E., and Boulbitch, A. (2000) Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy, *Phys.Rev.E* 62, 1034-1044.
26. Wood, N., and McIntyre, P. (2008) Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention, *Paediatr Respir Rev* 9, 201-211; quiz 211-202.
27. Koenig, H. F. a. C. H. W. v. (1996) *Bordetella*, *Medical Microbiology*, 4th edition 31.
28. Parra, A., Casero, E., Lorenzo, E., Pariente, F., and Vázquez, L. (2007) Nanomechanical Properties of Globular Proteins: Lactate Oxidase, *Langmuir* 23, 2747-2754.
29. Morozov, V. N., and Morozova, T. Y. (1981) Viscoelastic properties of protein crystals: Triclinic crystals of hen egg white lysozyme in different conditions, *Biopolymers* 20, 451-467.
30. Suda, H., Sugimoto, M., Chiba, M., and Uemura, C. (1995) Direct Measurement for Elasticity of Myosin Head, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211, 219-225.
31. Turnidge, J., and Paterson, D. L. (2007) Setting and Revising Antibacterial Susceptibility Breakpoints, *CMR* 20, 391-408.
32. Babu, M. M., Bhargavi, J. S., Singh, R., and Singh, S. (2001) Virulence factors of *Bordetella pertussis* *Curr.Sci.* 80, 1512-1522.
33. Kajava, A. V., Cheng, N., Cleaver, R., Kessel, M., Simon, M. N., Willery, E., Jacob-Dubuisson, F., Locht, C., and Steven, A. C. (2001) Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins, *Mol. Microbiol.* 42, 279-292.
34. Mattoo, S., and Cherry, J. D. (2005) Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies, *CMR* 18, 326-382.
35. Dufrene, Y. F. (2001) Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells, *Micron* 32, 153-165.
36. Heinisch, J. J., and Dufrêne, Y. F. (2010) Is there anyone out there? - Single-molecule atomic force microscopy meets yeast genetics to study sensor functions, *Integrative Biology* 2, 408-415.
37. Arce, F. T., Carlson, R., Monds, J., Veeh, R., Hu, F. Z., Stewart, P. S., Lal, R., Ehrlich, G. D., and Avci, R. (2009) Nanoscale structural and mechanical properties of nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms, *J Bacteriol* 191, 2512-2520.
38. Hansma, H. G., Laney, D. E., Bezanilla, M., Sinsheimer, R. L., and Hansma, P. K. (1995) Applications for atomic force microscopy of DNA, *Biophys J* 68, 1672-1677.
39. Díaz, C., Schilardi, P. L., Salvarezza, R. C., and Fernández Lorenzo de Mele, M. (2011) Have flagella a preferred orientation during early stages of biofilm formation?: AFM study using patterned substrates, *Colloids Surf., B* 82, 536-542.
40. Sullivan, C. J., Venkataraman, S., Retterer, S. T., Allison, D. P., and Doktycz, M. J. (2007) Comparison of the indentation and elasticity of *E. coli* and its spheroplasts by AFM, *Ultramicroscopy* 107, 934-942.

41. Thwaites, J. J., and Mendelson, N. H. (1985) Biomechanics of bacterial walls: studies of bacterial thread made from *Bacillus subtilis*, *Proc Natl Acad Sci U S A* *82*, 2163-2167.
42. Jain, S., van Ulsen, P., Benz, I., Schmidt, M. A., Fernandez, R., Tommassen, J., and Goldberg, M. B. (2006) Polar Localization of the Autotransporter Family of Large Bacterial Virulence Proteins, *J. Bacteriol.* *188*, 4841-4850.
43. Dupres, V., Menozzi, F. D., Loch, C., Clare, B. H., Abbott, N. L., Cuenot, S., Bompard, C., Raze, D., and Dufrene, Y. F. (2005) Nanoscale mapping and functional analysis of individual adhesins on living bacteria, *Nat Meth* *2*, 515-520.
44. Alsteens, D., Garcia, M. C., Lipke, P. N., and Dufrene, Y. F. (2010) Force-induced formation and propagation of adhesion nanodomains in living fungal cells, *PNAS* *107*, 20744-20749.
45. Olsson, A. L. J., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., and Sharma, P. K. (2010) Novel Analysis of Bacterium-Substratum Bond Maturation Measured Using a Quartz Crystal Microbalance, *Langmuir* *26*, 11113-11117.
46. Cotter, P. A., Yuk, M. H., Mattoo, S., Akerley, B. J., Boschwitz, J., Relman, D. A., and Miller, J. F. (1998) Filamentous Hemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* Is Required for Efficient Establishment of Tracheal Colonization, *Infect. Immun.* *66*, 5921-5929.
47. Irie, Y., and Yuk, M. H. (2007) In vivo colonization profile study of *Bordetella bronchiseptica* in the nasal cavity, *FEMS Microbiol. Lett.* *275*, 191-198.
48. Serra, D. O., Conover, M. S., Arnal, L., Sloan, G. P., Rodriguez, M. E., Yantorno, O. M., and Deora, R. (2011) FHA-Mediated Cell-Substrate and Cell-Cell Adhesions Are Critical for *Bordetella pertussis* Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and in the Mouse Nose and the Trachea, *PLoS ONE* *6*, e28811.
49. Lamberti, Y., Hayes, J. A., Perez Vidakovics, M. L., and Rodriguez, M. E. (2009) Cholesterol-dependent attachment of human respiratory cells by *Bordetella pertussis*, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *56*, 143-150.

Capítulo

V

Experimentos de Reconocimiento Molecular para determinar la localización espacial de la adhesina FHA sobre la superficie de células de *B. pertussis*

Índice

V.1 INTRODUCCIÓN	148
V.2 MATERIALES Y METODOS	153
V.2.1 Microorganismos, condiciones de cultivo y preparación de las muestras bacterianas para su estudio con el Microscopio de Fuerza Atómica.	153
V.2.2 Preparación de las muestras proteicas para su observación y estudio por Microscopía de Fuerza Atómica.....	153
V.2.3 Funcionalización de la punta del cantilever	155
V.2.4 Experimentos de Espectroscopia de Fuerzas de Moléculas Únicas y ensayos de Mapeo de Reconocimiento Molecular	156
V.2.5 Análisis de las curvas de fuerza	157
V.2.6 Construcción de mapas de fuerza y elasticidad	157
V.2.7 Análisis estadístico	158
V.2.8 Análisis de <i>clusters</i> y vecinos próximos	158
V.3 RESULTADOS	160
V.3.1 Experimentos de Espectroscopia de Fuerza de Moléculas Únicas. Interacción FHA–anti-FHA	160
V.3.2 Experimentos de Mapeo de Reconocimiento Molecular y controles.....	165
V.3.2.i Curvas de fuerza y eventos de adhesión de la población total de células estudiadas	165
V.3.2.ii Experimentos de Mapeo de Reconocimiento Molecular en células individuales y controles.....	169
V.3.2.iii Mapas de fuerza y elasticidad	173
V.3.2.iv Análisis de <i>clusters</i> y vecinos próximos.....	176
V.4 DISCUSION.....	181
V 5 CONCLUSIONES	184
V 6 BIBLIOGRAFIA.....	185

V.1 INTRODUCCIÓN

Como se describió en el capítulo anterior, la expresión y localización de la proteína FHA en la superficie de *B. pertussis* no sería un fenómeno que ocurre al azar. Nuestros estudios indicaron que las adhesinas se encontrarían localizadas en nanodominios, confiriéndole a la bacteria un agrupamiento que le brindaría la posibilidad de obtener una adhesión focal de mayor magnitud, valiéndose de la suma colectiva de las interacciones proteína-superficie individuales que lo conforman. No obstante, se debe reconocer que las evidencias encontradas son de tipo indirecto debido a que la presencia de la proteína no se identificó a través de un mecanismo de reconocimiento molecular. Por esta razón nos propusimos avanzar en el estudio de la localización de la adhesina FHA en la superficie de bacterias individuales de *B. pertussis* utilizando la técnica de Espectroscopia de Fuerza Atómica (del inglés Atomic Force Spectroscopy, AFS) y obtener, de esta manera, una identificación molecular más precisa de la localización de la proteína en la superficie celular.

Como se describió en el Capítulo III, una de las herramientas más valiosas del MFA es la posibilidad de realizar curvas de fuerza sobre la superficie de una muestra. Considerando al *cantilever* como un resorte, se puede calcular la fuerza que aplica siguiendo la ley de Hooke (ecuación 2 capítulo III):

$$F = -k x \quad (1)$$

Dependiendo de la constante de resorte del cantiléver, se pueden sensor fuerzas de interacción entre la punta y la muestra en el rango de los pN a μ N (1); que combinado con la gran precisión lateral y la posibilidad de realizar las medidas en ambientes muy cercanos a los fisiológicos, permiten confeccionar experimentos sumamente valiosos referidos a la localización de grupos funcionales y moléculas en la superficie celular (2, 3). La técnica de Espectroscopia de Fuerza de Moléculas Únicas (en inglés, Single Molecule Force Spectroscopy, SMFS), ha permitido la cuantificación de fuerzas intermoleculares de una gran variedad de pares ligando-receptor. Entre otros, ha sido utilizada para medir la interacción entre biotina-estreptavidina (100-253pN) (4-6), entre mucinas oculares humanas (100-1200pN) (7), entre la toxina colérica y el gangliósido G_{M1} (54-62pN) (8), entre la proteína Concanavalina A y diferentes manosidos (47 pN) (9) y entre una amplia variedad de antígenos y sus respectivos anticuerpos (100, 200, 240, 125 pN) (10-13). Este tipo de

experimentos permite determinar, no solo la magnitud de la fuerza de interacción entre las moléculas involucradas, sino también, la constante de disociación entre ellas, a través de la siguiente ecuación:

$$F = \frac{K_{Bolt}T}{x} \ln \left(\frac{rx}{K_{off.exp} K_{Bolt}T} \right) \quad (2)$$

Donde F es la fuerza de ruptura de la interacción ligando-receptor, K_{Bolt} es la constante de Boltzman, $K_{off.exp.}$ es la constante de disociación experimental, T es la temperatura, x es la distancia en la coordenada de reacción entre el estado asociado y el intermediario de reacción y r es la tasa de aplicación de la fuerza (*loading rate*). Las fuerzas de ruptura se encuentran directamente relacionadas con la cinética de disociación de los complejos y por ello dependen de la tasa de aplicación de la fuerza (14), que por definición corresponde a la derivada en el tiempo de la aplicación de la fuerza y se puede calcular como el producto de la constante de fuerza del cantiléver por la velocidad de retracción de la punta. Esta condición es cierta únicamente si la unión se encuentra fija en una posición (1). De hecho, experimentalmente la tasa de aplicación de la fuerza se calcula a como la pendiente de la recta que une los puntos de la curva de retracción en la zona anterior y próxima a la ruptura de la unión (15). De acuerdo a la ecuación 2, la fuerza sigue un comportamiento lineal, de pendiente positiva con el logaritmo natural de la tasa de aplicación de la fuerza. Si se calcula la fuerza de adhesión promedio entre un ligando y un receptor a diferentes velocidades de retracción de la punta, que como se dijo anteriormente son proporcionales a las tasas de aplicación de la fuerza (*loading rate*), se debería poder graficar una recta y calcular la constante de disociación experimental ($K_{off.exp.}$). El comportamiento de la curva F vs ln (tasa de aplicación de la fuerza) indica que a mayor velocidad de retracción, mayor es la fuerza de interacción medida, este fenómeno se puede interpretar a través de la teoría del modelo de las barreras energéticas. Como indica la teoría de Bell-Evans (16), los procesos de disociación en los que interviene una fuerza externa dependen de la tasa de aplicación de dicha fuerza (*loading rate*).

La dependencia de la fuerza de ruptura del enlace ligando- receptor con la velocidad con que se aplica fuerza a estos enlaces radica en el entorno dinámico en el cual ocurre ese proceso. Las colisiones del solvente pueden asistir a la ruptura del enlace transfiriendo energía al

No obstante su amplia aplicación en la investigación, se debe considerar que la técnica de Espectroscopia de Fuerzas de Moléculas Únicas presenta una falla inherente a la utilización de moléculas biológicas purificadas ya que éstas son removidas de su contexto biológico, que controla su ensamblado y estado funcional. Un caso particular es el de los receptores de membrana ICAM, cuya purificación se realiza en la mayor parte de los casos para formas truncadas, que consisten únicamente en la porción extracelular, con lo cual, además de ser caracterizados en su forma no nativa, tampoco poseen los dominios regulatorios. Para salvar este problema, se puede utilizar células que expresen el receptor como muestra. El principio de la SMFS puede ser aplicado al estudio de interacciones específicas de moléculas únicas en la superficie de diferentes células. Para ello se deben cumplir ciertos postulados: i) la unión de las moléculas a la punta del *cantilever* debe ser mucho más fuerte que la interacción entre las moléculas estudiadas, ii) la molécula de interés se debe encontrar en su estado nativo, y iii), las interacciones detectadas deben representar interacciones de moléculas individuales (21). Este tipo de experimentos se denominan ensayos de Mapeo de Reconocimiento Molecular y permiten estudiar la localización en tiempo real de las moléculas de interés manteniendo las células vivas y de esta manera obtener información sobre los procesos naturales que ocurren en las superficies celulares. En este tipo de experimentos, las interacciones y las fuerzas de ruptura de los eventos de reconocimiento están gobernadas por los mismos factores que los expuestos anteriormente para los ensayos de SMFS. La idea global es la utilización de una punta funcionalizada con un ligando que interaccione de manera específica con un componente de la superficie celular y que permita determinar su localización espacial y su dinámica de movimiento.

En este capítulo se utilizó la Espectroscopia de Fuerza de Moléculas Únicas y el Mapeo de Reconocimiento Molecular para detectar la localización y dinámica espacial de la proteína FHA en la superficie de células de *B. pertussis* Tohama I empleando puntas funcionalizadas con anticuerpos de isotipo IgG anti-FHA de origen comercial.

Los objetivos específicos de este capítulo son:

- Establecer un protocolo de funcionalización para puntas de Si_3N_4 con un anticuerpo anti-FHA.
- Determinar la eficiencia de este procedimiento realizando experimentos de SMSF entre la punta modificada con el anticuerpo y la proteína FHA purificada depositada sobre mica.
- Determinar el valor de velocidad de retracción más adecuado para la realización de curvas de fuerza en ensayos de Mapeo de Reconocimiento Molecular entre la punta funcionalizada y la proteína en la pared celular.
- Realizar ensayos de Mapeo de Reconocimiento Molecular sobre la superficie de bacterias individuales de *B. pertussis* Tohama I.
- Construir mapas de localización de los eventos de reconocimiento en la superficie de bacterias individuales y evaluar posibles cambios dinámicos en el tiempo.

V.2 MATERIALES Y METODOS

V.2.1 Microorganismos, condiciones de cultivo y preparación de las muestras bacterianas para su estudio con el Microscopio de Fuerza Atómica.

Para estos estudios se utilizaron la cepa salvaje *B. pertussis* Tohama I y la cepa $\Delta fhaB$ descritas en el capítulo IV. Se utilizaron las mismas condiciones de cultivo allí descritas. Las bacterias inactivadas por calor fueron obtenidas por calentamiento de una suspensión bacteriana de $DO_{650}=1$ a 56°C durante 30 min.

Las células fueron adheridas electrostáticamente a vidrios previamente tratados con una solución de PEI 0,1%. Las medidas se realizaron en *buffer* PBS tal como se describió en el capítulo IV.

V.2.2 Preparación de las muestras proteicas para su observación y estudio por Microscopía de Fuerza Atómica

La proteína Hemaglutinina Filamentosa (FHA) purificada (Sigma, St. Louis, MO, USA) fue adherida a una superficie limpia de mica. Para ello, se levantó la capa superficial de discos de mica de 1cm de diámetro utilizando una cinta adhesiva y permitiendo, de esta manera, que quede expuesta una cara limpia del material para su posterior funcionalización. Las superficies limpias de mica se pusieron en contacto con 50 μ l de una solución etanólica de APTES 1% durante 1 min y se lavaron con agua Milli-Q tres veces. Luego, los discos de mica funcionalizados fueron secados bajo una corriente de N₂ e incubados con 50 μ l de solución acuosa de glutaraldehído 0,5% (Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 15 min (22). Estos discos fueron posteriormente lavados con agua Milli-Q. A continuación fueron secados bajo corriente de N₂ y se incubaron durante 15 min. con 30 μ l de solución de FHA en *buffer* PBS (10ng/ μ l). La estrategia química utilizada para la adhesión de la proteína a la superficie de mica se muestra en la Figura 2. Luego de lavar la superficie de las muestras tres veces con agua Milli-Q, los discos se adhirieron al porta muestras del MFA a través de una cinta de doble pegamento para ser colocados sobre el barredor piezoeléctrico del microscopio. La correcta funcionalización de la superficie fue estudiada a través de la realización de imágenes en modo contacto al aire utilizando una punta de Si₃N₄ limpia y aplicando una fuerza máxima de 1 nN. Una vez obtenidas las imágenes y para corroborar la presencia de material blando (proteínas), se incrementó la fuerza aplicada hasta 8 nN, de manera de que

con el barrido, el material orgánico que pudiera encontrarse en la superficie, fuera arrastrado hacia los costados del cuadrante. Una vez realizados 10 barridos consecutivos, se retornó a una fuerza de 1nN y se amplió la ventana de barrido; de esta manera, se observó el material arrastrado en los bordes del cuadrado de barrido inicial, corroborando la presencia de material blando en la superficie. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio NanoWizard3-Bioscience, JPK (JPK Instruments AG, Berlín, Alemania).

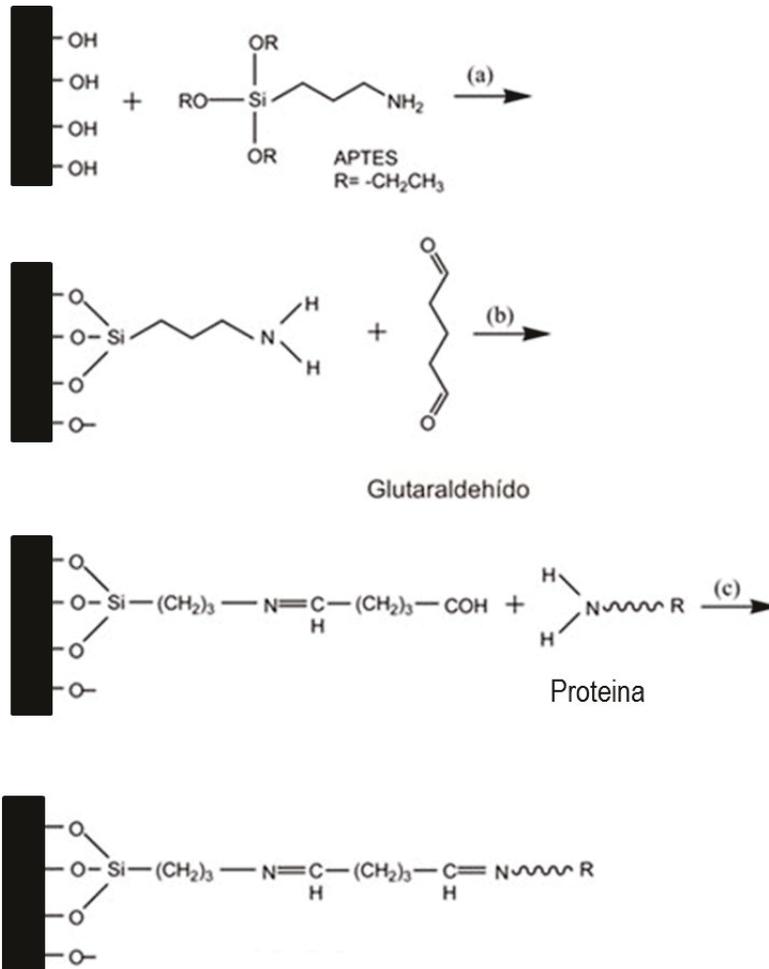


Figura 2- Esquema de las reacciones químicas que ocurren durante la funcionalización de una superficie de mica con APTES y glutaraldehído para adherir una proteína. En una primera etapa, los grupos OH de la superficie de mica reaccionan con los grupos silanos del APTES en un medio etanólico liberando tres moléculas de etanol (a). En la segunda etapa, un grupo aldehído del glutaraldehído reacciona con los grupos NH_2 del APTES generando una unión imida (b), posteriormente, los grupos NH_2 de las lisinas presentes en la proteína reaccionan con el segundo grupo aldehído del glutaraldehído produciendo la segunda unión imida y fijando la proteína a la superficie (c).

V.2.3 Funcionalización de la punta del *cantilever*

Para los ensayos se utilizaron *cantilevers* de Si_3N_4 NP-10 (Bruker, Santa Barbara, CA), que fueron funcionalizados con anticuerpos específicos para el reconocimiento de la proteína FHA (NIBSC, Londres, Inglaterra). Los anticuerpos comerciales producidos en oveja y liofilizados fueron re-suspendidos en *buffer* PBS y alicuotados para su conservación a -20°C . La funcionalización de las puntas se realizó utilizando una modificación de la técnica mostrada en la figura 20-C del capítulo III. A continuación se explica en mayor detalle: las puntas se lavaron con agua Milli-Q, y se incubaron con una solución acuosa de glutaraldehído 0,5% durante 15 min luego de lo cual se lavaron nuevamente 3 veces (22), se incubaron con 30 μl de solución de anticuerpo anti-FHA (1mg/ml) durante 15 min y se lavaron nuevamente tres veces con Milli-Q. Paralelamente a este protocolo, se realizó un segundo tratamiento en el cual las puntas fueron incubadas 1 min con una solución etanólica de APTES 1% previamente a la incubación con glutaraldehído. Debido a que no se observaron diferencias en la calidad de la funcionalización, determinada a través de la realización de ensayos de Espectroscopia de Fuerza Atómica, se utilizó el protocolo sin APTES para los ensayos posteriores. La química de la funcionalización se ejemplifica en la Figura 3.

Inmediatamente después de funcionalizadas con el anticuerpo, las puntas fueron transferidas al porta puntas de la celda de líquidos para ser colocadas sobre la muestra, que se soporta sobre el barredor piezoeléctrico del MFA. Las medidas fueron realizadas en *buffer* PBS de manera de mantener las muestras en condiciones cercanas a las fisiológicas durante el tiempo del experimento.

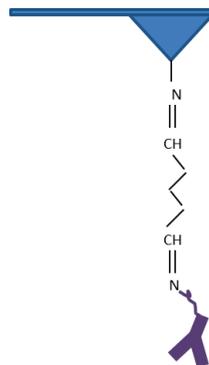


Figura 3- Funcionalización de una punta de Si_3N_4 con glutaraldehído (GA). Los grupos sililamino, presentes en la superficie de las puntas (23, 24) forman una unión imida con el aldehído del glutaraldehído, el segundo grupo aldehído reacciona con los grupos NH_2 de las lisinas del anticuerpo formando una segunda unión imida que lo mantiene unido a la punta. El dibujo no está realizado a escala. Se pretende mostrar las uniones donde interviene el GA.

V.2.4 Experimentos de Espectroscopia de Fuerzas de Moléculas Únicas y ensayos de Mapeo de Reconocimiento Molecular

Previo al estudio de las muestras de interés, se colocó en el portamuestras un disco limpio de mica para realizar la calibración de microscopio y la determinación de la constante de fuerza del cantiléver. Las constantes de resorte encontradas para todos los casos estuvieron entre 0,05 y 0,08 N/m. Luego de la calibración se colocaron las muestras (FHA adheridas sobre discos de mica o bacterias adheridas electrostáticamente a vidrio). Durante todo el experimento se trabajó en el modo *Force Volume* (FV), es decir, la construcción de las imágenes se realizó a través de la realización de un arreglo de curvas de fuerza y se utilizó, en el caso de las muestras correspondientes a FHA purificada un Microscopio *Nanoscope IV* y para el caso de las muestras bacterianas un Microscopio *Multimode Nanoscope V* (ambas de la firma Bruker, Santa Bárbara, CA). Todas las medidas fueron realizadas en *buffer* PBS. La fuerza máxima aplicada fue de 1nN y el recorrido en Z utilizado fue de 1 μ m para las bacterias y de 0,5 μ m para las muestras de FHA purificada. De este modo se asegura que la punta se desprende completamente de la superficie y que ocurra la ruptura definitiva de las fuerzas de interacción entre la punta y muestra así como también tiene lugar la relajación de las moléculas luego de la ruptura de la unión. En el caso de los experimentos realizados sobre la proteína FHA purificada, se adquirieron 1000 curvas de fuerza para cada velocidad de retracción. Como se comentó anteriormente, estas curvas fueron adquiridas utilizando un MFA acoplado a una unidad de control *Nanoscope IV* que permite la realización de arreglo de curvas de fuerza que no superen los 10x10 pixeles, por lo que se adquirieron 10 arreglos para cada velocidad de retracción (50, 100, 500 y 1000 nm/s), manteniendo el tiempo de contacto en superficie en 500ms. Luego se analizaron las curvas de retracción y se obtuvieron los valores más probables de fuerza de interacción para cada velocidad de barrido en z y se realizó el gráfico Fuerza vs \ln *loading rate* (tasa de aplicación de la fuerza) para comprobar la dependencia lineal de dichos parámetros, típico de una interacción específica ligando-receptor. En el caso de la muestra correspondiente a las bacterias, la velocidad de barrido en Z elegida fue de 500nm/s, y el tiempo de contacto en superficie fue también de 500ms. En una primera etapa, se realizaron imágenes de FV de 16x16 y una vez observada una célula aislada, se realizó un *zoom* en el área y se incrementó la resolución de la imagen de FV a 32x32 de manera de lograr un área por píxel de aproximadamente

100nm². Sobre una misma célula se realizaron dos imágenes de FV consecutivas, separadas por un tiempo de aproximadamente 40 min.

Para corroborar la especificidad de las interacciones se realizaron en ambos casos ensayos de bloqueo incubando las muestras con una solución de anticuerpo anti-FHA en PBS (10 mg/ml) durante una hora, seguido de tres lavados con agua Milli-Q previamente a la realización de los ensayos de Espectroscopia de Fuerzas utilizando la punta derivatizada con el anticuerpo específico. En el caso de las células, se utilizó además una cepa mutante defectiva para la expresión de la proteína FHA, la cepa BPGR4, como control de la especificidad de las interacciones.

V.2.5 Análisis de las curvas de fuerza

Una vez obtenidas las curvas, se utilizó el *software* OpenFovea (25) para analizar los eventos de interacción presentes en las curvas de retracción. Cada curva fue analizada individualmente para determinar el valor de fuerza y la distancia desde el punto de contacto en la cual se produjo el evento de ruptura. Estos parámetros se calcularon como se indica en la Figura 4. También se determinó la cantidad de eventos de interacción presentes en cada curva, parámetro referido como picos por curva. Los valores obtenidos en cada caso se graficaron en histogramas.

En el caso de los ensayos realizados sobre células de *B. pertussis* Tohama I, se analizaron también las curvas de aproximación para determinar los valores de módulo de Young siguiendo el protocolo descrito en el capítulo IV y utilizando el *software* desarrollado por el Dr. Federico Castez en nuestro laboratorio.

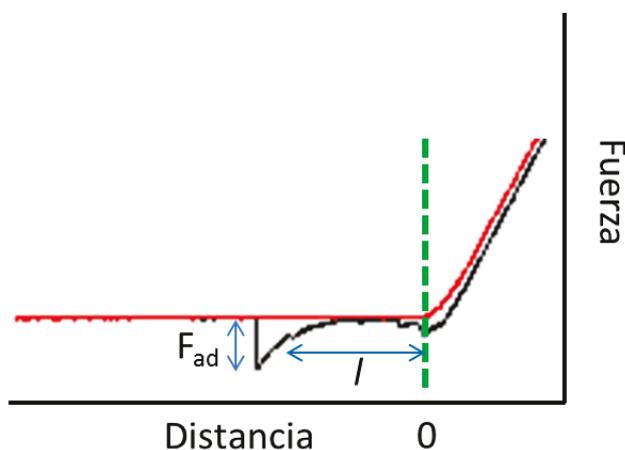


Figura 4. Curvas de fuerza típicas de un ensayo de SMFS, la magnitud del pico de adhesión se determina calculando el valor de fuerza resultante de restar el valor del mínimo del pico de adhesión en el eje y y el valor de la línea de base (0 pN). La distancia a la que ocurre el evento de adhesión se determina calculando la distancia en el eje x entre el punto de contacto, que corresponde al punto de intersección entre la línea gris punteada y la curva de fuerza y el valor en x correspondiente al mínimo del pico de adhesión (l).

V.2.6 Construcción de mapas de fuerza y elasticidad

Los valores obtenidos del análisis de eventos de interacción y módulo de Young para la cepa *B. pertussis* Tohama I fueron correlacionados con las coordenadas x , y de la curva de fuerzas de la cual fueron determinados en la imagen de topografía del FV y se construyeron mapas de fuerzas donde se observa la distribución de los eventos de reconocimiento de la proteína FHA en la superficie de las células. Para cada bacteria se realizaron dos mapas, uno utilizando los datos de la primera imagen de FV, correspondiente al tiempo 0 y otro utilizando los datos de la segunda imagen de FV realizada sobre la misma bacteria y correspondientes al tiempo 40 min. De la misma manera se construyeron mapas de elasticidad donde se graficaron los valores de módulo de Young para los dos tiempos estudiados.

V.2.7 Análisis estadístico

Todos los datos colectados del análisis de eventos de interacción entre la punta modificada con el anticuerpo anti-FHA y células de *B. pertussis* Tohama I, al igual que los datos de distancia a los cuales se produjeron los eventos correspondientes a cada tiempo de estudio fueron graficados en histogramas individuales y los datos fueron ajustados con una función de probabilidad LogNormal para determinar los valores más probables de fuerza de interacción y distancia de interacción.

V.2.8 Análisis de *clusters* y vecinos próximos

A partir de la construcción de los mapas de fuerza se pudo definir la matriz de fuerzas F_{ij} , con $1 \leq i \leq L_x$, $1 \leq j \leq L_y$, donde L_x y L_y representan el número de filas y columnas del mapa de fuerzas respectivamente. En una primera instancia, se realizó un binarizado de la matriz de fuerzas, definiendo un valor umbral de fuerza f_u . De esta manera, los elementos de la matriz binarizada pueden escribirse como

$$B_{ij} = 1 \text{ si } F_{ij} \geq f_u$$

$$B_{ij} = 0 \text{ en caso contrario}$$

Al generar imágenes a partir de la matriz binarizada, éstas toman la forma de mapas de dos colores. Convencionalmente, podemos interpretar a cada sitio (i,j) como “ocupado” (si $B_{ij} = 1$) o “desocupado” (si $B_{ij} = 0$). Cada sitio, genéricamente designado por sus índices (i,j) , tiene

en la grilla rectangular bidimensional cuatro sitios “primeros vecinos” (cuyos índices son $(i \pm 1, j)$, $(i, j \pm 1)$) y sitios “segundos vecinos” (con índices $(i + 1, j + 1)$, $(i + 1, j - 1)$, $(i - 1, j + 1)$, $(i - 1, j - 1)$). Denotaremos $C_{ij}^{(1)}$ y $C_{ij}^{(2)}$ a los números de coordinación a primeros y segundos vecinos de cada sitio, respectivamente, los cuales se interpretan como los números de vecinos ocupados sin incluir (en el caso de $C_{ij}^{(1)}$) e incluyendo (en el caso de $C_{ij}^{(2)}$) los segundos vecinos. Ambas cantidades nos brindan una medida del “aglutinamiento” de los sitios, en el sentido de que cuanto mayor sean los números de coordinación, más contactos existirán entre sitios ocupados. Otra alternativa para la caracterización estadística de la distribución de sitios ocupados se puede lograr estudiando la formación de “conglomerados” o “clusters”: diremos que dos sitios ocupados pertenecen a un mismo *cluster* si tales sitios pueden unirse (admitiendo movimientos en diagonal, es decir, incluyendo conexiones a segundos vecinos) por un camino de sitios ocupados; por el contrario, si, para unir dos sitios con tales movimientos sobre la grilla necesariamente debemos pasar por al menos un sitio desocupado, diremos que tales sitios pertenecen a *clusters* distintos. Claramente, cuanto mayor sea la “afinidad” entre sitios ocupados, la distribución de *clusters* tenderá a optar por configuraciones con una cantidad relativamente baja de *clusters* y, considerando un número fijo de sitios ocupados en la grilla, tales *clusters* tendrán un tamaño relativamente importante. Contrariamente, si la afinidad entre sitios es baja (es decir, si no hay una marcada preferencia por buscar el contacto entre los sitios), la distribución tenderá a preferir configuraciones que consten de una gran cantidad de *clusters* de pequeño tamaño.

V.3 RESULTADOS

V.3.1 Experimentos de Espectroscopia de Fuerza de Moléculas Únicas. Interacción FHA–anti-FHA

Los experimentos aquí descritos fueron realizados en colaboración con el grupo dirigido por el Prof. Dr. Giovanni Dietler, de la Universidad de Lausanne, Suiza. Más específicamente fue el Dr. Sandor Kasas quien colaboró muy generosamente con nosotros en la puesta a punto de la funcionalización de las puntas y el análisis de los eventos de adhesión.

Como se puede observar en la Figura 5, la proteína FHA purificada fue adherida a una superficie de mica, limpia y modificada químicamente con APTES y glutaraldehído. En las imágenes, obtenidas al aire, se puede observar una gran cobertura de estructuras esféricas de tamaño variable entre 6 y 14 nm de alto, tal como se observa en la figura 5, que podrían corresponder a cúmulos de proteína.

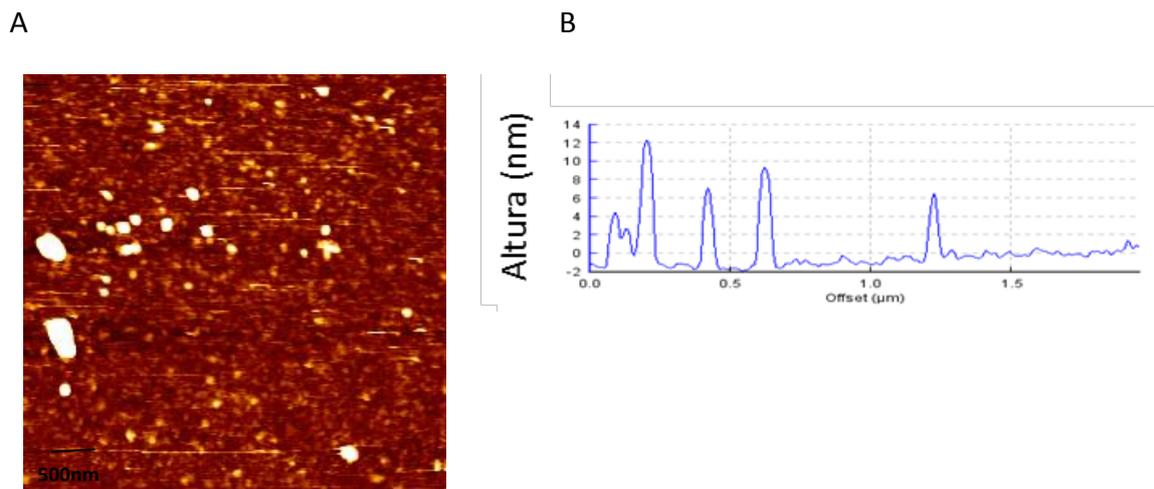


Figura 5.A-Imágene de AFM tomada en modo contacto al aire donde se observan las estructuras esféricas correspondientes a la proteína FHA adherida sobre mica. La figura C muestra el perfil de alturas correspondiente a la zona de la figura A, allí se observa la presencia de estructuras de entre 6 y 14 mn.

Una vez corroborado el método de funcionalización para la superficie, se procedió a la realización de los experimentos de Espectroscopia de Fuerza de Moléculas Únicas utilizando una punta modificada con un anticuerpo anti-FHA comercial. Se realizaron 1000 curvas de fuerzas para cada velocidad de retracción aplicando una fuerza máxima de 1 nN, con recorrido en Z de 0,50 μm de modo de asegurar la correcta separación de la punta de la

superficie y de esa manera evitar arrastrar material de un punto a otro y también para permitir la ruptura completa de las interacciones punta-muestra que se pudieran haber establecido. Las curvas de fuerza adquiridas fueron analizadas para determinar la cantidad y magnitud de eventos de interacción, así como también para determinar la distancia desde el punto de contacto a la que ocurrieron los eventos de adhesión. En la Figura 6.A se puede observar una curva de fuerza representativa, donde existe un evento de adhesión típico entre la punta funcionalizada con anticuerpos y la proteína FHA adherida a la superficie. En la Figura 6.B y C se grafican los histogramas representativos para las fuerzas de adhesión detectadas y las distancias a las que ocurren. La fuerza más probable de interacción para la velocidad de retracción que se muestra (500nm/s) es de 150pN. 1494 eventos presentaron dicho valor de adhesión, un valor típico para la interacción antígeno-anticuerpo medido con esta técnica, como ya fuera reportado para el par Fluoresceína anti-Fluoresceína (≈ 160 -200pN) (11) o para la interacción entre los receptores ICAM-1 y anticuerpo anti-ICAM-1 (100pN) (26), o entre Toxina Pertussis y anti-Toxina Pertussis (100, 188 y 241pN) (27). En el histograma se observa que el resto de los eventos detectados presentan valores de interacción mayores, de hasta 975pN. Estos valores responderían a la ruptura de la interacción de más de un anticuerpo con más de una proteína. Durante la funcionalización de la punta, los anticuerpos son unidos a la superficie empleando glutaraldehído. Por una parte, esta molécula se une covalentemente a los residuos sililamino superficiales de las puntas de nitruro de silicio (23, 24) y por otra parte establece una unión covalente con los grupos amino libres de las lisinas de los anticuerpos (28) tal como se explicó en la sección V.2.3. En este proceso no es posible controlar exactamente la cantidad de anticuerpos unidos a la punta y en general se acepta que es una cantidad mayor a uno. De esta manera, cuando la punta está en contacto con la superficie, todos los anticuerpos presentes en ella, y que estéricamente se encuentran libres de interactuar con la proteína de la superficie lo harán, de manera tal que al separarse de la muestra pueden existir eventos que involucran varias interacciones que se rompen al mismo tiempo. De este modo, la cantidad de anticuerpos implicados en la interacción a una única distancia punta-muestra, determinará la magnitud de la fuerza de adhesión, siendo la más probable la interacción de un único par antígeno-anticuerpo de ≈ 150 pN para el caso de la proteína libre inmovilizada sobre mica. En la Figura 6.C se puede observar el histograma de distancias para la velocidad de retracción seleccionada (500nm/s), que presenta un valor más probable de 40nm y un

máximo de 370nm. Las dimensiones de la proteína filamentosa FHA son 50nm de longitud y 5nm de ancho (29). Si consideramos un valor de longitud típico de entre 15 y 20nm para un anticuerpo (30), la distancia máxima desde el punto de contacto a la cual se podría producir un evento de adhesión sería de ≈ 70 nm (suma de las longitudes de la estructura antígeno-anticuerpo). De esta manera, la distancia más probable detectada experimentalmente (40nm), se encuentra dentro de las distancias esperables. Los valores mayores de distancia de ruptura, estarían asociados a eventos donde las proteínas pudieran encontrarse superpuestas, de modo que cuando la punta se aleja de la superficie “estira” un conjunto de proteínas y el evento de ruptura de la adhesión, que se produce cuando la punta y la muestra se separan definitivamente, ocurre a una distancia mayor de la esperable.

Una vez realizado este análisis para cada una de las 4 tasas de aplicación de la fuerza estudiadas se graficaron los valores de fuerza de adhesión más probable vs el ln de la tasa de aplicación de la fuerza ($\ln(Ir)$), tal como se muestra en la Figura 6.D. Los tres últimos puntos se ajustaron con una ecuación lineal con un valor $r^2=0,98$. En dicho ajuste no se incluye el primer punto registrado a velocidad de retracción 50nm/s, ya que pertenece a un comportamiento diferente en función de la fuerza. Este efecto ocurre como consecuencia de un cambio en el mecanismo de reacción con el cambio del intermediario de reacción a uno de mayor energía. Como se comentó en la sección V.2, este comportamiento es característico de interacciones entre dos moléculas que se reconocen específicamente, como el caso de los pares antígeno-anticuerpo (31).

En la Figura 6.A se muestra en el *inset* el ajuste lineal realizado en la zona inmediatamente anterior a la ruptura del evento de interacción, cuya pendiente se utilizó para determinar el valor de tasa de aplicación de la fuerza. Para cada velocidad de retracción se realizaron 10 ajustes en 10 curvas diferentes y se calculó un promedio para el valor de tasa de aplicación de la fuerza que fue el que se utilizó para graficar la recta F vs ln tasa de aplicación de la fuerza (32).

Para corroborar la especificidad de la interacción FHA-anti-FHA, se realizó un experimento de bloqueo incubando la muestra de FHA sobre mica con una solución de anticuerpo purificado durante una hora. Luego de lavar se realizó un experimento de Espectroscopia de Fuerza de Moléculas Únicas y se analizaron las curvas de retracción de la misma manera que en los experimentos anteriores. La velocidad de aplicación de la fuerza elegida fue de 500nm/s, ya que es la velocidad de retracción intermedia para la curva F vs. ln tasa de

aplicación de la fuerza dentro del comportamiento lineal. El análisis de los resultados indicó una importante disminución en la cantidad de eventos de adhesión, tal como se observa en el histograma de la Figura 6.E donde se puede ver que el valor más probable sigue siendo de 150pN, al igual el valor más probable observado anteriormente, aunque la cantidad de eventos específicos descendió más de un 60% debido a la disminución de los sitios de reconocimiento a causa del bloqueo previo. De esta manera, comprobamos que nuestro protocolo de funcionalización de la punta de Si_3N_4 funciona correctamente para la detección de eventos de reconocimiento específicos entre el par FHA-anti-FHA.

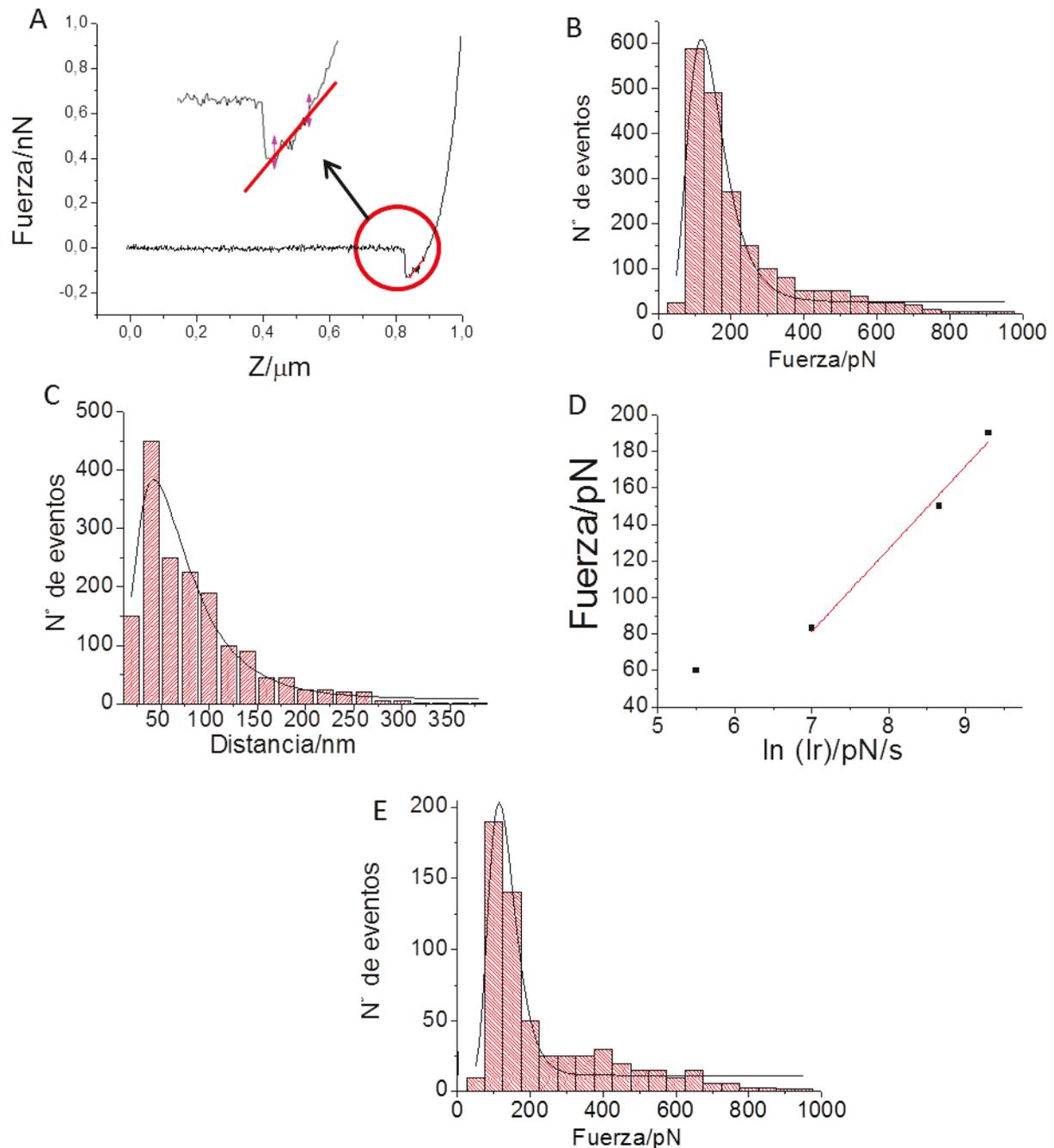


Figura 6- Curva de Fuerzas representativa de la interacción FHA-antiFHA. Se observa un único evento de adhesión de 180 pN. La pendiente del ajuste lineal realizado (recta roja) corresponde a la velocidad de aplicación de la fuerza calculada para la velocidad de barrido utilizada. La figura B corresponde a un histograma de los valores de interacción encontrados a la velocidad 500nm/s, donde el valor de adhesión más probable es 150 pN. El histograma C corresponde a la distribución de los valores de distancia desde el punto de contacto a los cuales se produjeron los eventos de adhesión graficados en el histograma B. El valor más probable es 40nm. En la figura D se grafica la distribución de los valores de fuerza de adhesión promedio encontrados para los cuatro valores diferentes de tasa de aplicación de la fuerza estudiados. Se observan dos segmentos diferentes, el segmento determinado por los tres últimos puntos fue ajustado con una función lineal. La velocidad seleccionada para los estudios corresponde a uno de los valores intermedios de ese segmento lineal. El histograma E corresponde a la distribución de fuerzas de interacción luego del bloqueo de la superficie con una solución de anticuerpo antiFHA, los eventos de reconocimiento disminuyeron en más del 60%.

V.3.2 Experimentos de Mapeo de Reconocimiento Molecular y controles.

V.3.2.i Curvas de fuerza y eventos de adhesión de la población total de células estudiadas

Una vez determinado el protocolo de funcionalización para la punta y habiendo corroborado el reconocimiento específico de la proteína FHA por parte del anticuerpo, decidimos realizar los experimentos de Mapeo de Reconocimiento Molecular sobre la superficie de células de la cepa *B. pertussis* Tohama I. La velocidad de retracción elegida fue 500nm/s. Las bacterias fueron cosechadas en fase exponencial y se adhirieron electrostáticamente a vidrios de 1cmx1cm, pre-incubados con una solución de PEI 0,1%. Una vez funcionalizada, la punta se transfirió inmediatamente a la celda de líquidos y se colocó el *buffer* PBS. Luego de haber calibrado la sensibilidad del microscopio utilizando una superficie limpia de mica y de haber determinado la constante de fuerza de la punta se comenzaron a adquirir imágenes de FV de 16x16 pxeles. Al detectar la localización de alguna bacteria individual se realizó sobre ella una primera imagen de FV con arreglo de 32x32 pixeles seguida de una segunda inmediatamente después. Se designó tiempo 0 a la primera imagen y tiempo 40 min a la segunda imagen ya que ese fue el tiempo que transcurrió entre la adquisición de ambas. Este tipo de experimentos se realizó para 5 células de la cepa *B. pertussis* Tohama I. Una vez adquiridas las imágenes de FV, se analizaron las curvas de retracción para determinar los eventos de adhesión y las distancias de separación punta-muestra para dichos eventos. En la figura 7.A se muestra una curva de fuerzas sin ningún evento específico de adhesión, en la figura 7.B puede observarse una curva que presenta un evento único de adhesión de 140 pN de magnitud a una distancia punta-muestra de 96nm. También se encontraron curvas con dos eventos de reconocimiento, tales como los que aparecen en la curva de fuerzas de la Figura 7 C, que presentan valores de 300 pN y que correspondería a la ruptura de la interacción de 2 pares antígeno-anticuerpo cada uno. También se obtuvieron curvas de fuerza con mayor número de eventos de adhesión, tal como se observa en la Figura 7.D, donde se ven tres eventos de adhesión cerca del punto de contacto, que poseen magnitud de entre 160 y 200pN, dentro de los límites de la fuerza encontrada para pares simples FHA-anti-FHA. Sin embargo, a una distancia mayor, se puede observar un evento diferente, con forma de “meseta”; este tipo de eventos de adhesión fue frecuentemente observado en las curvas adquiridas y han sido descritos en la bibliografía como eventos de estiramiento de la membrana celular. Al separar la punta de la superficie, la interacción genera el despegue de la membrana de las estructuras a las que se encuentra unida, generando nanotubos de

membrana tal como ha sido descrito para el caso de células eucariotas (33). Un esquema de este fenómeno se puede observar en la Figura 7-E. En el caso de una bacteria Gram-negativa, el origen de las mesetas puede atribuirse a la separación de un segmento de membrana de la capa de peptidoglicano del espacio inter-membrana (34).

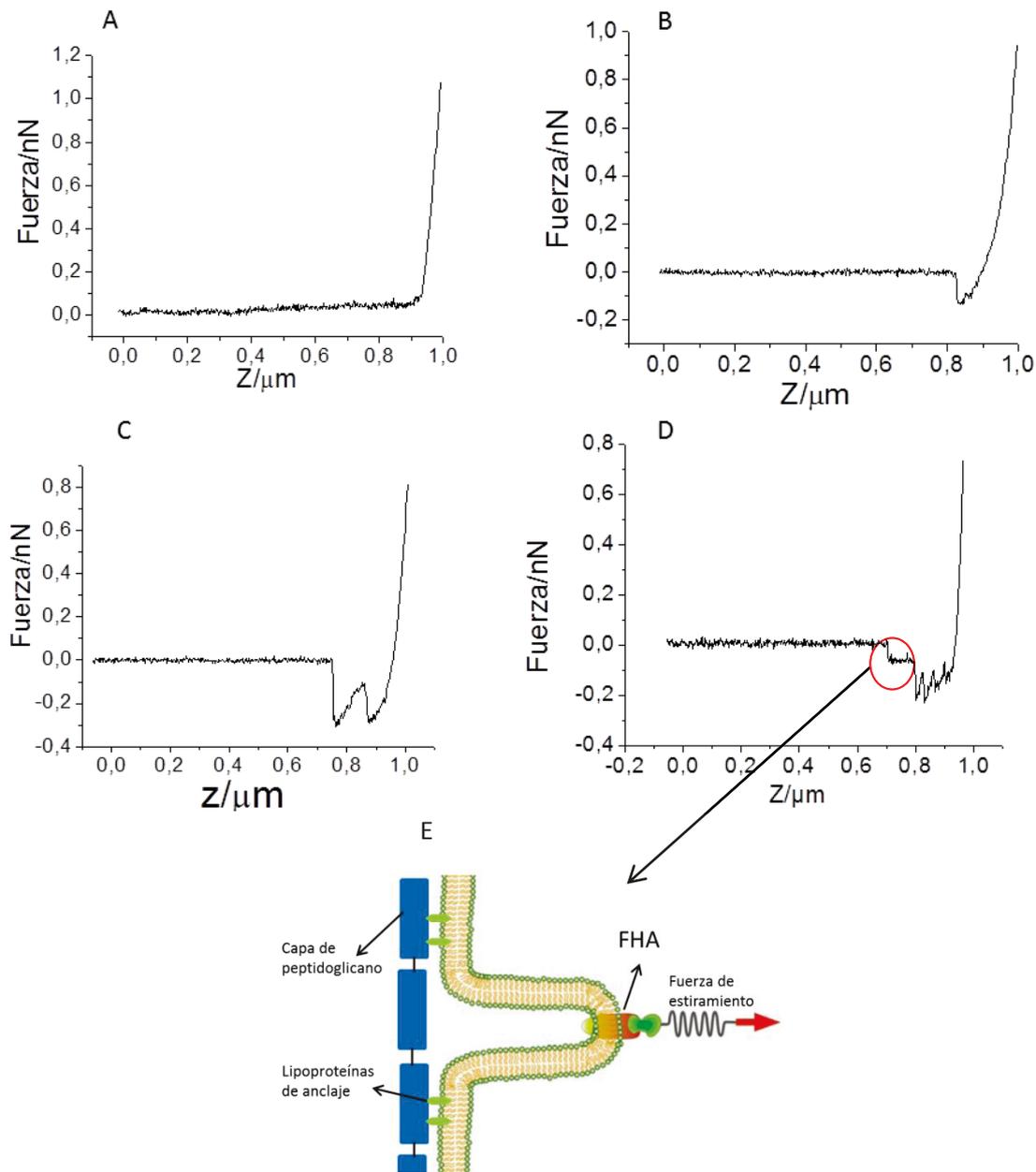


Figura 7- Curvas de Fuerza representativas de las observadas para la interacción entre la punta modificada con el anticuerpo anti-FHA y bacterias de la cepa *B. pertussis* Tohama I adheridas a la superficie de vidrio. Se observaron curvas sin eventos (A), con un evento específico (B), con dos eventos específicos (C) y con mayor número de eventos, como el caso D, donde se observan tres eventos específicos asociados a la ruptura de la unión FHA-anti-FHA y un evento tardío tipo meseta, que refleja el estiramiento de la envoltura celular al retraer la punta modificada, generando un nanotubo de membrana. El mecanismo propuesto para la generación de dichos nanotubos se puede observar en el Figura E (modificado de de Muller *et al.* [Nat Chem Biol](#) 2005 (6): 383-390)

Con los valores de fuerzas de interacción encontrados en todas las células estudiadas se construyeron histogramas de fuerza para $t=0$ y $t=40$ min tal como se puede observar en las Figuras 8.A y 8.B. Las distribuciones de los histogramas son muy parecidas entre sí, abarcan un rango de valores de adhesión que va desde los 50pN hasta los 900pN, aunque la mayor cantidad de eventos corresponden a valores pequeños de fuerza de interacción. En ambos casos se observa un valor más probable de 150pN, que es un valor típico de interacción para un par antígeno-anticuerpo y fue el valor más frecuentemente observado en los experimentos de SMFS realizados con la proteína FHA purificada. Sin embargo, dentro del conjunto total de la población, es posible, en ambos histogramas, diferenciar máximos locales alrededor de valores tales como 225pN y 300pN. Estas sub-poblaciones estarían asociadas a la ruptura de la interacción entre dos anticuerpos y una o más proteínas en la superficie al mismo tiempo, lo cual arrojaría un valor de adhesión correspondiente al doble del valor de interacción unitario o incluso a la interacción de un anticuerpo y un fragmento Fab de un segundo anticuerpo interaccionando de manera conjunta, como fue descrito por Hinterdorfer y col. (26, 35). Este fenómeno es esperable debido a que durante la funcionalización no es posible asegurar que en la punta solo exista la presencia de una única molécula de anticuerpo con la técnica de funcionalización utilizada. De esta manera al interaccionar más de un par antígeno-anticuerpo, se producen eventos de interacción de mayor magnitud pero con la particularidad de ser múltiples entre sí. Paralelamente se realizaron los histogramas de distancia, donde se grafican las longitudes en las que se producen los eventos de reconocimiento medidos desde el punto de contacto (Figura 8.C y D). Para ambos tiempos, $t=0$ y $t=40$ min, la distribución de las distancias es similar, y se ajusta bien con una función LogNormal. El valor más probable en ambos casos es de entre 100 nm. Este valor se encuentra por encima de los valores teóricos de longitud proteína+anticuerpo (≈ 70 nm), aunque se debe considerar que en estos experimentos, la proteína se encuentra inmersa en la membrana celular de la bacteria, que como se mostró en el capítulo anterior, posee características elásticas. De esta manera, la distancia de ruptura incluye el estiramiento parcial de la membrana celular en la cual se encuentra la proteína y por esta razón los valores de distancia resultan mayores que en los ensayos anteriores donde la proteína se inmovilizó sobre mica. Los valores de distancia se extienden hasta 500nm o incluso algunos eventos se registraron en valores de distancia de 700 u 800nm. Estos valores estarían asociados a los eventos de adhesión que ocurren cuando se

produce un estiramiento de la célula en su conjunto al retirarse la punta. La uniformidad en las distribuciones a ambos tiempos de medida indica que no existen contaminaciones en la punta, ya que éstas generarían un aumento en la distancia o variación en el perfil de distribución.

Un dato interesante es que la cantidad de eventos de adhesión totales fueron marcadamente mayores para el tiempo 40 min que para tiempo 0. En el tiempo 0 la cantidad de eventos de adhesión totales encontrados fue de 495 y la cantidad de curvas que no presentaron eventos de adhesión fueron 745 mientras que para el tiempo 40 min la cantidad de eventos de reconocimiento detectados fue de 761 y la cantidad de curvas que no presentaron adhesión disminuyeron (698). Este primer análisis global indica que en un período de 40 min la cantidad de eventos de reconocimiento en la superficie celular aumenta significativamente. Es por esto que decidimos estudiar el comportamiento de los eventos de reconocimiento en las células individuales, de modo de determinar si el comportamiento global es representativo del comportamiento individual de las bacterias.

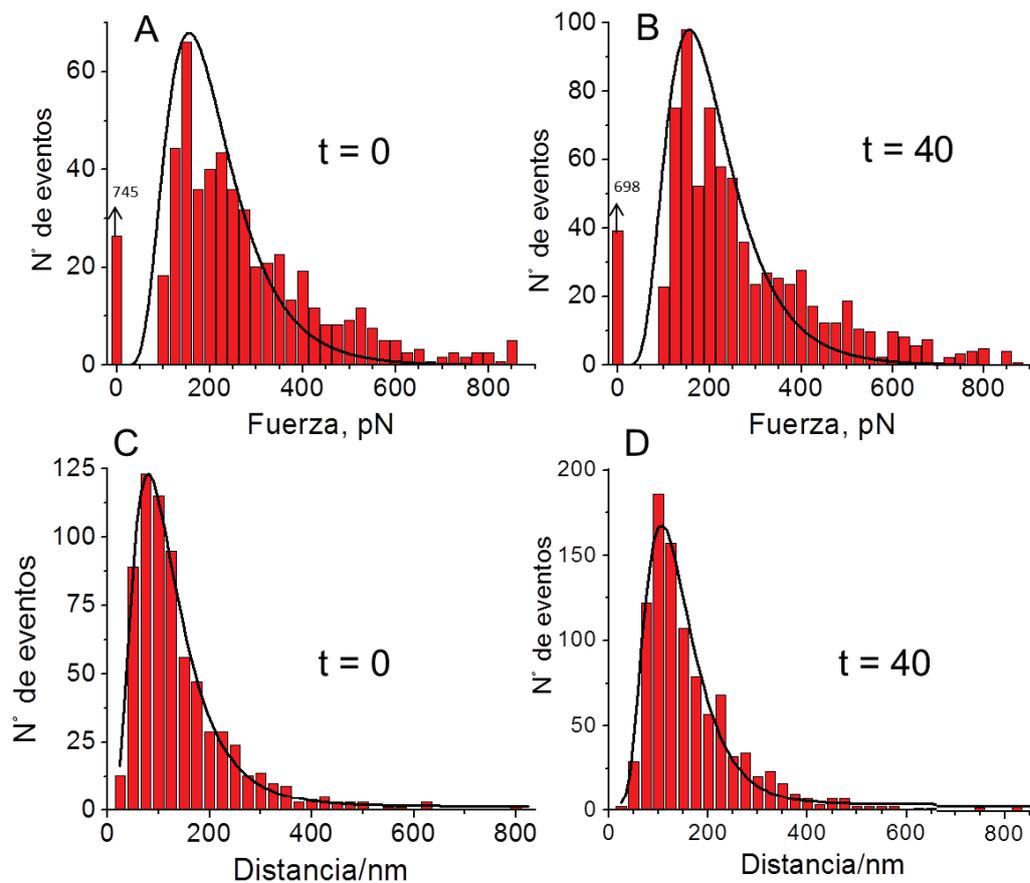


Figura 8- Se grafican los histogramas de fuerzas para todas las células estudiadas para el tiempo =0 (A) y el tiempo=40 min. (B), ambos histogramas se ajustaron con una función LogNormal y arrojaron un valor más probable de 150pN que correspondería a la interacción de un único par FHA-anti-FHA. Los histogramas de distancia para los eventos de reconocimiento se observan en las Figuras C y D para el t=0 y el t=40 min respectivamente.

V.3.2.ii Experimentos de Mapeo de Reconocimiento Molecular en células individuales y controles

En la figura 9.A se puede observar una imagen de FV de 32x32 píxeles realizada con una punta funcionalizada con anti-FHA donde se ven tres células de la cepa *B. pertussis* Tohama I. Las curvas de fuerza de retracción asociadas a cada una de las bacterias fueron analizadas para determinar la cantidad de eventos de adhesión existentes, su magnitud y la distancia a la cual ocurrieron. Para cada célula individual los histogramas de fuerza muestran dos subpoblaciones con máximos locales. En el caso de la célula B, esas subpoblaciones se encuentran alrededor de los valores más probables 200pN y de 400pN; en cambio las bacterias A y C presentan dos sub poblaciones alrededor de los valores más probables 150 y 300pN. Estos perfiles se encuentran en concordancia con la distribución de valores y fuerzas de adhesión encontradas en el análisis global de las bacterias estudiadas (Fig 8 A y B).

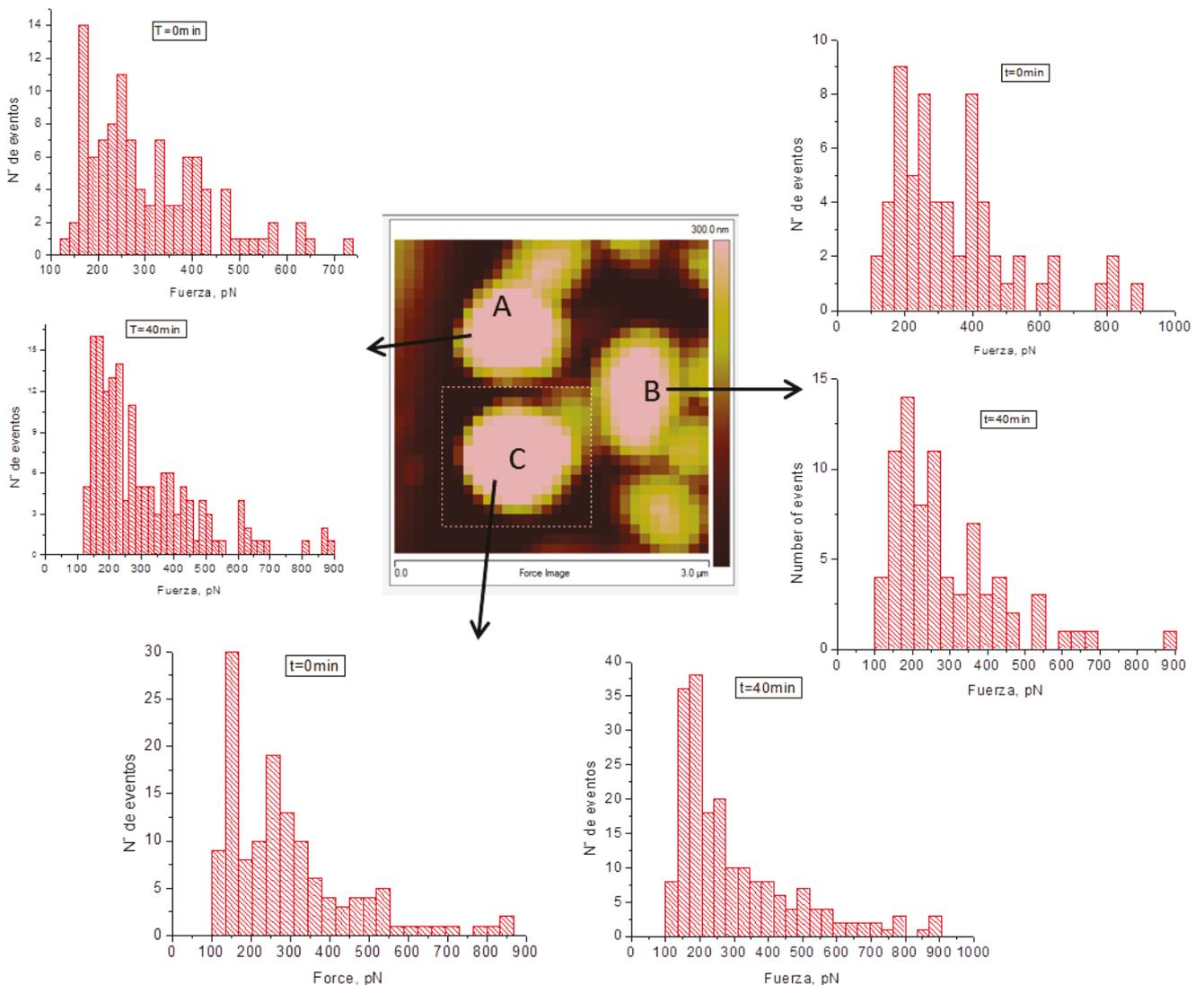


Figura 9- Imagen de FV de 32x32 píxeles, e histogramas de fuerza asociados a los eventos de interacción observados para tres células distintas de *B. pertussis* A, B y C

Otro análisis que se llevó a cabo fue la determinación de la cantidad de picos por curva, es decir, la cantidad de eventos de reconocimiento antígeno-anticuerpo que se produjeron en una misma curva de fuerzas. Los datos fueron graficados en un histograma luego de ser normalizados por el valor máximo de eventos. La normalización fue necesaria ya que debido a la deriva (*drift*) térmica del piezoeléctrico, y la deformación que pueden sufrir las células entre los dos barridos que se realizaron, el área de la imagen ocupada por la bacteria puede variar entre las dos imágenes de FV adquiridas. Los histogramas asociados a las diferentes bacterias y tiempos estudiados se pueden observar en la Figura 10. La cantidad máxima de picos por curva en el caso de la célula A para $t=0$ y $t=40$ min fue de 4 picos por curva, sin embargo la cantidad de eventos totales porcentuales aumentó de 49% a 73% en la segunda imagen ($t=40$ min). La célula B presentó un valor máximo de 3 picos por curva para $t=0$ los cuales disminuyeron a 2 picos por curva a los 40 min, mientras que la cantidad de eventos de reconocimiento porcentuales aumento de 40 a 48% desde el $t=0$ a $t=40$ min. La bacteria C resultó el caso más interesante ya que no solo presentó un aumento porcentual de 50 a 71% en los eventos de reconocimiento en la segunda imagen sino que también aumentó el valor máximo de picos por curva de 4 a 5. El análisis de la evolución temporal de los eventos de reconocimiento realizados con estas tres bacterias confirma que luego de la realización de un primer barrido con la punta funcionalizada aumenta la cantidad de eventos de reconocimiento en la superficie de *B. pertussis* Tohama I demostrando que el comportamiento global observado para la población total de células estudiadas (sección V.3.2.i) refleja el comportamiento individual de las células analizadas. De la misma manera, el análisis de la cantidad de picos por curva indica que la cantidad de eventos más frecuentes en las tres células en ambos tiempos de medida es 1, sugiriendo que, como se dijo anteriormente, el evento que más cantidad de veces se observa corresponde a la interacción de un anticuerpo con la proteína FHA.

Para corroborar que los eventos de reconocimiento que se detectaron fueran específicos de una interacción FHA-antiFHA, se realizó un nuevo experimento de bloqueo en el cual se incubaron las células de *B. pertussis* Tohama I adheridas al vidrio con una solución de anticuerpo purificado en PBS, durante 1h y luego de tres lavados con agua Milli-Q, se realizó el experimento de Mapeo de Reconocimiento Molecular. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11.A. Allí se puede observar que la cantidad de eventos de interacción encontrados en una única célula disminuyó aproximadamente a la mitad (de un promedio de

96 eventos por célula a 40) aunque el valor más frecuentemente observado siguió siendo 150pN. No se observan subpoblaciones en la distribución indicando que existe una menor interacción entre los anticuerpos de la punta y las proteínas en la superficie como consecuencia del bloqueo realizado. Este experimento indica que la naturaleza de los eventos medidos corresponde a la interacción específica del anticuerpo anti-FHA y la proteína FHA en la superficie de la célula.

Posteriormente se realizó otro ensayo control utilizando como muestra una cepa mutante para la expresión de la proteína FHA, la cepa BPGR4. La cantidad de eventos de interacción observados a través del análisis de las curvas de retracción fue muy baja (16 eventos, Figura 11.B) en comparación a la cantidad de eventos encontrados para la cepa salvaje (96 eventos por célula en promedio). Esta marcada disminución en los eventos de interacción, así como también la naturaleza aleatoria de los mismos demuestran la especificidad de la interacción que existe entre la punta funcionalizada con el anticuerpo y las proteínas FHA presentes en la superficie de las células salvaje.

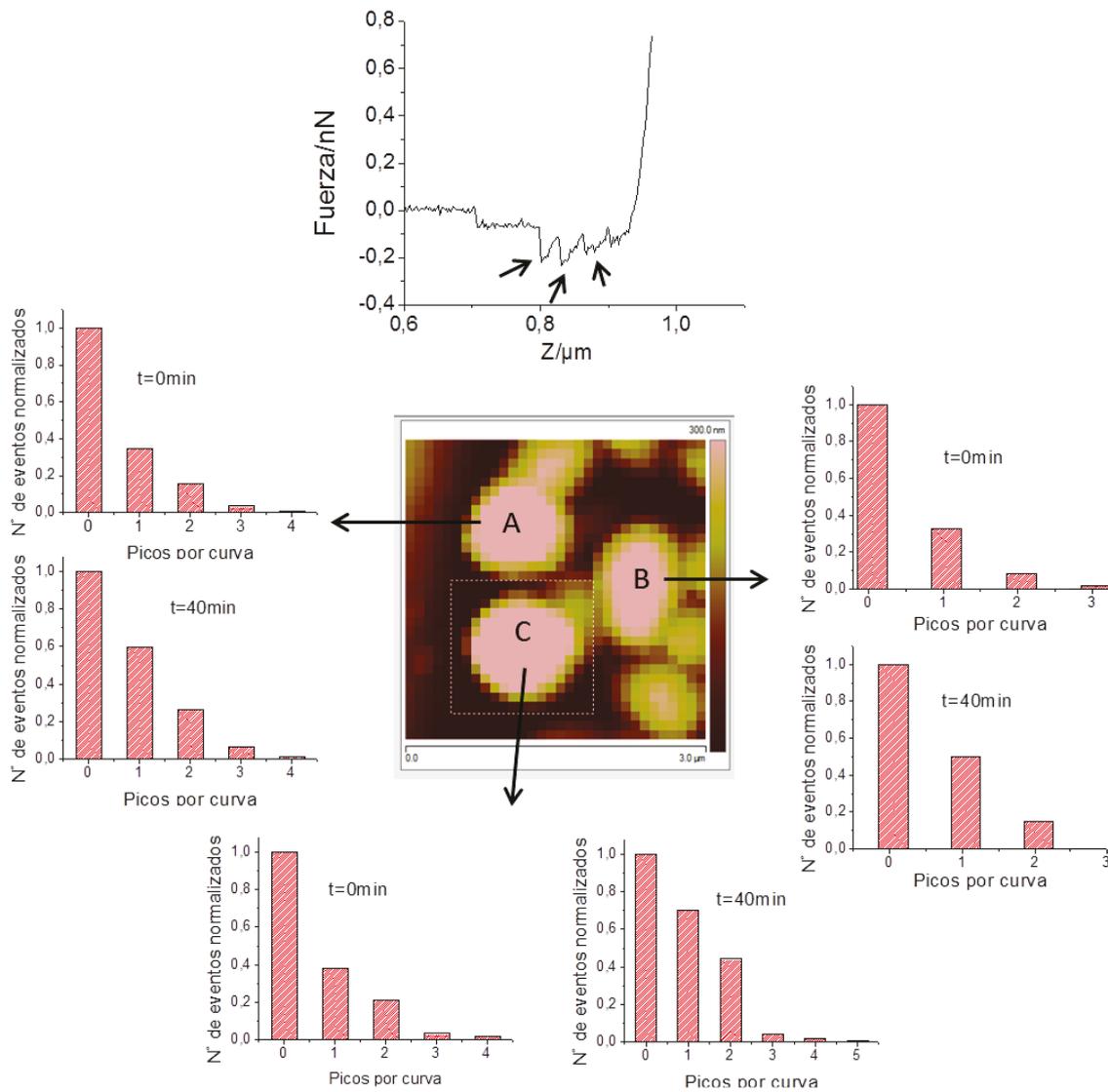


Figura 10- Histogramas correspondientes a los valores de cantidad de picos por curva (resaltadas en la curva que se muestra como ejemplo con flechas) obtenidos para cada una de las bacterias estudiadas a diferentes tiempos. t=0 y t=40 min. Se observa en todos los casos un aumento porcentual en la cantidad de eventos de reconocimiento en la segunda imagen de FV. En la curva de Fuerza vs desplazamiento que se muestra en el margen superior se muestra un ejemplo de cómo se determinó la cantidad de picos. En la curva graficada se observaron tres picos de interacción específicos para el par FHA-anti-FHA.

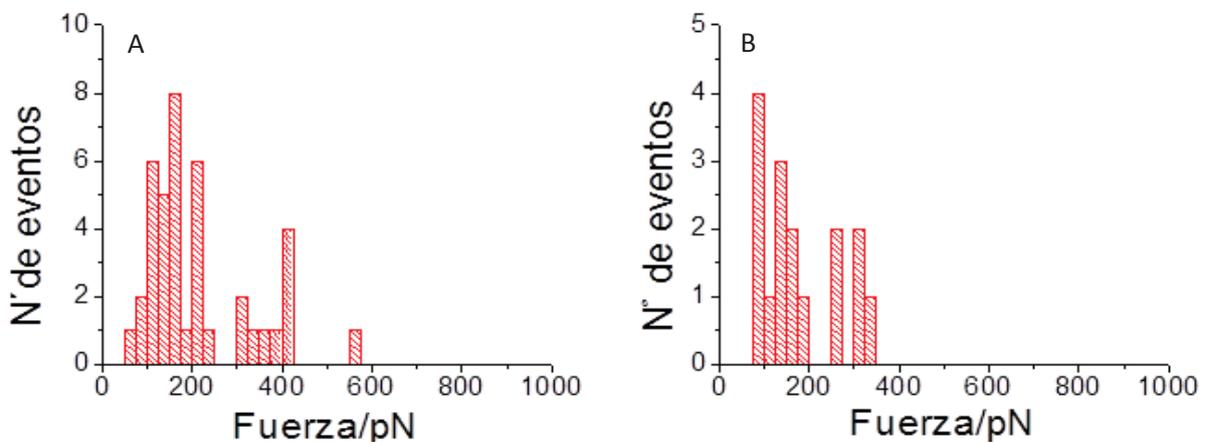


Figura 11. (A) Histograma de fuerzas de un experimento de bloqueo realizado sobre células de *B. pertussis* Tohama I donde se observa una marcada disminución en la cantidad de eventos de reconocimiento. (B) Histograma correspondiente a la interacción entre la punta funcionalizada y la superficie de una célula $\Delta fhab$ donde no se observan interacciones específicas.

V.3.2.iii Mapas de fuerza y elasticidad

El incremento en la cantidad de eventos de adhesión en la segunda imagen de FV que se encontró en la totalidad de las células estudiadas nos llevó a preguntarnos si ese aumento de la presencia de proteína FHA en la superficie de la célula se encontraba acompañado de una organización espacial específica. Es por esto que se graficaron los mapas de fuerza para cada bacteria a partir de la correlación entre el valor de fuerza de interacción de una curva y sus coordenadas espaciales x , y en la imagen de FV. Los mapas de fuerza para las células estudiadas se observan en la Figura 12. Como indica la escala de colores, los píxeles negros corresponden a valores nulos de interacción, y conforme se incrementa el valor de interacción, el color de los píxeles cambia de gris a blanco.

Los mapas de fuerza muestran un importante aumento de valores no nulos de adhesión en las tres células en el segundo barrido. Si bien es posible identificar diferencias en las distribuciones locales de los eventos no resulta sencillo definir dominios diferentes entre las imágenes correspondientes al tiempo 0 y tiempo 40min para las células A y B. En el caso particular de las células B y C, se observa una zona, identificada dentro de una línea roja, que corresponde a la zona de contacto entre las células donde existe un marcado aumento de los eventos de adhesión entre la primera y la segunda imagen de FV. Este resultado es muy interesante ya que, considerando la capacidad de la proteína FHA para generar interacciones con ella misma y promover uniones entre las células durante la maduración del *biofilm* (36), el aumento de la exposición de la proteína FHA en la zona de contacto entre dos células mostrado en el mapa de fuerzas de las células B y C estaría indicando que las proteínas se ubican en dicha zona luego del estímulo de interacción con el anticuerpo facilitando la unión entre células vecinas.

En el capítulo anterior (IV) se mostró que la proteína FHA no se expresaría aleatoriamente en la superficie bacteriana sino que formaría nanodominios y que su presencia en la envoltura estaría asociada a un aumento en la rigidez de la misma en bacterias de la cepa *B. pertussis* Tohama I (37). Por esta razón, decidimos analizar si la zona de contacto, donde se observó un aumento en la expresión de los eventos de adhesión presenta también un aumento local del módulo de Young. Para ello, se realizó el análisis de las curvas de aproximación y se calculó el módulo de elasticidad tal como se indicó en el capítulo IV. Los mapas construidos a partir de dicho análisis se observan en la Figura 13. Es importante destacar que los valores absolutos de módulo de Young calculados a partir de las curvas de aproximación

provenientes de los ensayos de Mapeo de Reconocimiento Molecular son marcadamente mayores que aquellos determinados en el capítulo IV. Este fenómeno responde a la diferencia en el recorrido en Z entre las curvas de fuerza. En el capítulo IV, el recorrido era de 500nm, valor apropiado para estudiar la respuesta mecánica de bacterias de manera que la indentación no supere el 30 % de la altura total de la muestra. En el caso de los experimentos de Mapeo de Reconocimiento Molecular se recomienda que el recorrido de la punta no sea inferior a 1 μ m ya que si lo fuera, se corre el riesgo de que las interacciones no se rompan y no se observen los eventos de reconocimiento en las distintas posiciones x; y de la muestra. En nuestro procedimiento experimental la cantidad de datos es constante tanto en el recorrido de 500 nm como de 1 μ m, por lo cual el ajuste del comportamiento no lineal del primer tramo de la curva de aproximación punta-muestra necesario para determinar el módulo de Young de la envoltura celular resulta fuertemente afectado por la componente lineal que abarca la mayor cantidad de datos en el caso del recorrido más extenso. Es por esta razón que los resultados de módulo de Young calculados alcanzan valores de hasta 2MPa en lugar de 1 MPa en los experimentos de Mapeo de Reconocimiento Molecular donde la longitud total del recorrido tanto de aproximación como de retracción en Z de la curva de fuerzas es de 1 μ m. No obstante, considerando que este fenómeno se observa en todas las curvas de fuerza realizadas, se puede analizar un comportamiento relativo de la rigidez y en ese sentido, resulta claro que en la zona de contacto entre la célula B y C, en la segunda imagen de FV, aparecen valores que indican una mayor rigidez, acompañando el incremento en la aparición de nuevos eventos de adhesión.

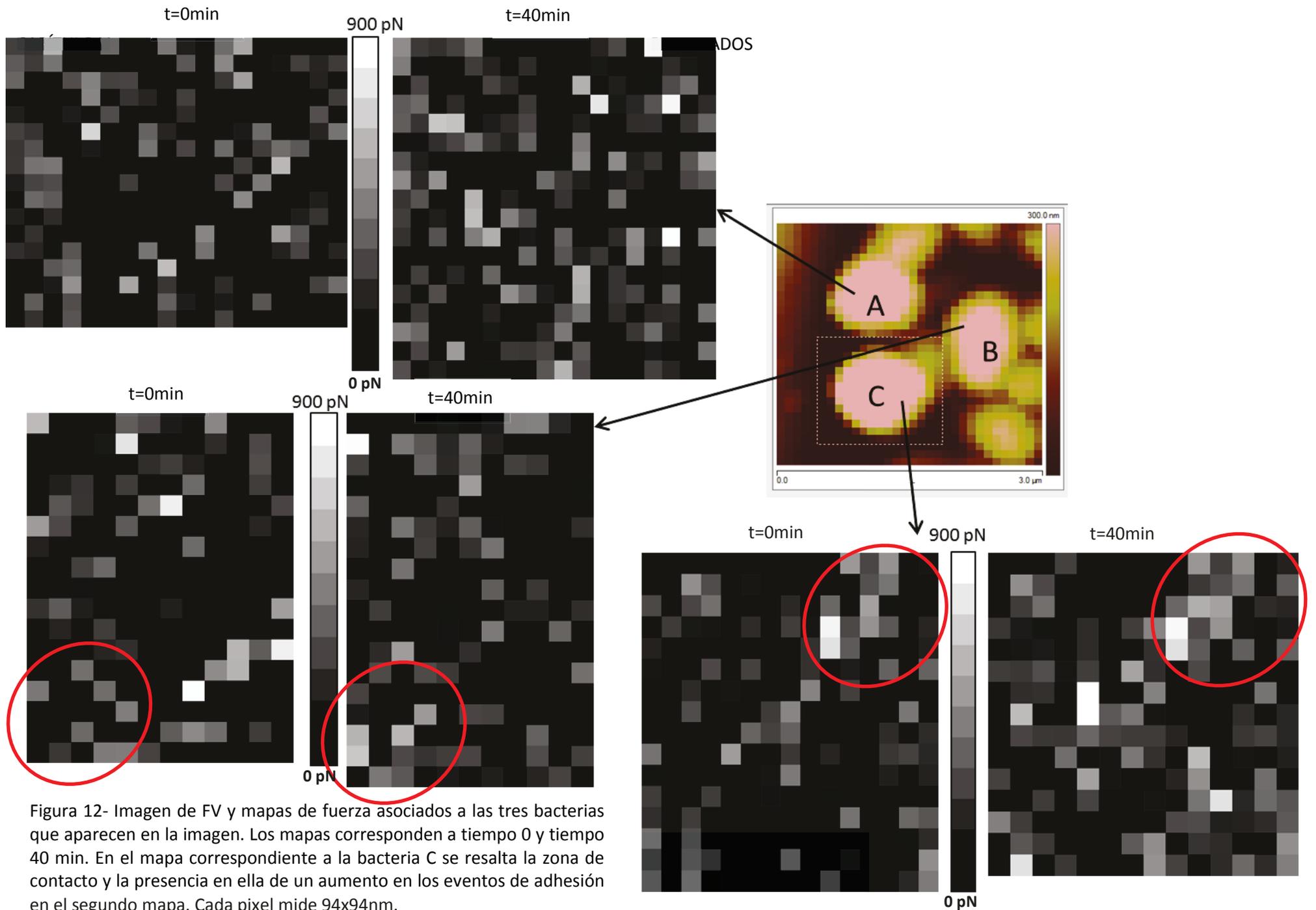


Figura 12- Imagen de FV y mapas de fuerza asociados a las tres bacterias que aparecen en la imagen. Los mapas corresponden a tiempo 0 y tiempo 40 min. En el mapa correspondiente a la bacteria C se resalta la zona de contacto y la presencia en ella de un aumento en los eventos de adhesión en el segundo mapa. Cada pixel mide 94x94nm.

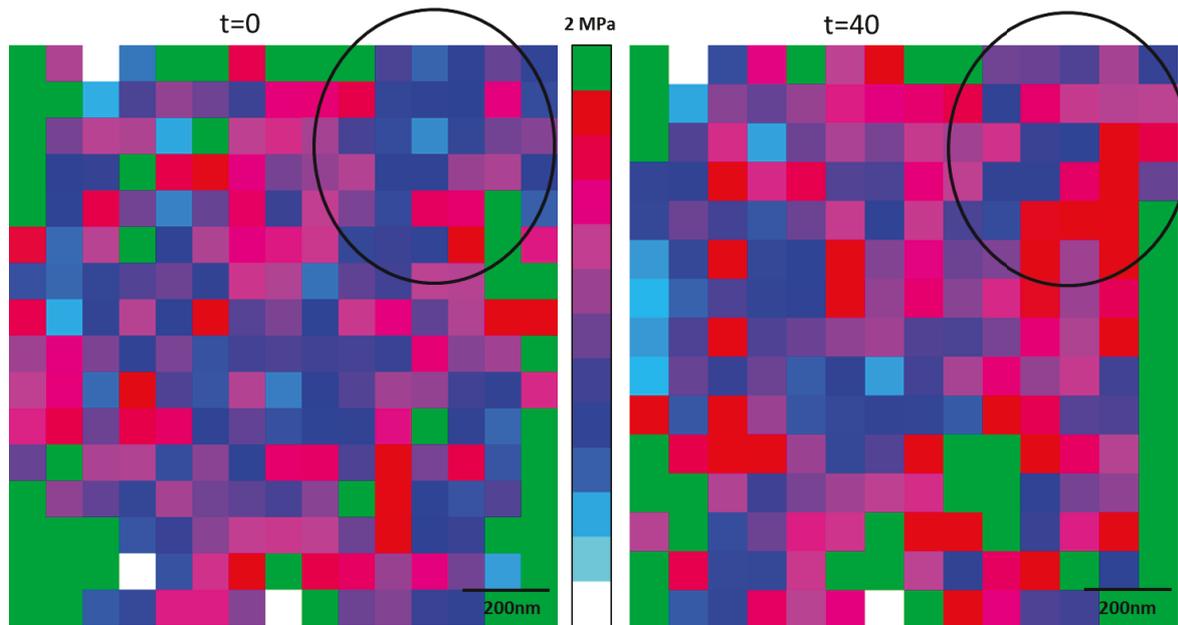


Figura 13. Mapas de elasticidad correspondientes a la bacteria C de la Figura 12 donde se observa dentro del círculo negro un aumento en la rigidez de la envoltura celular, en el mapa correspondiente a la imagen de 40 min., coincidente con el aumento de los eventos de adhesión detectados en el segundo barrido realizado con la punta funcionalizada.

V.3.2.iv Análisis de *clusters* y vecinos próximos

Como se comentó anteriormente, los mapas de fuerza mostraron para las células estudiadas un aumento en la cantidad de eventos de reconocimiento al realizar la segunda imagen de FV. No obstante, a simple vista resulta difícil establecer si los nuevos eventos de adhesión se encuentran organizados espacialmente o si su distribución es al azar. Por esta razón realizamos un análisis de *clusters* comparando la organización de los eventos de adhesión en las primeras ($t=0$ min) y segundas imágenes ($t=40$ min) de FV para las tres células mostradas en la Figura 12. El análisis se realizó utilizando una clasificación binarizada de los datos (nulos y no nulos), donde cada valor no nulo de fuerza de interacción fue denominado *cluster*. Se determinó en cada mapa de fuerza la cantidad de *clusters* conectados entre sí, permitiendo uniones laterales y diagonales. Los resultados del análisis se observan en la Figura 14 y muestran que en todos los casos hubo una disminución en la cantidad de *clusters* en el segundo mapa de fuerzas, es decir a tiempo $t=40$ min. En la célula A, se determinó una reducción a la mitad (de 16 a 8), la bacteria B redujo su cantidad de *clusters* de 10 a 7 y la bacteria C fue la que mayor reducción presentó, de 14 a tan solo 3 *clusters* en el segundo mapa de fuerzas. Adicionalmente se realizó un análisis de vecinos próximos observándose que para las tres células se produjo un aumento en la cantidad promedio de vecinos

primeros y segundos para cada valor no nulo de fuerza en la segunda imagen de FV. Estos resultados nos indican que luego de mapear una bacteria de la cepa *B. pertussis* Tohama I con una punta funcionalizada con un anticuerpo anti-FHA, la cantidad de eventos de reconocimiento, que podría traducirse como cantidad de proteínas presentes en la superficie celular, aumenta entre un 10 y un 24% y que también se asocian formando *clusters* de mayor tamaño.

Estos resultados nos llevaron a preguntarnos por la naturaleza del estímulo que genera la reorganización de proteínas que se observa en la superficie de las bacterias. Si bien los experimentos de Mapeo de Reconocimiento Molecular demostraron un aumento de la presencia de eventos de reconocimiento en la zona de la superficie que está siendo recorrida por la punta funcionalizada, el estímulo puede ser de dos tipos: por un lado se trataría del establecimiento de una fuerza específica que involucra el estiramiento producido por el anticuerpo presente en la punta que interacciona con dominios específicos de la proteína FHA y por otra parte se puede considerar una acción estrictamente mecánica, si consideramos la presión o la deformación que realiza la punta sobre la muestra. Para tratar de resolver cuál de estas alternativas es aplicable al sistema en estudio, realizamos dos imágenes de FV consecutivas sobre bacterias de la cepa *B. pertussis* Tohama I utilizando una punta de Si_3N_4 sin funcionalizar y analizamos las curvas de aproximación para determinar si se generaban zonas de diferente rigidez entre una y otra imagen. Como ya se discutió anteriormente, la presencia de la proteína FHA en la superficie se encontraría asociada a dominios rígidos de la envoltura celular (37). El análisis de las imágenes adquiridas indicó que los valores de módulo de Young no variaron entre $t=0$ y $t=40$ min (ver Figura 15). Este resultado nos permite inferir que la reorganización de FHA en la superficie durante los experimentos de Mapeo de Reconocimiento Molecular respondería exclusivamente al estiramiento inducido por la interacción específica con el anticuerpo presente en la punta. Este fenómeno es conocido como reordenamiento inducido por fuerzas (*Force -induced reorganization*) y se encuentra ampliamente descrito en los mecanismos de mecanotransducción de células eucariotas que derivan en la formación de *clusters* moleculares en la membrana celular (38-40) o en el aumento de la adhesión bacteriana mediada por adhesinas de tipo fimbrias en condiciones de *shear* hidromecánico. (continúa pag.173)

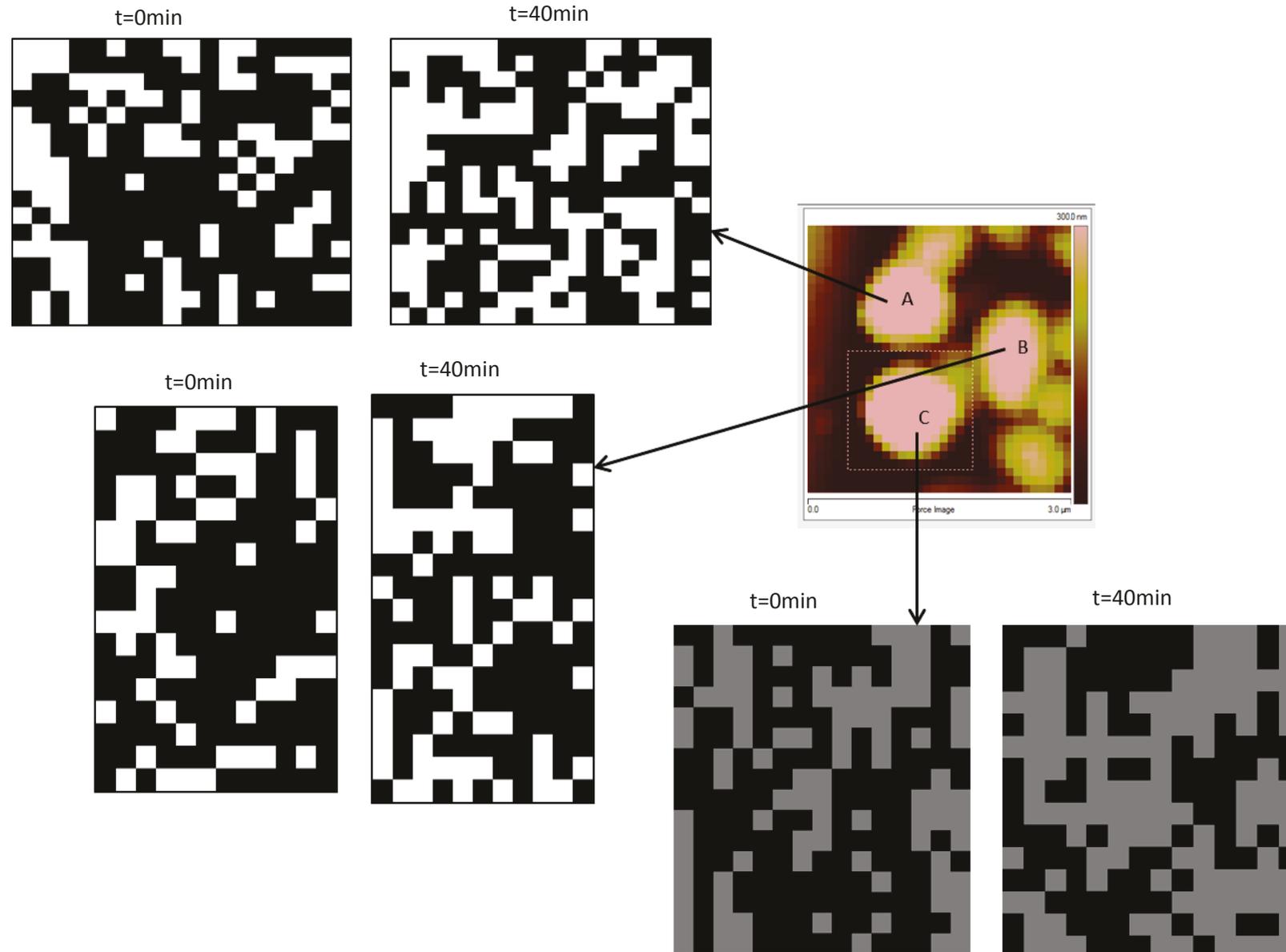


Figura 14. Análisis de *clusters* realizado para cada bacteria presente en la imagen de FV, para t=0 y t =40 min. Los píxeles blancos corresponden a valores no nulos de interacción. A t=40 min para las tres bacterias, la cantidad de *clusters* encontrados fue menor, sugiriendo una organización en dominios de las proteínas FHA en la superficie luego de un primer barrido con la punta funcionalizada. Las dimensiones de cada pixel son de 94x94nm.

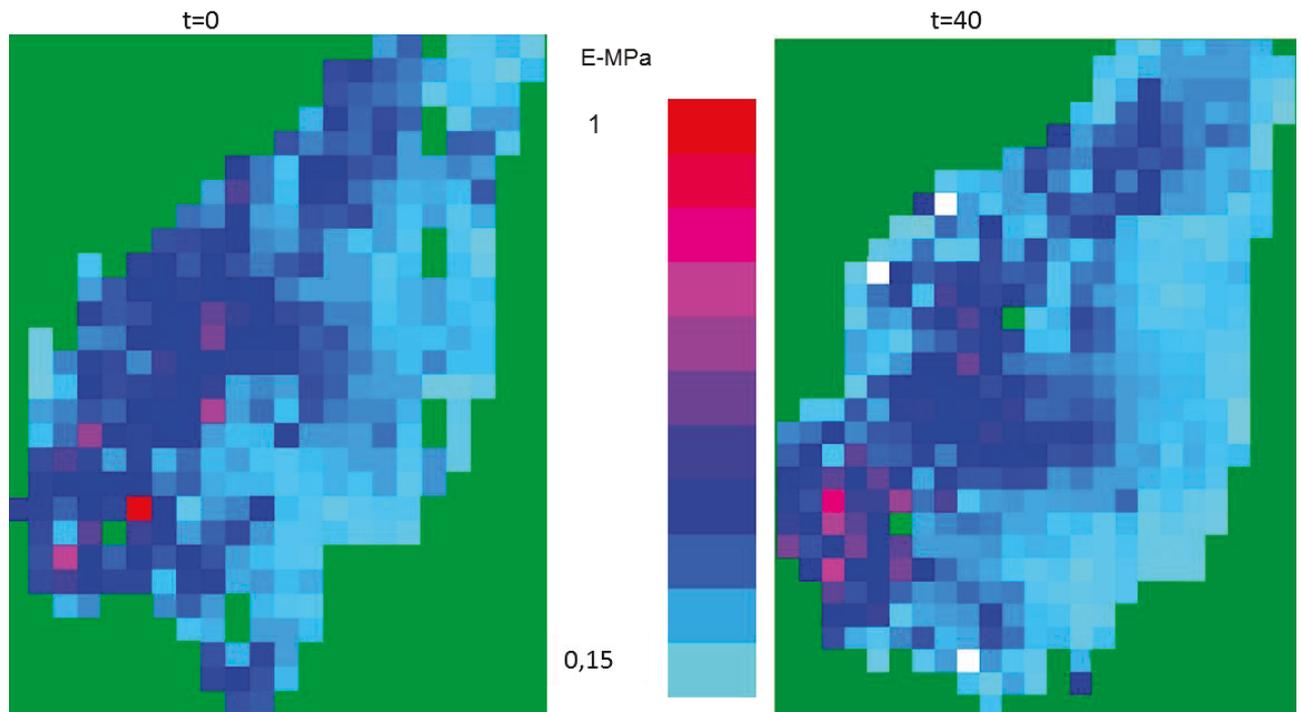


Figura 15. Mapas de elasticidad realizados a partir de los valores de módulo de Young determinados para una misma célula de *B. pertussis* Tohama I a $t=0$ y $t=40$ min utilizando una punta de Si_3N_4 sin funcionalizar. Se puede observar una zona de mayor rigidez aunque no varía su localización o magnitud entre los dos mapas sugiriendo que el estímulo mecánico no induciría el aumento de la presencia de la adhesina FHA en la superficie.

Una vez concluido que la presencia del anticuerpo específico en la punta es necesaria para observar el aumento de los eventos de reconocimiento en el segundo mapeo, nos preguntamos si dichos nuevos eventos corresponderían a un aumento de la cantidad de proteínas FHA en la zona analizada generadas por síntesis entre el primer y segundo barrido o por difusión desde zonas laterales no mapeadas en el primer barrido o; si el aumento en los eventos de reconocimiento se debe a un cambio de conformación de las mismas proteínas expuestas originalmente como consecuencia del estiramiento inducido por la fuerza aplicada (interacción FHA-anticuerpo) permitiendo reconocer sitios antigénicos nuevos expuestos en el segundo mapeo. Para contestar estas preguntas se realizó un experimento de Espectroscopia de Fuerzas utilizando *cantilevers* funcionalizados con anticuerpos para realizar el mapeo de células previamente inactivadas por calor. De esta manera, al inactivar el metabolismo se descartan fenómenos de síntesis o difusión. Se analizaron tres bacterias individuales. Los resultados obtenidos en estos ensayos no difirieron de los resultados obtenidos utilizando células vivas: se registró un aumento en la cantidad de sitios de reconocimiento en el segundo mapeo al igual que una reducción de la

cantidad de *clusters* (Tabla 1). Estas observaciones indicarían que el fenómeno de aumento de los sitios de reconocimiento no estaría asociado a la síntesis de nuevas proteínas FHA o de su difusión desde zonas linderas sino que probablemente el estiramiento aplicado produzca cambios conformacionales en las moléculas que le permitan interactuar con sitios homólogos de otras proteínas FHA (posiblemente a través de la exposición de dominios de repetición en tándem) en una primer instancia para luego permitir la interacción con otras moléculas de FHA vecinas generando dominios mayores de adhesinas. La longitud de la proteína (50nm) le confiere una gran capacidad rotacional que le brindaría la libertad de movimiento necesaria para tales interacciones. Este fenómeno también ha sido observado y descrito por Alsteens y col. para células de la levadura *Candida albicans* (41)

Tabla 1-Porcentaje de eventos de reconocimiento en el segundo mapeo y evolución de la cantidad de *clusters* en bacterias muertas por calor.

	% de incremento de los sitios de reconocimiento en el segundo mapeo	Cantidad de <i>clusters</i> t=0 min	Cantidad de <i>clusters</i> t=40 min
Célula I	15	22	6
Célula II	23	5	1
Célula III	12	9	8

V.4 DISCUSIÓN

La utilización de la Microscopía de Fuerza Atómica para el estudio de la presencia y distribución de antígenos y factores de virulencia en la superficie de microorganismos patógenos abre la puerta a un nuevo campo de investigación sobre los mecanismos moleculares que intervienen en su patogenicidad. La gran ventaja de esta técnica es que brinda la posibilidad de obtener resultados con resolución nanométrica sin modificar las muestras y manteniéndolas en condiciones fisiológicas. Los resultados que se presentan en este capítulo muestran por primera vez la realización de experimentos de Mapeo de Reconocimiento Molecular en la superficie de *B. pertussis*. En particular se puso a punto un protocolo de funcionalización de puntas de MFA con anticuerpos específicos y a través de la realización de varios controles se estableció la especificidad de la interacción. La uniformidad en los histogramas de fuerza y de distancia obtenidos para los dos tiempos de medida, sumado a los controles de bloqueo indica un reconocimiento altamente específico tanto para la proteína purificada como para la proteína inmersa en una matriz compleja como la de la superficie bacteriana. El valor más probable de adhesión para el par antígeno-anticuerpo en la superficie de una célula viva fue de 150pN, un valor característico para interacciones antígeno-anticuerpo (42, 43), el cual es coincidente con el valor de interacción más probable resultante de los ensayos de Espectroscopia de Fuerzas de Moléculas Únicas utilizando como muestra la proteína FHA purificada y depositada sobre mica. La existencia de máximos locales presentes en la distribución de eventos de reconocimiento cuyas magnitudes son múltiplos del valor de interacción encontrado para un par antígeno-anticuerpo evidencia la interacción de varios pares moleculares rompiéndose de manera conjunta, fenómeno característico de este tipo de ensayos debido a la existencia de más de una molécula de anticuerpo presente en la punta funcionalizada. El análisis de *clusters*, al igual que el análisis de primeros y segundos vecinos demostraron que luego de recorrer la superficie de una bacteria con una punta modificada con un anticuerpo específico para el reconocimiento del antígeno FHA, se estimula la reorganización de la proteína en la superficie al igual que un aumento en su densidad aparente. Nuestros ensayos indican que esta reorganización no sería consecuencia de un estímulo mecánico ejercido por la punta del *cantilever* interaccionando de manera continua con la célula, como tampoco de un proceso de síntesis o difusión de las proteínas en la membrana externa debido a que el

comportamiento de células muertas fue el mismo que el observado para bacterias vivas. El fenómeno observado podría ser consecuencia del reconocimiento químico específico entre los pares ligando-receptor sumado a un cambio de conformación de la adhesina FHA inducido por la fuerza de estiramiento aplicada que le permitiría interactuar con proteínas vecinas y de esta manera generar una reorganización en dominios mayores. Estos resultados coinciden con el trabajo publicado por Lecuyer y col (44) donde se menciona que el estrés mecánico podría inducir una deformación física o una respuesta biológica en bacterias del género *Pseudomonas* (modificaciones químicas superficiales, aumento de densidad de sitios de unión) resultantes en un aumento de las uniones entre la célula y la superficie. Un fenómeno similar ha sido observado por Alsteens y col. para *Candida albicans* (41), donde, realizando ensayos similares a los descritos en este capítulo observaron que el estímulo de estiramiento de la adhesina amiloidea Als utilizando un anticuerpo específico produce el estiramiento de las adhesinas, desplegando dominios de homo-reconocimiento que se encontraban ocultos y que promueven la interacción con más proteínas Als generando así un núcleo de agregación que magnifica la fuerza de interacción.

Como se ha reportado, uno de los mecanismos más importantes en la colonización e infección por parte de los microorganismos es la adhesión. Como se mencionó en el Capítulo IV, la proteína FHA es la principal adhesina de *Bordetella pertussis* (45, 46), la cual posee al menos tres dominios de reconocimiento para la adhesión a células del hospedador tal como se comentó en el Capítulo I: i) es mediadora de la unión a las células del epitelio respiratorio o matrices extracelulares a través de su dominio de reconocimiento de heparán sulfatos, ii) a través de su dominio RGD permite la adhesión a macrófagos, monocitos y leucocitos y, iii) a través de su dominio tipo lectina es mediadora de la unión a células no ciliadas del epitelio respiratorio (47). De esta manera, un cambio conformacional producido como consecuencia de un estiramiento mediado por una interacción específica que generase una reorganización de las adhesinas en dominios de adhesión promovería un anclaje más fuerte a la superficie a colonizar y consistiría en una ventaja adaptativa muy importante en ambientes de *shear* y estrés mecánico como lo constituyen los epitelios respiratorios. Hasta nuestro conocimiento, es la primera vez que se describe para una bacteria la dinámica de reorganización de una proteína en la superficie de una célula individual con resolución espacial en el orden de los nanómetros. Si bien algunos grupos han demostrado la existencia de una organización de las adhesinas en nanodominios nunca se ha reportado una dinámica espacial en tiempo real

(48, 49). La posibilidad de generar una reorganización espacial de adhesinas como consecuencia de la aplicación de una fuerza a través de un reconocimiento específico podría constituirse en una hipótesis sobre el mecanismo sensor que estimula a las bacterias a pasar de una adhesión reversible a una adhesión irreversible sumada a las ya existentes que se refieren a condiciones de estrés nutricional o características fisicoquímicas de las superficies (50, 51).

V 5 CONCLUSIONES

Los resultados expuestos en este capítulo y su análisis permiten arribar a las siguientes conclusiones:

- i)* Se logró con éxito la funcionalización de las puntas del *cantilevers* de MFA con moléculas del anticuerpo IgG anti-FHA utilizando la técnica de fijación con glutaraldehído.
- ii)* Se verificó la interacción FHA-anti-FHA y se calculó la fuerza promedio de interacción entre el anticuerpo y el antígeno depositado sobre mica cuyo valor más probable fue 150pN.
- iii)* Se logró identificar en la superficie de bacterias individuales de la cepa *B. pertussis* Tohama I la presencia de la proteína FHA utilizando una punta funcionalizada con el anticuerpo anti-FHA. El valor promedio de interacción anticuerpo-antígeno fue también de 150pN.
- iv)* Se observó que existe un aumento en la presencia de la proteína FHA en la superficie de células bacterianas individuales luego de un primer mapeo con la punta funcionalizada y que la densidad de FHA aumenta entre un 10 y un 24% y que existe un reordenamiento en dominios de FHA mayores y que tal reordenamiento no involucraría la presencia de nuevas proteínas sintetizadas o difundidas dentro de la membrana.
- v)* La presencia de *clusters* moleculares de adhesinas le conferirían a la bacteria la capacidad de generar interacciones focales de mayor magnitud valiéndose de la sinergia de las interacciones individuales que participan en ella.

V 6 BIBLIOGRAFIA

1. Lee, C. K., Wang, Y. M., Huang, L. S., and Lin, S. (2007) Atomic force microscopy: determination of unbinding force, off rate and energy barrier for protein-ligand interaction, *Micron* 38, 446-461.
2. Dufrene, Y. F. (2003) Recent progress in the application of atomic force microscopy imaging and force spectroscopy to microbiology, *Curr Opin Microbiol* 6, 317-323.
3. Heinisch, J. J., Lipke, P. N., Beaussart, A., El Kirat Chatel, S., Dupres, V., Alsteens, D., and Dufrene, Y. F. (2012) Atomic force microscopy - looking at mechanosensors on the cell surface, *J Cell Sci* 125, 4189-4195.
4. Florin, E. L., Moy, V. T., and Gaub, H. E. (1994) Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs, *Science* 264, 415-417.
5. Lee, G. U., Kidwell, D. A., and Colton, R. J. (1994) Sensing Discrete Streptavidin-Biotin interactions with Atomic Force Microscopy, *Langmuir* 10, 354-357.
6. Wong J., C. A., Moy VT. (1999) Direct force measurements of the streptavidin-biotin interactions, *Biomol. Eng.* 16, 45-55.
7. Berry, M., McMaster, T. J., Corfield, A. P., and Miles, M. J. (2001) Exploring the molecular adhesion of ocular mucins, *Biomacromolecules* 2, 498-503.
8. Cai, X. E., and Yang, J. (2003) The binding potential between the cholera toxin B-oligomer and its receptor, *Biochemistry* 42, 4028-4034.
9. Ratto, T. V., Langry, K. C., Rudd, R. E., Balhorn, R. L., Allen, M. J., and McElfresh, M. W. (2004) Force spectroscopy of the double-tethered concanavalin-A mannose bond, *Biophys J* 86, 2430-2437.
10. Dammer, U., Hegner, M., Anselmetti, D., Wagner, P., Dreier, M., Huber, W., and Guntherodt, H. J. (1996) Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy, *Biophys J* 70, 2437-2441.
11. Schwesinger, F., Ros, R., Strunz, T., Anselmetti, D., Guntherodt, H. J., Honegger, A., Jermutus, L., Tiefenauer, L., and Pluckthun, A. (2000) Unbinding forces of single antibody-antigen complexes correlate with their thermal dissociation rates, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9972-9977.
12. Hinterdorfer, P., Baumgartner, W., Gruber, H. J., Schilcher, K., and Schindler, H. (1996) Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3477-3481.
13. Allen, S., Chen, X., Davies, J., Davies, M. C., Dawkes, A. C., Edwards, J. C., Roberts, C. J., Sefton, J., Tendler, S. J., and Williams, P. M. (1997) Detection of antigen-antibody binding events with the atomic force microscope, *Biochemistry* 36, 7457-7463.
14. Strunz, T., Oroszlan, K., Schumakovitch, I., Guntherodt, H., and Hegner, M. (2000) Model energy landscapes and the force-induced dissociation of ligand-receptor bonds, *Biophys J* 79, 1206-1212.
15. Dettmann, W., Grandbois, M., Andre, S., Benoit, M., Wehle, A. K., Kaltner, H., Gabius, H. J., and Gaub, H. E. (2000) Differences in zero-force and force-driven kinetics of ligand dissociation from beta-galactoside-specific proteins (plant and animal lectins, immunoglobulin G) monitored by plasmon resonance and dynamic single molecule force microscopy, *Arch Biochem Biophys* 383, 157-170.
16. Evans, E., and Ritchie, K. (1997) Dynamic strength of molecular adhesion bonds, *Biophys J* 72, 1541-1555.
17. Lo, Y.-S., Zhu, Y.-J., and Beebe, T. P. (2001) Loading-Rate Dependence of Individual Ligand-Receptor Bond-Rupture Forces Studied by Atomic Force Microscopy, *Langmuir* 17, 3741-3748.
18. Giesbers, M., Kleijn, J. M., and Cohen Stuart, M. A. (2002) Interactions between acid- and base-functionalized surfaces, *J Colloid Interface Sci* 252, 138-148.

19. Noy, A., Vezenov, D. V., and Lieber, C. M. (1997) Chemical force microscopy, *Annu. Rev. Mater. Sci.* 27, 381-421.
20. Colburn, T. J., and Leggett, G. J. (2007) Influence of solvent environment and tip chemistry on the contact mechanics of tip-sample interactions in friction force microscopy of self-assembled monolayers of mercaptoundecanoic Acid and dodecanethiol, *Langmuir* 23, 4959-4964.
21. Muller, D. J., Helenius, J., Alsteens, D., and Dufrene, Y. F. (2009) Force probing surfaces of living cells to molecular resolution, *Nat Chem Biol* 5, 383-390.
22. Ivanov, I. E., Kintz, E. N., Porter, L. A., Goldberg, J. B., Burnham, N. A., and Camesano, T. A. (2011) Relating the physical properties of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides to virulence by atomic force microscopy, *J Bacteriol* 193, 1259-1266.
23. Tsukruk, V. V., and Bliznyuk, V. N. (1998) Adhesive and Friction Forces between Chemically Modified Silicon and Silicon Nitride Surfaces, *Langmuir* 14, 446-455.
24. Senden, T. J., and Drummond, C. J. (1995) Surface chemistry and tip-sample interactions in atomic force microscopy, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 94, 29-51.
25. Gaboriaud, F., and Dufrene, Y. F. (2007) Atomic force microscopy of microbial cells: application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces, *Colloids Surf B Biointerfaces* 54, 10-19.
26. Willemsen, O. H., Snel, M. M., van der Werf, K. O., de Grooth, B. G., Greve, J., Hinterdorfer, P., Gruber, H. J., Schindler, H., van Kooyk, Y., and Figdor, C. G. (1998) Simultaneous height and adhesion imaging of antibody-antigen interactions by atomic force microscopy, *Biophys J* 75, 2220-2228.
27. Moreno, N., Chevalier, M., Ronzon, F., Manin, C., Dupuy, M., Krell, T., and Rieu, J. P. (2011) Unbinding forces of single pertussis toxin-antibody complexes measured by atomic force spectroscopy correlate with their dissociation rates determined by surface plasmon resonance, *J Mol Recognit* 24, 1105-1114.
28. Hinterdorfer, P., Oijen, Antonie (Eds.). (2009) Handbook of Single-Molecule Biophysics, *Biophysics and Biological Physics*.
29. Kajava, A. V., Cheng, N., Cleaver, R., Kessel, M., Simon, M. N., Willery, E., Jacob-Dubuisson, F., Locht, C., and Steven, A. C. (2001) Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins, *Mol. Microbiol.* 42, 279-292.
30. Ido, S., Kimiya, H., Kobayashi, K., Kominami, H., Matsushige, K., and Yamada, H. (2014) Immunoactive two-dimensional self-assembly of monoclonal antibodies in aqueous solution revealed by atomic force microscopy, *Nat Mater* 13, 264-270.
31. Cannistraro, A. R. B. a. S., (Ed.) (2012) Dynamic Force Spectroscopy and Biomolecular Recognition, CRC Press Taylor and Francis Group Boca Raton.
32. Arfsten, J., Leupold, S., Bradtmoller, C., Kampen, I., and Kwade, A. (2010) Atomic force microscopy studies on the nanomechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*, *Colloids Surf B Biointerfaces* 79, 284-290.
33. Hoh, J. H., and Schoenenberger, C. A. (1994) Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy, *J Cell Sci* 107 (Pt 5), 1105-1114.
34. Silhavy, T. J., Kahne, D., and Walker, S. (2010) The bacterial cell envelope, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000414.
35. Arturo M. Baro , R. G. R., (Ed.) (2012) *Atomic Force Microscopy in Liquid: Biological Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
36. Serra, D. O., Conover, M. S., Arnal, L., Sloan, G. P., Rodriguez, M. E., Yantorno, O. M., and Deora, R. (2011) FHA-Mediated Cell-Substrate and Cell-Cell Adhesions Are Critical for *Bordetella pertussis* Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and in the Mouse Nose and the Trachea, *PLoS One* 6, e28811.

37. Arnal, L., Serra, D. O., Cattelan, N., Castez, M. F., Vazquez, L., Salvarezza, R. C., Yantorno, O. M., and Vela, M. E. (2012) Adhesin contribution to nanomechanical properties of the virulent *Bordetella pertussis* envelope, *Langmuir* 28, 7461-7469.
38. Bershadsky AD, K. M., Gieger B. (2006) Adhesion-mediated mechanosensitivity: A time to experiment, and a time to theorize, *Curr Opin Cell Biol* 18, 472-481.
39. Smith AS, S. K., Goennenwein S, Seifert U, Sackmann E. (2008) Force-induced growth of adhesion domains is controlled by receptor mobility, *roc Natl Acad Sci USA* 105, 6906-6911.
40. Roca-Cusachs P, G. N., Del Rio A, Sheetz MP. (2009) Clustering of alpha(5) beta(1) integrins determines adhesion strength whereas alpha(v)beta(3) and talin enable mechanotransduction, *Proc Natl Acad Sci USA* 106.
41. Alsteens, D., Garcia, M. C., Lipke, P. N., and Dufrêne, Y. F. (2010) Force-induced formation and propagation of adhesion nanodomains in living fungal cells, *PNAS* 107, 20744-20749.
42. Vadillo-Rodriguez, V., Beveridge, T. J., and Dutcher, J. R. (2008) Surface viscoelasticity of individual gram-negative bacterial cells measured using atomic force microscopy, *J Bacteriol* 190, 4225-4232.
43. Gaboriaud, F., Parcha, B. S., Gee, M. L., Holden, J. A., and Strugnell, R. A. (2008) Spatially resolved force spectroscopy of bacterial surfaces using force-volume imaging, *Colloids Surf B Biointerfaces* 62, 206-213.
44. Sigolene Lecuyer, R. R., Yi Shen, Alison Forsyth, Hera Vlamakis, Roberto Kolter, and Howard A. Stone. (2011) Shear Stress Increases the Residence Time of Adhesion of *Pseudomonas Aeruginosa*, *Biophys. J.* 100, 341-350.
45. Park, B. J., and Abu-Lail, N. I. (2010) Variations in the Nanomechanical Properties of Virulent and Avirulent *Listeria monocytogenes*, *Soft Matter* 6, 3898-3909.
46. Touhami, A., Jericho, M. H., and Beveridge, T. J. (2004) Atomic force microscopy of cell growth and division in *Staphylococcus aureus*, *J Bacteriol* 186, 3286-3295.
47. Locht, C., Berlin, P., Menozzi, F. D., and Renault†, G. (1993) The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesin produced by virulent *Bordetella* spp, *Mol. Microbiol.* 9, 653-660.
48. Dupres, V., Menozzi, F. D., Locht, C., Clare, B. H., Abbott, N. L., Cuenot, S., Bompard, C., Raze, D., and Dufrene, Y. F. (2005) Nanoscale mapping and functional analysis of individual adhesins on living bacteria, *Nat Meth* 2, 515-520.
49. El-Kirat-Chatel, S., Beaussart, A., Boyd, C. D., O'Toole, G. A., and Dufrene, Y. F. (2014) Single-cell and single-molecule analysis deciphers the localization, adhesion, and mechanics of the biofilm adhesin LapA, *ACS Chem Biol* 9, 485-494.
50. Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., and Penades, J. R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation, *J Bacteriol* 183, 2888-2896.
51. Pringle, J. H., and Fletcher, M. (1986) Influence of substratum hydration and adsorbed macromolecules on bacterial attachment to surfaces, *Appl Environ Microbiol* 51, 1321-1325.

VI

Conclusiones Generales y Perspectivas

El presente trabajo de Tesis Doctoral pretendió abordar la temática del desarrollo en *biofilm* por parte de aislados clínicos de *Bordetella pertussis* utilizando diferentes diseños experimentales. A través de técnicas moleculares como la proteómica comparativa y la expresión relativa de genes se logró identificar un aumento en la expresión de factores de virulencia en un aislado clínico de *B. pertussis* en comparación con la cepa *B. pertussis* Tohama I. Muchos de estos factores de virulencia, sobre-expresados en el aislado clínico estudiado, corresponden a importantes adhesinas, que han sido reportadas como necesarias para el desarrollo de las etapas de adhesión y maduración del *biofilm* de la cepa de referencia de *B. pertussis*. Si bien no se han podido identificar polimorfismos en la secuencia de genes estructurales y regulatorios que permitan explicar el patrón de expresión detectado en la cepa clínica, el análisis realizado conlleva un

avance importante en la búsqueda de los mecanismos de adaptación a nivel de crecimiento adherido a superficies de las cepas circulantes en nuestra región. En este trabajo se demostró que todas las cepas aisladas de pacientes infectados poseen una mayor capacidad de formación de *biofilm* comparadas con la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I, creciendo en las mismas condiciones experimentales. Esta respuesta adaptativa de estos aislados circulantes a más de 50 años de vacunación sistemática en nuestro país, podría favorecer la persistencia del patógeno en el hospedador. Los mecanismos regulatorios determinantes del aumento en la expresión de factores de virulencia en el aislado clínico Bp2723 deberán ser estudiados en mayor profundidad para tratar de entender completamente su adaptación a la vida en *biofilm* e identificar nuevos *targets* en el tratamiento de pertussis considerando la adaptación de las cepas circulantes.

Es evidente que en el tema de tos convulsa existen muchos interrogantes que no han tenido todavía respuestas concluyentes. Lo concreto es que todavía la enfermedad no ha podido ser erradicada, aún después de 60 años del uso de distintos tipo de vacunas en países con muy alta tasa de cobertura. Esto implica que la inmunidad generada por las vacunas en uso no ha sido lo suficientemente efectiva para controlar y erradicar a esta población.

La hipótesis del crecimiento en *biofilm* le otorgaría a estas bacterias protección contra los mecanismos de defensa inmune del hospedador y resistencia a los tratamientos con antibióticos ya que la comunidad microbiana se encontraría protegida por una matriz polimérica formada durante el desarrollo del *biofilm*.

Paralelamente al estudio de la formación de *biofilm* por parte de las cepas clínicas de *B. pertussis* se realizó un abordaje micro y nanoscópico de la distribución de la proteína FHA, la principal adhesina de *B. pertussis*. A través del análisis de elasticidad de la superficie de células individuales de la cepa *B. pertussis* Tohama I y utilizando como controles dos cepas

mutantes que no expresan la proteína FHA se logró correlacionar la presencia de la proteína con zonas de mayor rigidez de la superficie bacteriana. También se identificaron espacialmente dichas regiones de mayor rigidez, las cuales forman nanodominios donde se encontraría anclada la proteína FHA.

La presencia de FHA en la superficie de *B. pertussis* y su distribución en nanodominios fue confirmada a través de ensayos de Reconocimiento Molecular que se llevaron a cabo utilizando una punta del MFA modificada con un anticuerpo específico IgG anti-FHA. Para realizar estos experimentos fue necesario poner a punto un protocolo de funcionalización de puntas que involucró una primera etapa de realización de experimentos de Espectroscopia de Moléculas Únicas que tuvieron como finalidad corroborar la especificidad de las interacciones de dicha punta funcionalizada con la proteína FHA purificada e inmovilizada sobre una superficie de mica. Estos ensayos junto con los experimentos de bloqueo permitieron corroborar la correcta funcionalización de la punta del *cantilever*. Posteriormente se detectó la presencia de FHA en la superficie de células individuales de *B. pertussis* Tohama I y se evaluó su dinámica espacial en el tiempo, observándose que luego de estimular la superficie celular con una punta modificada con un anticuerpo específico, se registró un aumento en la densidad de sitios de reconocimiento en la superficie de todas las células estudiadas y que este aumento se encuentra acompañado de una organización en *clusters* de mayor tamaño. Esta distribución favorecería fuertemente la interacción entre las adhesinas y la superficie durante la etapa de adhesión irreversible, que es la primera etapa en la formación de *biofilm*.

De esta manera, hemos logrado investigar los factores y procesos moleculares involucrados en la formación de *biofilm* de *B. pertussis* utilizando técnicas macro, micro y nanoscópicas.

En el futuro se plantea la necesidad de continuar estudiando la organización y dinámica molecular de otros factores de virulencia expresados en superficie por células individuales de *B. pertussis* provenientes de cultivos planctónicos pero también provenientes de cultivos en *biofilm* de diferentes tiempos de crecimiento, de manera de entender cuáles son los factores involucrados en cada etapa de la formación de *biofilm*. Los objetivos de largo plazo incluyen el estudio de la expresión de factores de virulencia en la superficie de células provenientes de aislados clínicos.