



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Química

Caracterización de la capacidad de *Bordetella
parapertussis* de sobrevivir y duplicar en
localización intracelular.

Lic. Juan Pablo Gorgojo

Tesis Doctoral

Dra. María Eugenia Rodríguez
Director

2015

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

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

Gorgojo J ,Harvill ET ,and Rodriguez ME. 2014. Bordetella parapertussis Survives inside Human Macrophages in Lipid Raft-Enriched Phagosomes. Infect Immun. 82:5175-5184.

Gorgojo J ,Lamberti Y ,Valdez H , Harvill ET, and Rodriguez ME. 2012. Bordetella parapertussis survives the innate interaction with human neutrophils by impairing bactericidal trafficking inside the cell through a lipid raft-dependent mechanism mediated by the lipopolysaccharide O antigen. Infect Immun. 80:4309-4316.

OTRAS PUBLICACIONES:

Lamberti Y ,Gorgojo J ,Massillo C ,and Rodriguez ME. 2013. Bordetella pertussis entry into respiratory epithelial cells and intracellular survival. Pathog Dis. 69:194-204.

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

A Juana, Ro, mis hermanos y mis viejos.

Agradecimientos

Todo el trabajo realizado en esta tesis fue gracias al compromiso y esfuerzo, tanto profesional como emocional, de montones de personas que me han acompañado durante este camino. Fue necesario y grato poder recibir de cada uno de ellos la buena compañía y una mano solidaria. A todos ellos les agradezco enormemente.

A Euge, gracias por todo lo compartido.

A los compañeros y amigos de laboratorio, Hugo, Jime, Yani, Natu, Lau, Hila, Juan, Ine, Ceci, Pablo, Brenda, Julio, Claudia, Ale, Osvaldo.

A los compañeros del CINDEFI.

Al Dr. Edgardo Donati

Al Dr. Pablo Perez, a Iva, Jessica y Aye.

Al Dr. Ricardo Gomez, a Emi, Caro, Mati y Santi.

Al Dr. Fernando Chirido, a Nico.

Al servicio de hemoterapia del Hospital de niños.

A los pilares de mi vida, Ro, Juana, Facu, Coca, Gon, Patricia, Victor.

Lista de Abreviaturas

ABGs	Agar Bordet-Gengou sangre
CyaA	Toxina adenilato ciclasa
ANOVA	Análisis de varianza
AMPc	AMP cíclico
BAF	Bafilomicina A
BrkA	Factor de resistencia a complemento
BSA	Albúmina bovina
BvgAS	Sistema de dos componentes (BvgA, BvgS) de <i>Bordetella</i>
Bvg ⁻	Fase avirulenta
Bvg ⁺	Fase virulenta
BvgA	Activador transcripcional de los genes de virulencia de <i>Bordetella</i>
Bvg ¹	Fase intermedia
BvgS	Sensor de los genes de virulencia de <i>Bordetella</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CD4	Proteína expresada en la membrana de células T
CD8	Proteína expresada en la membrana de células T
CD14	Receptor de LPS bacterianos
CD16	receptor de baja afinidad, FcγRIII
CD48	Molécula coestimuladora de la membrana celular
CD58	Molécula coestimuladora de la membrana celular
CD64	receptor de alta afinidad, FcγRI
CR3	Receptor de complemento 3
CyaA	Toxina adenilato ciclasa
CY3	Cianina 3
C3	Componente 3 del complemento
C3b	Opsonina del sistema de complemento
DE	Desviación Estándar
DMEM	Medio simple modificado de Dulbecco
DMEM-BSA	DMEM suplementado con BSA al 0.2 % p/v
Dnt	Toxina dermonecrótica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEA1	Antígeno de endosoma temprano 1
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
FcR	Receptor Fc
FHA	Hemaglutinina filamentosa
Fim	Fimbria
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GPL	Glicerofosfolípidos
GSL	Glicoesfingolípidos
GDP	Guanosína difosfato
GTP	Guanosína Trifosfato
IL-1β	Interleuquina 1 Beta

IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
IL-10	Interleuquina 10
INF	Interferón
Kb	Kilo base
LAMP-1	Proteína lisosomal asociada a membrana 1
LC	Líquido cristalina
LO	Líquido ordenada
LPS	Lipopolisacárido
LSD	Prueba de la menor diferencia significativa
mAc	Anticuerpo monoclonal
M β CD	Metil- β -ciclodextrina
MDI	Multiplicidad de infección
MEM	Medio esencial mínimo
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
Mpb	Mega pares de bases
MPO	Mieloperoxidasa
M6PR	Receptor de manosa-6-fosfato
NE	Elastasa (Neutrophil Elastase)
NETs	Neutrophil extracelular traps
NFK β	Factor de crecimiento transformante beta
NH ₄ CL	Cloruro de amonio
NK	Células natural killer
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
PPR	Receptor de reconocimiento de patrones
PP3	Proteinasa 3
Prn	Pertactina
PTx	Toxina pertussis
ROS	especies reactivas del oxígeno
SDS	odecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SM	Esfingomielinea
SV40	Simian virus 40 (virus del simio 40)
TACO	Proteína de cubierta con Triptofano-Aspartato (<i>Mycobacterium</i>)
TcfA	Factor de colonización traqueal
TCT	Citotoxina tranqueal
TLR-4	receptor tipo Toll 4 (Toll like receptor-4)
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
UFC	Unidades formadoras de colonias
v-ATPasa	ATPasa vacuolar

Índice

1. Introducción General	21
1.1 Tos convulsa: historia, etiología y epidemiología	21
1.2 Vacunas actuales contra la Tos convulsa.....	24
1.3 Cuadro clínico.....	25
1.3.1 Manifestaciones típicas	25
1.3.2 Transmisión.....	26
1.4 Género Bordetella	27
1.4.1 Evolución y tropismo.	28
1.5 Factores de virulencia	29
1.5.1 Sistema BvgAS	30
1.5.2 Toxina Adenilato Ciclasa.....	31
1.5.3 Toxina pertussis	32
1.5.4 LPS.....	33
1.5.4.1 Lípido A	34
1.5.4.2 Antígeno O	35
1.6 Patogénesis.....	36
1.7 Actividad intracelular bactericida. Fagocitosis y ruta intracelular	37
1.7.1 Maduración del Fagosoma	39
1.7.2 Rol del pH en la maduración del fagosoma	42
1.8 Actividad extracelular bactericida: degranulación y formación de trampas extracelulares	43
1.8.1 Degranulación	43
1.8.2 NETosis.....	44
1.9 Balsas lipídicas de la membrana celular y su relación con las infecciones bacterianas	47
1.9.1 Balsas lipídicas.....	47
1.9.2 Análisis de balsas lipídicas en las membranas celulares: Técnicas bioquímicas y morfológicas.....	49
1.9.3 Dominios lipídicos y señalización intracelular	50
1.9.4 Interacción de dominios lipídicos con microorganismos	51
1.10 Antecedentes y objetivos	53
1.11 Referencias.....	56
2. <i>Bordetella parapertussis</i> sobrevive a la acción bactericida de neutrófilos humanos.....	77
2.1 Introducción	77
2.2 Materiales y métodos	79

2.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	79
2.2.2 Células.....	79
2.2.3 Anticuerpos y sueros.....	79
2.2.4 Tratamiento de neutrófilos con drogas desorganizadoras de balsas lipídicas	80
2.2.5 Cuantificación de la adhesión y fagocitosis	81
2.2.6 Activación de la respuesta oxidativa	82
2.2.7 Microscopía confocal	82
2.2.8 Estudios de adquisición de transferrina humana	83
2.2.9 Sobrevida intracelular: ensayo de protección a polimixina B	84
2.2.10 Liberación de la enzima lisosomal β -glucuronidasa	85
2.2.11 Determinación de la formación de NETs	85
2.2.12 Determinación de apoptosis	86
2.2.13 Análisis estadístico.....	86
2.3 Resultados.....	87
2.3.1 El antígeno O está involucrado en la interacción innata de <i>B. parapertussis</i> con los neutrófilos	87
2.3.2 En ausencia de anticuerpos <i>B. parapertussis</i> inhibe de la fusión fagolisosomal y dirige la bacteria a compartimientos con características de endosoma temprano en un mecanismo dependiente del antígeno O	89
2.3.3 En ausencia de anticuerpos <i>B. parapertussis</i> modula la activación de los neutrófilos evitando la generación del estallido respiratorio a través un mecanismo dependiente del antígeno O	94
2.3.4 El antígeno O favorece la sobrevida intracelular de <i>B. parapertussis</i> en la interacción innata con neutrófilos.....	95
2.3.5 La sobrevida de <i>B. parapertussis</i> a la fagocitosis está ligada a su interacción con las balsas lipídicas de la membrana de la célula huésped a través del antígeno O	96
2.3.6 El antígeno O de <i>B. parapertussis</i> evita mecanismos bactericidas extracelulares del neutrófilo	101
2.3.7 El antígeno O de <i>B. parapertussis</i> inhibe la apoptosis del neutrófilo.....	108
2.4 Discusión	110
2.5 Referencias.....	115
3. <i>Bordetella parapertussis</i> sobrevive dentro de macrófagos. Posible nicho de persistencia intracelular.....	121
3.1 Introducción	121
3.2 Materiales y métodos	123
3.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	123
3.2.2 Aislamiento de macrófagos.....	123
3.2.3 Anticuerpos y sueros.....	123
3.2.4 Tratamiento de macrófagos con drogas desorganizadoras de balsas lipídicas.....	124

3.2.5 Neutralización del pH vacuolar en macrófagos	124
3.2.6 Cuantificación de la adhesión y fagocitosis	125
3.2.7 Colocalización con marcadores de tránsito intracelular.....	126
3.2.8 Sobrevida intracelular: ensayo de protección a polimixina B	127
3.2.9 Determinación de bacterias intracelulares viables por FISH	128
3.2.10 Estudios de adquisición de transferrina humana	129
3.2.11 Análisis estadístico	129
3.3 Resultados	130
3.3.1 En ausencia de anticuerpos específicos <i>B. parapertussis</i> sobrevive a la interacción con macrófagos a través de un mecanismo que involucra al antígeno O.....	130
3.3.2 <i>B. parapertussis</i> evade la vía fagolisosomal y permanece viable en compartimientos que no se acidifican.....	136
3.3.3 El antígeno O de <i>B. parapertussis</i> dirige la entrada a la célula por balsas lipídicas y las retiene en su fagosoma	142
3.3.4 <i>B. parapertussis</i> permanece en compartimientos con acceso a nutrientes extracelulares	147
3.3.5 El establecimiento de infecciones intracelulares por <i>B. parapertussis</i> no tiene consecuencias en la viabilidad del macrófago	148
3.4 Discusión	150
3.5 Referencias.....	155
4. <i>Bordetella parapertussis</i> sobrevive en células del epitelio respiratorio.....	161
4.1 Introducción	161
4.2 Materiales y métodos	163
4.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	163
4.2.2. Células y condiciones de cultivo	163
4.2.3 Anticuerpos y sueros	164
4.2.4. Ensayos de adhesión e invasión	164
4.2.5 Sobrevida intracelular: ensayo de protección con polimixina B	165
4.2.6 Repoblación del medio extracelular	166
4.2.7 Determinación de citoquinas en el sobrenadante de células 16HBE14o-.....	167
4.2.8 Evaluación de la citotoxicidad de <i>B. parapertussis</i>	167
4.2.9 Inducción de la formación de NETs en neutrófilos.....	168
4.2.10 Análisis estadístico	169
4.3 Resultados	170
4.3.1 <i>B. parapertussis</i> invade células 16HBE14o-y sobrevive en localización intracelular ...	170
4.3.2 Repoblación del medio extracelular	173
4.3.3 Efecto de la repoblación del medio extracelular sobre la reinfección de las células epiteliales.....	175

4.3.4 La citotoxicidad de <i>B. parapertussis</i> es dependiente de factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS.....	177
4.3.5 La infección de células epiteliales con <i>B. parapertussis</i> no induce la liberación de IL-8 al medio extracelular.....	179
4.3.6 La infección de células 16HBE14o- con <i>B. parapertussis</i> no induce la liberación de citoquinas que determinen la activación de los neutrófilos.....	181
4.3.7 <i>B. parapertussis</i> inhibe la formación de NETs inducida por citoquinas liberadas por células del epitelio respiratorio.	183
4.4 Discusión	185
4.5 Referencias.....	188
5. Discusión General	195
5.1 Referencias.....	203

CAPITULO 1

Introducción General

1. Introducción General

1.1 Tos convulsa: historia, etiología y epidemiología

La tos convulsa es una enfermedad infecciosa de las vías respiratorias provocada por los cocobacilos Gram negativos *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*, cuyo único hospedador es el hombre, sin reservorio conocido por fuera del mismo. Esta enfermedad es una de las principales causas de mortalidad infantil entre las enfermedades inmunoprevenibles.

La primera descripción clínica de la enfermedad es la de Guillermo de Baillou en 1578, quien la llamó Tussis Quintín (1). Posteriormente, Thomas Sydenham en 1679, y Thomas Willis en 1682 llamaron “pertussis” (per, intensa; tussis, tos) a esta enfermedad que afectaba a lactantes y niños provocando la muerte en muchos casos. En Europa durante los siglos XVIII y XIX las epidemias de tos convulsa causaron numerosas muertes y hacia el año 1906 Jules Bordet y Octave Gengou aislaron el que se consideraría el único agente causal de esta enfermedad en este momento, *B. pertussis* (2). Debido a la rápida diseminación y al impacto epidémico de la enfermedad, el desarrollo de vacunas fue prioritario. Entre 1914 y 1923, Hess, Luttinger y Madsen realizaron los primeros ensayos exitosos de vacunación contra la tos convulsa utilizando vacunas formuladas con células enteras de *B. pertussis* (3). Finalmente durante la década de 1940-1950 las vacunas celulares fueron introducidas en la profilaxis contra la tos convulsa lo cual redujo drásticamente la incidencia de esta enfermedad. En este período Eldering y Kendrick (1938) aislaron una nueva especie en pacientes con tos convulsa relacionada con *B. pertussis* a la que denominaron *B. parapertussis* (4). Esta bacteria desarrollaba una enfermedad con la misma sintomatología que *B. pertussis* aunque generalmente más leve. Los primeros estudios epidemiológicos sugerían que *B. parapertussis* podía infectar poblaciones que habían adquirido inmunidad contra *B. pertussis* (5). En ese momento estudios preliminares de laboratorio demostraron que *B. pertussis* y *B. parapertussis* presentaban diferencias antigénicas que, aunque pequeñas, eran suficientes para que *B. parapertussis* evada la protección conferida por las vacunas formuladas con *B. pertussis* e infecte poblaciones vacunadas (6, 7). La aparición de casos fatales en infecciones causadas

por *B. parapertussis* instaló la necesidad de contar con una vacuna que incluya a *B. parapertussis* en su formulación (8). En 1974 se realizaron los primeros estudios con vacunas contra *B. parapertussis* (9), obteniéndose resultados controversiales en cuanto a la posible interferencia generada en la protección contra *B. pertussis* (10). El proyecto fue abandonado porque se concluyó que la situación epidemiológica no representaba una amenaza y por lo tanto no justificaba el desarrollo de un programa de vacunación contra *B. parapertussis* (11). Esta decisión, basada en datos erróneos debido a la falta de técnicas adecuadas para la diferenciación de especies de *Bordetella*, entre otros problemas metodológicos para el diagnóstico en sí de la tos convulsa, ha derivado en la situación de reemergencia actual agravada por el cambio en el tipo de vacunas empleadas para el control de la enfermedad, según se detalla más abajo.

En la actualidad a pesar de la extensiva vacunación la tos convulsa continúa siendo una de las principales causas de mortalidad infantil, registrándose picos epidémicos cada 4 a 5 años (12, 13). El grupo más expuesto y el que registra la mayor tasa de mortalidad es el de niños menores de cuatro años, teniendo prevalencia sobre el género femenino (70%). Dentro de éste, los lactantes representan el principal blanco de la enfermedad con el más alto porcentaje de complicaciones y muertes; la letalidad es de aproximadamente un 1% en menores de un año, aumentando a 5,7% cuando son hospitalizados. En general la severidad de la enfermedad decrece con la edad del individuo infectado (14, 15).

Estudios recientes indican que hay aproximadamente 16 millones de casos de tos convulsa por año en todo el mundo, con un número de casos fatales cercano a 195.000 (OMS, 2011), y en los últimos años, la incidencia de la enfermedad reportada se ha incrementado. Recientemente la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado la tos convulsa como una enfermedad reemergente. En Argentina, en coincidencia con lo ocurrido a nivel mundial, entre el año 2003 y 2011 los casos de tos convulsa aumentaron de manera significativa reportándose 1.498 casos en 2011 con un total de 70 muertes en menores de 5 meses de edad y 2.207 casos en 2012 (Ministerio de Salud de la Nación; Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/prensa/index.php/noticias/noticias-de-la-semana/494-tos-convulsa-ministerio-de-salud-de-la-nacion-insta-a-la-vacunacion-de-embarazadas-ninos-y-adolescentes>). Si bien los estudios epidemiológicos actuales demuestran que la incidencia de *B. pertussis* continúa en aumento aun en poblaciones

vacunadas indicando que existe una ineficiencia de las vacunas en uso en el control de este patógeno, también se ha observado que uno de los factores que contribuyen a la re-emergencia de la tos convulsa es el aumento sostenido de la incidencia de *B. parapertussis* en la enfermedad (16-19). Hoy es claro que, al igual que *B. pertussis*, este patógeno representa una amenaza para la salud pública mundial. En la Tabla 1 se muestran los resultados de estudios epidemiológicos donde se puede observar la prevalencia de *B. parapertussis* en poblaciones vacunadas que va desde un ~1% a un ~98% según el brote epidémico. En Argentina los datos documentados en diferentes provincias indican que *B. parapertussis* representa el 27% de los casos de tos convulsa en poblaciones con cobertura de vacunación superior al 92% (20). Cabe señalar que la incidencia actual de *B. parapertussis* podría estar subestimada ya que las infecciones causadas por este patógeno pueden ser asintomáticas o dar un cuadro clínico similar al de *B. pertussis* que resulta indistinguible en la mayoría de los casos (21-23). A esto se suma el hecho de que el diagnóstico diferencial no modifica el curso del tratamiento y en muchos casos no se realiza la distinción de especie y por lo tanto las infecciones causadas por *B. parapertussis* son atribuidas a *B. pertussis* (24).

Un aspecto interesante es que en general las infecciones por *B. parapertussis* tienen una mayor incidencia en individuos vacunados que en individuos no inmunes (25). En la actualidad existen dos tipos de vacunas utilizadas en el control de la enfermedad, las vacunas celulares y las vacunas acelulares, ambas desarrolladas solo con componentes de *B. pertussis* según se detalla más adelante. Si bien las vacunas celulares confieren una protección baja contra *B. parapertussis*, varios estudios demuestran que las vacunas acelulares no presentan protección alguna contra esta bacteria (19, 26, 27). Estudios recientes en modelos murinos sugieren que la vacuna acelular podría incluso predisponer al hospedador a la infección por *B. parapertussis* (27, 28). En este sentido se ha observado que el reemplazo de las vacunas celulares por las vacunas acelulares, formuladas únicamente a partir de antígenos purificados de *B. pertussis* comunes a ambas especies, determinó un aumento en la incidencia de *B. parapertussis* en la epidemiología de la enfermedad (25, 27). Se espera que la situación epidemiológica empeore en las circunstancias actuales y hoy se reconoce que es necesario revisar las estrategias preventivas contra la tos convulsa para lograr controlar mejor a ambas especies.

Tabla 1. Prevalencia de *B. parapertussis* en poblaciones con Tos convulsa

País	Año	<i>B. parapertussis</i> (%)	Ref.
Dinamarca	1946-1970	4,2	(29)
Checoslovaquia	1967-1969	97,7	(30)
Alemania	1991-1993	24,0 - 40,0	(17)
Suiza	1991-1997	1,0 - 4,3	(21)
Italia	1992-1993	12,3	(31)
Alemania	1993-1995	36,0	(25)
Francia	1993-2000	1,4	(32)
Italia, Alemania y suiza	1997	2,1 - 25,0	(18)
Finlandia	1994-1997	39,2	(19)
Rusia	1998-2000	13,0 ^{&}	(33)
Pakistán	2005-2009	7,4	(34)
Túnez	2007-2011	6,0 ^{&}	(35)
Estados unidos	2008-2010	13,9 ^{&}	(12)
Estados unidos	2010-2011	1,3	(36)
China	2011	2,1 ^{&}	(23)

[&]Incluyen infecciones mixtas.

1.2 Vacunas actuales contra la Tos convulsa

Como ya ha sido mencionado existen dos tipos de vacunas en uso contra la tos convulsa, las de primera generación formuladas a partir de células enteras de *B. pertussis* en fase virulenta inactivadas por calor (vacuna celular), y las de segunda generación formuladas con ciertos factores de virulencia purificados de *B. pertussis* (vacuna acelular). La vacuna celular fue introducida en la inmunización global entre 1940 y 1950. Esta vacuna, aunque efectiva en disminuir la incidencia de la enfermedad presentaba efectos adversos de distinta magnitud, incluso ocasionaba la muerte de los vacunados (1 de cada 310000). Esto motivó el desarrollo de una nueva generación de vacunas de formulación acelular, más segura, y que no presenta efectos adversos. La primer vacuna acelular desarrollada por Sato y colaboradores estaba formulada con proteínas de *B. pertussis* co-purificadas, que comprendían esencialmente toxina pertussis (PTx) y hemaglutinina filamentosa (FHA) (37). Posteriormente se desarrollaron nuevas formulaciones compuestas de antígenos purificados individualmente y hoy las vacunas actualmente en uso son una combinación de FHA, PT, pertactina (Prn), y fimbria (Fim).

1.3 Cuadro clínico

Los síntomas de la tos convulsa pueden variar, dependiendo la edad, el estado inmune, el tiempo transcurrido desde la última infección o desde la última vacunación (38) y el agente causal de la enfermedad. En general las infecciones causadas por *B. parapertussis* presentan un cuadro clínico más leve y de corta duración que las infecciones causadas por *B. pertussis* (18, 21, 25, 31, 39) y en un gran porcentaje de los casos se desarrolla como una infección asintomática (23). Sin embargo los síntomas clásicos de la enfermedad pueden aparecer hasta incluso determinar la muerte del individuo infectado (8, 19, 25, 39-41).

1.3.1 Manifestaciones típicas

Luego del contagio los síntomas aparecen en un período que oscila entre 7 y 10 días, y la enfermedad puede durar entre 4 a 8 semanas, o más. En el transcurso de la enfermedad pueden distinguirse tres períodos con manifestaciones clínicas características que se suceden sin límite preciso: período catarral, período paroxístico y período de convalecencia. Debido a que la enfermedad puede ser diagnosticada luego de la etapa de incubación, en la que se ha producido daño local y sistémico, el tratamiento con antibiótico no resulta eficaz en su control pero su uso se recomienda para limitar el esparcimiento del organismo a otros individuos.

La etapa catarral con una duración aproximada de una a dos semanas no presenta síntomas específicos y, por lo general, se la confunde con una infección corriente de las vías respiratorias superiores. Hacia el final de este período la tos se vuelve más intensa. La etapa paroxística está determinada por la aparición de accesos de tos. A esta manifestación le sigue un período de apnea que puede llevar a la cianosis (coloración azulada por falta de oxígeno) luego de la cual se produce una inspiración profunda a través de las cuerdas vocales contracturadas causando el estribor característico (silbido) asociado a la enfermedad. Este episodio ocurre repetidas veces hasta finalizar con vómitos o expectoración. La duración del período paroxístico es de entre 3 y 4 semanas y es en el cual pueden producirse complicaciones tales como vómitos, convulsiones, hemorragias diversas, neumotórax, invaginación intestinal, encefalopatías y en algunos casos la muerte del individuo infectado. A las complicaciones mecánicas y neurológicas se le suman las

infecciosas, dado que la infección por estos patógenos hace del hospedador un entorno propicio para el establecimiento de diversas infecciones causadas por otros patógenos de las vías respiratorias. La etapa de convalecencia se caracteriza por la disminución gradual y progresiva de los accesos de tos, con una duración proporcional a la gravedad alcanzada en el transcurso de la enfermedad.

Mientras que la enfermedad causada por *B. pertussis* genera linfocitosis, en las infecciones causadas por *B. parapertussis* la linfocitosis es de menor magnitud dado que esta no expresa PTx que estimula la proliferación de los linfocitos (39, 42). Un estudio en donde se compara la sintomatología relativa entre estos patógenos muestra que la tos, la etapa paroxística, los vómitos y la apnea luego de los accesos de tos ocurren en 100, 97, 77 y 75 % de los casos de infección con *B. pertussis* y en un 100, 76, 43 y 39 % de los casos de infección con *B. parapertussis* (18). Aunque la duración de la enfermedad tiende a ser más corta en los individuos infectados con *B. parapertussis*, estos estudios demuestran que la mayoría de los niños infectados con esta bacteria desarrollan la etapa aguda del paroxismo y aproximadamente el 39% de los infectados desarrollan los síntomas más severos de la enfermedad. Aunque no es un cuadro común, se han reportado bacteriemias e infecciones letales causadas por infecciones con *B. parapertussis* en individuos inmuno comprometidos e inmuno competentes (8, 40, 41).

1.3.2 Transmisión

Dado que *B. pertussis* y *B. parapertussis* no poseen reservorio por fuera del hombre, la transmisión ocurre de persona a persona. Se cree que el contagio se produce por saliva o por secreciones de las vías respiratorias de un individuo infectado. La transmisión del agente es máxima en el período catarral previo a los accesos de tos del período paroxístico. Estudios estiman que en un ambiente cerrado un solo niño infectado puede infectar entre el 55 y 100 % de los individuos no inmunizados presentes (25). Se cree que la enfermedad comienza cuando la bacteria expelida por la tos de un individuo infectado (contenida en la micro gota) ingresa al hospedador susceptible a través de las vías aéreas. Una vez allí, la bacteria se replica y coloniza áreas adyacentes. Diferentes estudios y datos clínicos demuestran la existencia de períodos asintomáticos que contribuirían significativamente a la propagación de la enfermedad (23).

1.4 Género Bordetella

El género *Bordetella* está conformado por β -proteobacterias y está compuesto por nueve especies (*Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*_{hu}, *B. parapertussis*_{ov}, *B. bronchiseptica*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. petrii*, and *B. trematum*). Cuatro de las especies que conforman este género, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*, *B. pertussis* y *B. holmesii* están asociadas con enfermedades respiratorias en mamíferos (Tabla 2). *B. bronchiseptica* infecta principalmente animales y puede desarrollar infecciones zoonóticas en humanos, pero la sintomatología leve de la enfermedad y el eficiente control de la bacteria en huéspedes sanos hace que no se considere una amenaza para los humanos (24, 43, 44). A pesar de que ha sido aislada de humanos en varias ocasiones, no ha sido asociada con las epidemias de tos convulsa (45-51). *B. holmesii* es una bacteria identificada recientemente (1995) asociada en primera instancia con el desarrollo de sepsis, bacteriemia y endocarditis principalmente en pacientes con inmunodeficiencias (individuos esplénicos o con SIDA), y en menor grado con el desarrollo de infecciones respiratorias con sintomatología característica de la tos convulsa (52-55). *B. pertussis* y *B. parapertussis* son considerados los principales agentes causales de la tos convulsa y el único hospedador conocido hasta el momento es el hombre (24, 56). En la literatura se describen dos especies de *B. parapertussis*, pero solo *B. parapertussis*_{hu} causa infecciones en humanos debido a un diferente tropismo. A pesar de las diferencias en el huésped, en el grado de virulencia y persistencia, *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* están tan estrechamente relacionadas filogenéticamente que se la ha reclasificado como subespecies dentro del clúster “classical bordetellae” (44, 57-60).

Tabla 2. Especies dentro del género *Bordetella* que causan infecciones respiratorias en mamíferos.

Especie	Enfermedad asociada	Hospedadores
<i>B. pertussis</i>	Tos convulsa	Humanos
<i>B. parapertussis</i>	Tos convulsa	Humanos
<i>B. parapertussis</i>	Neumonía no progresiva crónica	Ovejas
<i>B. bronchiseptica</i>	Traqueobronquitis crónica, bronconeumonía, septicemia, tos de las perreras, rinitis atrófica, (cerdos), catarro (conejos)	Ratones, zarigüeyas, ratas, mapaches conejos, coalas, ovejas, caballos, monos, cerdos, gatos, perros, hurones, zorro, pavos, zorrinos, leopardos, erizos
<i>B. hosmessii</i>	Septicemia, endocarditis, infecciones respiratorias.	Humanos con deficiencias inmunitarias

1.4.1 Evolución y tropismo.

Recientemente las secuencias genómicas de las especies que integran el “classic *Bordetellae*”, *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*, han sido descritas (59). *B. bronchiseptica* tiene el genoma más grande de las tres especies con un tamaño aproximado de 5.3 Mpb. Este genoma incluye casi todos los genes contenidos en los genomas de *B. pertussis* y *B. parapertussis*, de 4.0 y 4.7 Mpb, respectivamente (59). El análisis comparativo de las secuencias genómicas muestra que tanto *B. pertussis* como *B. parapertussis* evolucionaron a partir del antecesor en común, *B. bronchiseptica*, hace aproximadamente 0,7-3,5 y 0,27-1,4 millones de años, respectivamente. Según estos estudios la evolución de estos patógenos llevó a la pérdida de material genético. Se ha sugerido que la restricción a un único hospedador (el hombre) fue consecuencia de esta pérdida de material genético, dado que no hay indicios de que hayan adquirido material genético de otras especies durante su evolución (59). Estudios recientes, sin embargo, han encontrado evidencia de transferencia horizontal de material genético entre estas especies (61).

De cualquier manera se asume que la reducción del genoma de *B. pertussis* y *B. parapertussis* dio lugar a mecanismos de patogenicidad que en definitiva, permitieron el

establecimiento de infecciones persistentes en humanos y el desarrollo de patologías más severas que su antecesor *B. bronchiseptica*.

1.5 Factores de virulencia

La estrecha relación filogenética que existe entre las especies *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* y *B. pertussis* queda reflejada por la gran similitud en el conjunto de factores de virulencia que expresan y por el alto grado de identidad existente entre estos (59). Entre los principales factores de virulencia se encuentran las adhesinas, como FHA y Fim, y las toxinas con diferentes actividades citotóxicas e inmunomoduladoras como el lipopolisacárido (LPS), la toxina adenilato ciclasa (CyaA), la citotoxina traqueal (TCT) y la toxina dermonecrótica (Dnt). Por otro lado, existen diferencias en el conjunto de factores de virulencia expresados por cada especie que se cree que han determinado la virulencia y la sintomatología particular de la enfermedad ocasionada por cada patógeno. Entre estos se encuentran PTx, el factor de colonización traqueal (TcfA) y la proteína BrkA expresadas solo por *B. pertussis*, y el antígeno O, expresado solo por *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* (62, 63). Dado que solo las infecciones causadas por *B. pertussis* y *B. parapertussis* se consideran una amenaza para la salud pública, en este trabajo solo analizaremos las diferencias en la expresión de factores de virulencia entre estas especies. En la Tabla 3 se muestran los factores de virulencia comunes y diferenciales expresados por *B. pertussis* y *B. parapertussis*. En los párrafos siguientes se describirán en detalle los factores de virulencia más relevantes en la patogenicidad de estas bacterias y en particular aquellos que determinan las diferencias en la patogénesis de *B. pertussis* y *B. parapertussis*.

Tabla 3. Factores de virulencia expresados por *B. pertussis* y *B. parapertussis*

Factor de virulencia	Función	<i>Bordetella pertussis</i>		<i>Bordetella parapertussis</i>	
		gen exp.	gen exp.	gen exp.	gen exp.
Hemaglutinina filamentosa	Adhesión	+	+	+	+
Pertactina	Adhesión	+	+	+	+
Fimbria	Adhesión	+	+	+	+
BrkA	Resistencia al sistema de complemento	+	+	+	-
Factor de colonización traqueal	Adhesión	+	+	+	-
Toxina pertussis	Bloqueo de las funciones efectoras de las células inmunes y retraso de la respuesta proinflamatoria	+	+	+	-
Toxina dermonecrótica	Contracción del músculo liso de la tráquea	+	+	+	+
Adenilato ciclasa	Bloquea funciones efectoras de las células inmunes	+	+	+	+
Citotoxina traqueal	Actividad citotóxica sobre el epitelio ciliado	+	+	+	+
LPS	Retardo de la respuesta inflamatoria y diferentes actividades inmunomoduladoras.	+	+	+	+
Antígeno O	Evasión del sistema de complemento, protección del reconocimiento por anticuerpos generados por vacunación.	-	-	+	+

1.5.1 Sistema BvgAS

La expresión de mayoría de los factores de virulencia y otras proteínas de función desconocida hasta el momento es regulada por un sistema de dos componentes BvgAS codificado por el locus *bvgAS* (*Bordetella virulence genes*) que responde a cambios en las condiciones del entorno (64, 65). BvgA y BvgS son miembros de este sistema y su activación implica un mecanismo de fosfo-transferencia (66, 67). BvgS es un sensor híbrido anclado a la membrana interna que ante determinados estímulos determina la fosforilación de BvgA (68), un regulador transcripcional que se une al ADN una vez fosforilado (69). La caracterización *in vitro* de varios promotores regulados por BvgA, entre los que se

encuentra su propio promotor, indica que la expresión de diferentes genes puede ser diferencialmente controlada por BvgA (67). Aunque las señales censadas por este sistema *in vivo* no han sido esclarecidas, se cree que su regulación diferencial en respuesta a los distintos ambientes encontrados tanto dentro del hospedador como durante la transmisión a otros hospedadores tiene un rol central en la patogénesis de estas bacterias. Estudios *in vitro* demostraron que el sistema BvgAS se inactiva a bajas temperaturas (por debajo de 25°C), en presencia de concentraciones milimolares de MgSO₄ o ácido nicotínico, y se activa cuando la bacteria crece a 37°C. La inactivación implica la inhibición de la expresión de los factores de virulencia. Esta regulación no es tipo ON-OFF sino que responde a modo de reóstato a la concentración del modulador controlando la expresión de no solo los genes relacionados con los factores de virulencia, sino también de cientos de genes diferentes cuyos productos participan en una amplia variedad de actividades celulares incluyendo sistemas de transporte, metabolismo, y regulación transcripcional. En particular se han descrito tres perfiles de expresión basados en la afinidad de BvgA por los diferentes promotores. Estas fases fenotípicas han sido identificadas como Bvg⁺ (fase virulenta), Bvgⁱ (fase intermedia) y Bvg⁻ (fase avirulenta) (70). Este fenómeno de transición de fase es reversible y se conoce como modulación fenotípica (71).

En base a experimentos *in vitro*, los genes regulados por el sistema BvgAS han sido clasificados en tres clases de acuerdo a diferencias en su expresión temporal: tempranos, intermedios y tardíos (72-74). Los genes tempranos, que codifican algunas adhesinas (FHA y Fim) responden rápidamente a la activación y requieren bajas concentraciones de BvgA para su inducción (72). Los genes tardíos codifican toxinas (CyaA y PTx) y presentan una cinética de inducción relativamente lenta, requiriendo mayores niveles de BvgA para su expresión (72). Finalmente, el gen que codifica para pertactina (Prn) pertenece a la clase de genes intermedios, que requieren concentraciones intermedias de BvgA (75).

1.5.2 Toxina Adenilato Ciclasa.

Tanto *B. pertussis* como *B. parapertussis* producen la CyaA la cual penetra en células eucariotas causando su intoxicación (76, 77). La CyaA pertenece a la familia de citotoxinas formadoras de poro dependiente de Ca⁺² denominadas toxinas RTX (*repeats-intoxins*) (78, 79). Es una proteína bifuncional con un dominio N-terminal que media la

actividad adenilato ciclasa y un dominio C-terminal que media la actividad formadora de poros en la membrana plasmática y promueve la liberación del dominio catalítico en el citoplasma de células eucariotas (80-83). La glicoproteína de superficie CD11b en la célula blanco sirve de receptor de la toxina madura (84, 85). Una vez dentro de la célula blanco, CyaA es activada por calmodulina (86) y cataliza la producción de AMPc en cantidades supra fisiológicas (87-90). El incremento de AMPc interfiere con los mecanismos de transmisión de señales en células del sistema inmune y modula diferentes funciones efectoras, incluyendo la respuesta oxidativa, lo cual favorece la sobrevida bacteriana en la interacción con la célula hospedadora (91). *In vitro*, CyaA induce apoptosis en macrófagos y disminuye la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en monocitos y neutrófilos (90, 92, 93). Se ha postulado que esta toxina funciona como un factor antiinflamatorio y antifagocítico durante la infección inhibiendo las funciones de las células efectoras del sistema inmune y por lo tanto favoreciendo la persistencia en el hospedador (94, 95). Tanto *B. pertussis* como *B. parapertussis* sintetizan esta toxina que permanece asociada a la superficie bacteriana y también es excretada al medio extracelular en presencia Ca^{+2} por un sistema de secreción tipo I. En presencia de 2 mM de Ca^{+2} se libera al medio extracelular gran parte de la toxina producida.

1.5.3 Toxina pertussis

La PTx es uno de los principales factores de virulencia de *B. pertussis* y posee diferentes funciones inmunomoduladoras. Esta toxina no es expresada por *B. parapertussis* debido a que el gen de la subunidad *ptxB* de esta toxina ha sido remplazado por un pseudogen que no se expresa (59). Debido a las funciones inmunomoduladoras que presenta PTx, esta toxina es determinante de la severidad y la duración de la enfermedad causada por *B. pertussis*, y en particular en la exacerbada linfocitosis generada durante la infección. Sin embargo, *B. parapertussis* puede desarrollar un cuadro clínico igual al de *B. pertussis* en ausencia de expresión de esta toxina (97), sugiriendo que otras toxinas diferentes a PTx pueden suplir sus funciones inmunomoduladoras. Los efectos biológicos atribuidos a la alteración de los patrones de señalización inducida por esta toxina, se suman a la acción de la CyaA (aumento de AMPc) provocando la sensibilización a histamina,

linfocitosis, aumento de la secreción de insulina en respuesta a señales reguladoras, hipoglucemia y efectos inmunológicos tanto supresores como estimuladores (98).

1.5.4 LPS

El LPS, es el principal componente de la membrana externa de bacterias Gram negativas y constituye el 75% de la superficie celular. La molécula de LPS cumple un rol determinante en la sobrevivencia de estas bacterias al proveer una barrera protectora contra el entorno (99, 100) y mediar la interacción con componentes del sistema inmune del hospedador (101). En general la molécula de LPS tiene actividad pirogénica, mitogénica e histamino sensibilizante (102-104) e induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IL-8) en contacto con células epiteliales, macrófagos y otras células del sistema inmune conduciendo a un “shock inducido por endotoxina” (103).

La molécula de LPS está constituida por tres componentes principales (105): una porción lipídica denominada lípido A que se encuentra anclada a la membrana, una cadena glicídica denominada antígeno O que se encuentra en la porción distal de la molécula de LPS y un núcleo oligosacárido que conecta el lípido A con el antígeno O (Fig. 1). Varias diferencias han sido encontradas entre las estructuras de la molécula de LPS de *B. pertussis* y *B. parapertussis* y se describen a continuación.

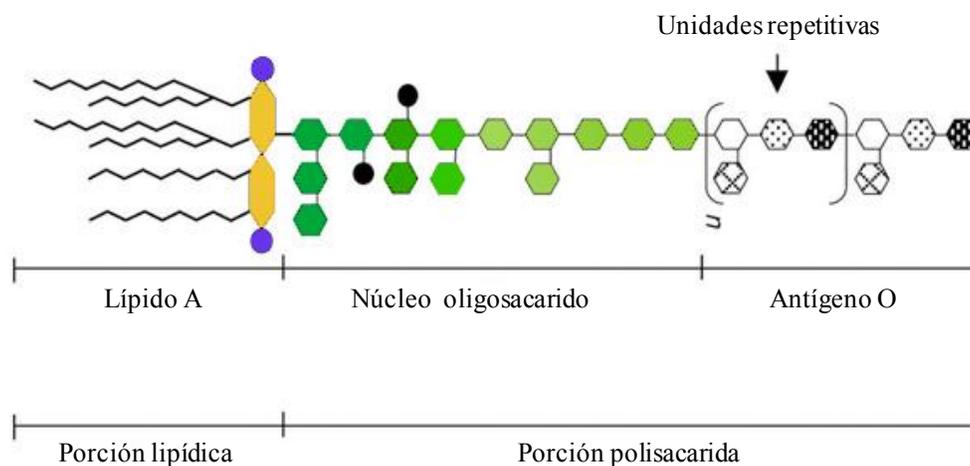


Figura 1. Estructura del lipopolisacárido.

1.5.4.1 Lípido A

El lípido A constituye el componente bioactivo de la molécula de LPS (106). La estructura del lípido A se encuentra muy conservada entre diferentes especies bacterianas indicando su gran importancia en la biología de estos microorganismos. La actividad endotóxica de la molécula de LPS se encuentra en el lípido A, el cual es reconocido por el complejo TLR-4 (Toll like receptor 4) /MD-2 de diferentes células del huésped, induciendo la activación de las vías reguladas por NFK- β que lleva a un aumento en la producción y secreción de citoquinas proinflamatorias (107).

El reconocimiento del LPS bacteriano por TLR-4 es un paso crucial en el desarrollo de la respuesta inmune contra microorganismos Gram negativos. Se ha observado que los patógenos que co-evolucionan con humanos modifican la estructura del LPS, haciendo de esta una molécula menos citotóxica. En particular, se ha observado que el lípido A del LPS del género *Bordetella* sufre modificaciones en su estructura luego de su biosíntesis a través de acilación-desacilación, hidroxilación de ácidos grasos secundarios, y la sustitución de grupos fosfatos por aminoarabinosa, galactosamina o fosfatidiletanolamina (108-111). Estas modificaciones interfieren con la respuesta inmune del huésped (112, 113). Algunos estudios sugieren que estas modificaciones pueden representar adaptaciones del antecesor *B. bronchiseptica* que llevaron al tropismo de *B. pertussis* y *B. parapertussis* por la especie humana (59). Las modificaciones de la molécula de LPS de *B. pertussis* y *B. parapertussis* disminuyen su toxicidad determinando una menor respuesta inflamatoria lo cual facilita la colonización del huésped (114, 115). La toxicidad del lípido A de *B. parapertussis* es 10 y 100 veces menor que la de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*, respectivamente (115). Así es que en las infecciones causadas por *B. pertussis* o *B. bronchiseptica* la respuesta inmune montada por la estimulación de TLR-4 contribuye al control de la infección a tiempos cortos después de la infección, mientras que prácticamente no hay respuesta de este tipo en las infecciones causadas por *B. parapertussis* (114). Se ha demostrado que la baja estimulación de este receptor por parte de *B. parapertussis* favorece el establecimiento de la infección, ya que la activación con agonistas de TLR-4 inducen una rápida eliminación del patógeno en ratones no inmunizados (114). La baja estimulación de TLR4 retrasa el reclutamiento de neutrófilos y leucocitos en pulmón, inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias, e interfiere en la eliminación del patógeno mediada por anticuerpos (114).

Esto último está probablemente asociado al retraso del reclutamiento de neutrófilos al pulmón, dado que la eliminación de *B. parapertussis* mediada por anticuerpos requiere tanto del reconocimiento por anticuerpos opsonizantes como de neutrófilos en el sitio de infección (116).

1.5.4.2 Antígeno O

Una de las principales diferencias entre el LPS de *B. pertussis* y *B. parapertussis* es la expresión del antígeno O. El antígeno O es una cadena glucosídica formada por unidades repetitivas de oligosacáridas cuya síntesis está determinada por la expresión de los genes que se ubican en el locus *wbm* (117-121). Esta estructura está presente en la molécula de LPS de *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*, pero no en el LPS de *B. pertussis* debido a la delección de 20 kb en el locus *wbm* (59, 118). Estudios recientes demuestran que el género *B. bronchiseptica* tiene la capacidad de alternar entre al menos dos serotipos diferentes de antígeno O mediante la transferencia horizontal de genes y la recombinación, permitiendo que bacterias con grandes similitudes generen un repertorio de anticuerpos diferentes ante una infección y puedan infectar una misma población (61).

El antígeno O cumple importantes funciones inmunoevasoras en diferentes patógenos humanos, entre las que se encuentran el impedimento estérico para el reconocimiento de las estructuras de la membrana bacteriana por el sistema inmune, generado por las largas cadenas polisacáridas que conforman el antígeno O (26, 122) y el impedimento de la opsonización por C3b (123).

En el caso de *B. parapertussis* se han llevado a cabo pocos estudios para determinar la influencia de ésta molécula en la colonización del huésped pero se han descrito algunas de vital importancia. Por ejemplo, se ha demostrado en modelos animales que interviene en la colonización y persistencia dentro de huéspedes no inmunes (124, 125). Se demostró que interfiere con la deposición de C3 en la membrana bacteriana (124, 125). Se observó que de alguna manera en ausencia de opsoninas interfiere con la actividad bactericida de macrófagos y neutrófilos, aunque no se han descrito los mecanismos que sustentan esta observación (125). También está involucrado en el apantallamiento de antígenos de membrana lo cual evita el reconocimiento de la bacteria por anticuerpos inducidos por vacunación con vacuna contra pertussis (celular y acelular), y explica la falta de protección

cruzada de las vacunas acelulares (27). Este mismo efecto es el que inhibe que los anticuerpos generados por infección con *B. pertussis* protejan al infectado o convaleciente contra la infección contra *B. parapertussis* (26, 126, 127). La protección asimétrica conferida por el antígeno O es una de las características más importantes que le confiere este factor de virulencia a *B. parapertussis*, dado que permite la coexistencia de estas dos especies (*B. pertussis* y *B. parapertussis*) en un mismo nicho ecológico (127). Así *B. parapertussis* escapa a la inmunidad conferida por *B. pertussis* e infecta poblaciones donde *B. pertussis* es endémica.

1.6 Patogénesis

La colonización de un huésped por un determinado microorganismo está determinada por una serie de eventos entre los que se incluye la evasión del sistema inmune, la adhesión, la proliferación dentro del huésped, y la eventual persistencia del patógeno en el hospedador, todos ellos determinados por los mecanismos de patogenicidad del microorganismo. Aunque *B. parapertussis* es uno de los principales agentes causales de la tos convulsa que ha circulado en la población infantil y adulta por décadas es poco lo que se conoce de sus mecanismos de patogenicidad, estrategias de inmunoevasión y persistencia en la población. La mayor parte de lo que se sabe es a través de las similitudes (asumida) que comparte con *B. pertussis* según se resume a continuación.

Luego del ingreso al hospedador las bacterias colonizan la nasofaringe y luego la tráquea. Las bacterias se adhieren a células del epitelio respiratorio (128-130) a través de adhesinas (42). FHA es la principal adhesina de *B. parapertussis* que participa en este proceso pero no es la única (129). FHA es un factor de virulencia temprano regulado por el BvgAS expresado en fase virulenta o intermedia. Se cree que durante la transmisión y ya en la zona nasofaríngea la temperatura ambiente (menor a 37°C) podría modular temporalmente la fase de virulencia de la bacteria infectante a una fase intermedia en cuyo caso intervendría FHA, o una fase avirulenta donde intervendrían otras adhesinas menores, aún no identificadas, hasta que la bacteria vuelva a modularse a fase virulenta por acción de la temperatura corporal. Durante la colonización la inducción de ciliastosis junto al daño del epitelio respiratorio y la acumulación de mucus, dificulta la eliminación de los microorganismos de las vías respiratorias. En la infección por *B. pertussis* el daño local de

las células epiteliales se debe a la acción de TCT y Dnt, y en menor medida CyaA (131, 132), las cuales posiblemente provoquen efectos similares durante la infección con *B. parapertussis* dado que estas toxinas están presentes también en esta especie (24, 42, 133).

En una etapa posterior las bacterias interaccionan con componentes del sistema inmune modulando la respuesta inmune montada por el hospedador. *B. pertussis* es capaz de modular la respuesta inmune adaptativa a través de la acción de distintos factores de virulencia, entre los que se encuentran FHA (134, 135), CyaA (136-138), y LPS (139, 140), que también están presentes en *B. parapertussis*. Si bien no ha sido demostrado en estudios con *B. parapertussis*, los estudios llevados a cabo con *B. pertussis* demuestran que CyaA media diferentes funciones inmunoevasoras. CyaA provoca la intoxicación de neutrófilos catalizando la producción excesiva de AMPc e inhibe la activación de la célula inmune (91). El incremento de AMPc interfiere con los mecanismos de transmisión de señales en células del sistema inmune y modula diferentes funciones efectoras, incluyendo la respuesta oxidativa, lo cual favorece la supervivencia bacteriana al contacto con la célula del hospedador. Se ha observado que por acción de CyaA, *B. pertussis* sobrevive a gran parte de los mecanismos de la inmunidad innata durante la colonización. Dado que *B. parapertussis* también expresa CyaA es posible que esta toxina medie mecanismos similares durante la colonización del huésped.

En el caso de *B. parapertussis* los pocos estudios que se han llevado a cabo para determinar los mecanismos de patogenicidad de esta bacteria se han centrado principalmente en las funciones inmunoevasoras de la molécula de LPS y del antígeno O descritas anteriormente. A éstas se le suman diferentes funciones que no se las han asociado aún a ningún factor de virulencia en particular, entre las que se encuentran la baja capacidad estimulante de TLR-4, que contribuye en el retraso del reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección (114), y la inducción de IL-10 por células T y macrófagos en respuesta al encuentro con *B. parapertussis* que conlleva a la disminución de la respuesta inflamatoria, y al retraso del reclutamiento de leucocitos al pulmón (141).

1.7 Actividad intracelular bactericida. Fagocitosis y ruta intracelular

Los macrófagos y neutrófilos son las principales barreras contra las infecciones bacterianas. Estas células reconocen al microorganismo, lo fagocitan, y a través de un

proceso de maduración del fagosoma inactivan el microorganismo (Fig. 2A). Si bien la fagocitosis es un mecanismo de defensa del huésped para controlar la infección, en ocasiones los microorganismos fagocitados manipulan la ruta intracelular, evaden la acción bactericida y permanecen viables en localización intracelular, lo cual determina su persistencia en el hospedador. Tal es el caso de *Mycobacterium spp.*, *Brucella abortus*, *Salmonella typhimurium*, *Leishmania spp.*, *Leghionella pneumophila* y *B. pertussis*, entre otros (142-150). Algunas de las estrategias utilizadas para evadir los mecanismos bactericidas de las células fagocíticas son, la inhibición de la maduración del fagosoma (Fig. 2B), el desarrollo de la resistencia a péptidos, bacteriocinas y otros componentes bactericidas del fagolisosoma (Fig. 2C), la ruptura de la membrana del fagosoma para pasar al citoplasma de la célula (Fig. 2D), y el alojamiento de la bacteria en organelas que no entran en la vía degradativa (Fig. 2E). Para poder estudiar la capacidad de un microorganismo de evadir los mecanismos bactericidas de las células fagocíticas es necesario conocer el proceso normal de maduración del fagosoma que se describe a continuación.

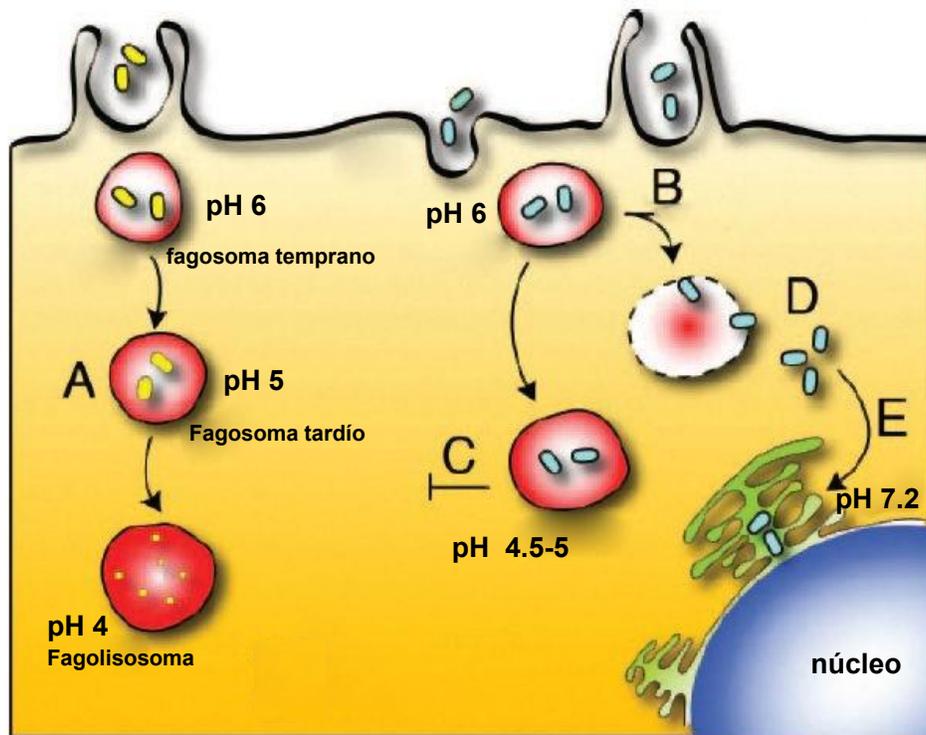


Figura 2. Maduración del fagosoma y mecanismos microbianos de evasión. (A) En general la fagocitosis de un microorganismo determina la maduración del fagosoma que

finaliza con la formación del fagolisosoma. Durante la maduración se produce un aumento progresivo de la acidez y de las propiedades degradativas del fagosoma. (B-E) Algunos microorganismos patógenos evaden los mecanismos bactericidas de las células fagocíticas. (B) inhibición de la maduración del fagosoma. (C) Resistencia a moléculas bactericidas. (D) Liberación al citoplasma. (E) Alojamiento en compartimientos que no pertenecen a la vía degradativa (Golgi; Retículo endoplasmático). (Fuente: Huynh KK and Grinstein S. (2007) *Microbiol Mol Biol Rev* (151)).

1.7.1 Maduración del Fagosoma

La eliminación de los microorganismos por las células fagocíticas comienza con el reconocimiento de la bacteria. Este es mediado por receptores de membrana propios de la inmunidad innata y receptores Fc que median la acción de la inmunidad adaptativa. Los receptores de la inmunidad innata son conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PPR) (receptores Toll, receptores lectina tipo C, receptores Scavenger y receptores para péptidos formilados) y reconocen estructuras de la superficie bacteriana a las que se las denomina patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP). Estos PAMP se encuentran ampliamente conservados en la escala evolutiva, y permiten a las células fagocíticas reconocer un gran número de microorganismos con un bajo número de receptores (152, 153). Los receptores Fc se unen a la porción constante de las inmunoglobulinas generadas por células de la inmunidad adaptativa que reconocen infinitas estructuras en la superficie bacteriana. Existen además otros receptores en la membrana celular involucrados en el reconocimiento de citoquinas, hormonas y neurotransmisores que intervienen en la respuesta integral de la célula. El conjunto de receptores activados durante la interacción con un determinado microorganismo desencadenará diferentes mecanismos celulares que determinarán el destino de la bacteria.

El paso siguiente al reconocimiento y captura del microorganismo es generalmente la fagocitosis de la bacteria. La fagocitosis es un mecanismo que generalmente involucra modificaciones en la estructura del citoesqueleto y ocurre a través del reordenamiento de los microfilamentos de actina. Esta comienza con la invaginación de la membrana celular alrededor del microorganismo que determina la formación de una vacuola denominada fagosoma. Normalmente el fagosoma resultante interacciona con diferentes compartimientos durante su tránsito intracelular modificando la composición de la membrana y de su interior. En general, estas modificaciones ocurren de manera progresiva

y le otorgan al fagosoma propiedades degradativas y bactericidas que cumplen un rol central en la eliminación de los microorganismos internalizados (154, 155). A este proceso se lo denomina maduración fagolisosomal o vía degradativa. Durante la maduración, el fagosoma interacciona con los componentes de la vía endocítica, endosomas tempranos, endomas tardíos y lisosomas. Mediante un proceso de fusión-fisión con estas estructuras va cambiando la composición de las proteínas de membrana y de su interior (156, 157) lo que determina el estado de maduración en que el fagosoma se encuentra. Este proceso está regulado por diferentes proteínas denominadas GTPasas Rab. Las proteínas Rab alternan su conformación entre una forma unida a GTP, la forma activa, y otra unida a GDP (158). Una vez activadas estas proteínas se asocian a diferentes moléculas efectoras que se encuentran relacionadas con el tráfico vesicular, el mecanismo de fusión-fisión, e inclusive con la activación de otras proteínas Rab (159).

En el inicio de su tránsito intracelular el fagosoma adquiere Rab5 que junto con otra molécula efectora, el antígeno 1 de endosomas tempranos (EEA-1, Early Endosome Antigen 1), coordinan el tráfico endocítico y la interacción con endosomas tempranos para formar el fagosoma temprano (156, 160, 161). El interior de los fagosomas tempranos tiene un pH que varía entre 6.1 y 6.5, y no tiene una actividad degradativa importante. Los fagosomas tempranos interaccionan con endosomas de la vía de reciclaje. Estos se encargan del reciclaje de moléculas que no deben seguir la vía degradativa, como son los diferentes receptores de membrana, y del transporte de nutrientes desde el medio extracelular a las diferentes organelas manteniendo la homeostasis de la célula. El transporte de hierro unido a proteínas como la transferrina ocurre a través de esta vía y por lo tanto el receptor de transferrina es una molécula que sirve como marcador de fagosomas tempranos.

El proceso de maduración continúa con la generación del fagosoma tardío. En esta etapa la proteína Rab5 es remplazada por Rab7. Esta molécula es un marcador característico de fagosoma tardío y coordina la interacción entre fagosomas y lisosomas (156, 162). En este proceso el fagosoma adquiere la ATPasa vacuolar (v-ATPasa) que bombea protones hacia el interior del fagosoma (162) y mantiene el pH intravacuolar entre 5.5 y 6.0. También adquiere diferentes proteasas y proteínas de membrana asociadas a lisosomas (LAMP- 1, Lysosomal Associated Membrane Proteins 1) que le confieren actividad degradativa.

En los fagosomas tardíos también se encuentra el receptor de manosa 6 fosfato (M6PR; Mannose 6-Phosphate Receptor) y Rab9 (159, 163). La proteína LAMP-1 está relacionada con mantenimiento del bajo pH (Griffiths 1996) y resulta esencial en el reclutamiento de Rab7 y en la adquisición de las funciones microbicidas del fagosoma (164).

El proceso de maduración del fagosoma finaliza con la formación del fagolisosoma, que retiene LAMP-1 pero no M6PR en membrana vacuolar (159, 163). Este proceso, mediado por Rab7, ocurre a través de la interacción de los endosomas tardíos con lisosomas y es en donde el fagosoma adquiere su máxima capacidad degradativa. El fagolisosoma se caracteriza por presentar una acidez elevada (pH 4.5), por contener un gran número de enzimas hidrolíticas, defensinas y péptidos con actividad bactericida, y por su capacidad de generar especies reactivas del Oxígeno (ROS). Estos mecanismos se complementan y determinan la gran actividad bactericida de este compartimiento.

Las diferentes características del fagosoma durante la maduración, como lo son las diferentes proteínas de superficie o el aumento en la acidez del lumen, se utilizan como herramientas en el estudio de la ruta intracelular (Tabla 4).

Tabla 4. marcadores moleculares de los diferentes compartimientos que componen la vía endocítica/degradativa

Compartimiento	Marcadores	pH
Endosoma/fagosoma temprano	EEA1	6.1 - 6.5
	Transferrina Rab5	
Endosoma/fagosoma tardío	LAMP-1	5.5 - 6.0
	Lysotracker	
	Rab7	
	Rab9	
Lisosoma y fagolisosoma	M6PR	4.5 – 5.4
	LAMP-1	
	Lysotracker	
	Catepsina D	

1.7.2 Rol del pH en la maduración del fagosoma

La acidificación progresiva del fagosoma es uno de los mecanismos más relevantes en el control de microorganismos y está regulado por la v-ATPasa. El pH ácido afecta de manera directa la viabilidad de los microorganismos y de manera indirecta a través de la catálisis de la producción de ROS mediada por la superóxido dismutasa, y por la generación de un entorno óptimo para el funcionamiento de las enzimas degradativas. Varios estudios sugieren que la acidificación del fagosoma no es un proceso destinado únicamente a la eliminación de microorganismos, sino también, que está implicado en el proceso de maduración del fagosoma (165-169).

Algunos patógenos intracelulares no solo sobreviven en fagosomas ácidos sino que incluso necesitan de esta acidificación para sobrevivir en localización intracelular y pueden beneficiarse de la acidificación del fagosoma. En el caso de *Brucella suis* y *Salmonella typhimurium* se ha demostrado que la acidificación del fagosoma favorece la supervivencia y replicación de la bacteria en localización intracelular (170, 171). Estos estudios sugieren que el bajo pH intravesicular determina la generación de una respuesta de estrés en la bacteria que induce la expresión de diferentes genes necesarios para la supervivencia intracelular. En el caso de *Francisella tularensis* la acidificación del fagosoma determina la disociación de hierro de la transferrina aumentando la disponibilidad de este nutriente necesario para la supervivencia y replicación de este patógeno (172). Otros patógenos evitan la maduración del fagosoma mediante la modificación del pH intrafagosomal. Tal es el caso de *Helicobacter pylori*, que expresa ureasa, una enzima que cataliza la hidrólisis de urea a NH_3 y CO_2 , dos moléculas con capacidad buffer que evitan la acidificación intravesicular. Por otro lado está el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, que expresa la proteína *Mycobacterium* tirosin fosfatasa (PtpA) que se une a la subunidad H de la v-ATPasa inhibiendo su tráfico hacia el fagosoma (173).

Diferentes drogas han sido utilizadas para inhibir el gradiente de protones a través de la membrana del fagosoma. Estos se agrupan en tres categorías: inhibidores específicos de v-ATPasas, como la bafilomicina y la concanamicina, que inhiben de manera rápida e irreversible el bombeo de protones al unirse a el dominio V0 específico en la v-ATPasa (174-177); bases débiles, que penetran la membranas cuando no se encuentran protonadas y una vez dentro de las organelas secuestran los protones elevando el pH dentro de la

organela; y los ionóforos que permiten el pasaje de protones en contra del gradiente electroquímico (178-180). La inhibición de la acidificación del fagosoma es un método utilizado para la caracterización de los procesos de transporte dentro de la célula, y para el estudio del rol de la acidificación en el destino intracelular de un patógeno.

1.8 Actividad extracelular bactericida: degranulación y formación de trampas extracelulares

Mientras que la eliminación de patógenos mediada por macrófagos está relacionada fundamentalmente con la fagocitosis de la bacteria y la formación del fagolisosoma, los neutrófilos poseen diferentes estrategias microbicidas. Además de la fagocitosis e inactivación intracelular de las bacterias en los lisosomas en donde diferentes componentes antimicrobianos derivados de los gránulos, el pH y la generación de ROS determinan un entorno bactericida, los neutrófilos tienen la capacidad de reaccionar frente a estímulos bacterianos mediante la liberación de componentes bactericidas al medio extracelular. Existen al menos dos mecanismos microbicidas extracelulares que se describen a continuación, la degranulación y la formación de NETs.

1.8.1 Degranulación

Los neutrófilos tienen un repertorio de gránulos intracelulares que contienen un amplio contenido de componentes bactericidas. Frente a un estímulo adecuado, los gránulos se fusionan con la membrana fagosomal y plasmática, permitiendo la liberación de componentes bactericidas al medio extracelular. Los gránulos también funcionan como depósitos intracelulares de receptores de PAMP, los cuales se fusionan con la membrana plasmática y aumentan el número de receptores en la membrana, potenciando la sensibilidad a diferentes estímulos externos en el neutrófilo (181, 182). La liberación del contenido de los gránulos al medio extracelular es un proceso estrictamente controlado que requiere de la activación de determinados receptores en la membrana plasmática o en la membrana del fagosoma. Su estricto control se debe a que el contenido de los gránulos tiene efectos nocivos tanto sobre los microorganismos como sobre las células del hospedador.

Existen al menos 4 tipos de gránulos en el neutrófilo: los gránulos azurófilos, un tipo especializado de lisosomas secretorios que contienen las moléculas bactericidas más

potentes del neutrófilo como la elastasa (NE), la mieloperoxidasa (MPO), las catepsinas, las defensinas y la generación de ROS; los gránulos específicos y terciarios que contienen lactoferrina, metaloproteasa 9 (gelatinasa B), entre otros componentes (183); y las vesículas secretorias que contienen albumina y diferentes tipos de receptores de PAMP que son almacenados y ante un estímulo son incorporados a la membrana plasmática, influyendo en el modo de interacción del neutrófilo con su entorno. Uno de los receptores incorporados a la membrana por este mecanismo es CR3 (184), el cual tiene múltiples especificidades de ligando y funciones inmunes (185).

El proceso de degranulación puede ser iniciado por la extravasación de neutrófilos en un tejido (186) o por diferentes estímulos bacterianos (187). La fagocitosis de patógenos a través de determinados receptores inicia el proceso de degranulación durante el cual el fagosoma naciente se fusiona con los gránulos azurófilos. Como resultado se produce la formación del fagolisosoma que determina la liberación de parte del contenido de los gránulos azurófilos al medio extracelular (183). Los componentes bactericidas y las citoquinas liberadas generan un entorno hostil que determina la eliminación de patógenos extracelulares y la modulación de la respuesta inmune (188-190). Ciertos patógenos, entre los que se encuentran *Mycobacterium smegmatis* (191, 192) y *Streptococcus pyogenes* (193), evitan la degranulación del neutrófilo mediante el desacoplamiento selectivo de la movilización de gránulos azurófilos y la fagocitosis.

Dentro de los componentes liberados durante la fusión de los gránulos azurófilos con la membrana plasmática se encuentra la enzima β -glucuronidasa. Mediante la medida de la actividad enzimática de esta enzima se puede determinar si ha ocurrido la degranulación frente a un determinado estímulo (194).

1.8.2 NETosis

La formación de trampas extracelulares o NETs (Neutrophil Extracellular Traps) tiene lugar durante un proceso de muerte celular controlado denominado NETosis, el cual se diferencia de la muerte celular por apoptosis o necrosis principalmente en que en este proceso ocurre la liberación de ADN al espacio extracelular. Las NETs son trampas de ADN extracelulares formadas principalmente por fibras de cromatina descondensada que entrelazan componentes bactericidas del neutrófilo. La función principal de las NETs es

inmovilizar e inactivar patógenos extracelulares impidiendo su diseminación en el hospedador (195) a través de su entrapamiento en redes de ADN en las cuales los componentes bactericidas del neutrófilo se encuentran en concentraciones muy elevadas (195). Las NETs son capaces de inmovilizar diferentes tipos de patógenos, entre los que se incluyen bacterias Gram positivas y negativas, levaduras, virus y parásitos, incluso aquellos que poseen un tamaño que impide ser fagocitado (196). La inmovilización ocurre por interacciones a través de las superficies cargadas de los microorganismos y los componentes de las NETs. Las responsables de la actividad bactericida son las proteínas granulares, nucleares y citoplasmáticas entre las que se encuentran la NE, las histonas, la MPO, la cathepsina G, la proteinasa 3 (PP3), la lactoferrina, la calprotectina y péptidos tales como defensinas y el péptido catatónico antimicrobiano LL37 (197). Las proteasas que conforman las NETs (NE y PP3) inactivan patógenos y degradan factores de virulencia (195). Las histonas y el péptido LL37 actúan desintegramando la membrana de los patógenos (198, 199). El ADN, a su vez, ejerce una efecto bactericida mediante la captura de cationes de la superficie del microorganismo y la lisis del patógeno (200).

La formación de NETs se induce por la interacción del neutrófilo con bacterias, hongos, virus y parásitos, o por la interacción con plaquetas activadas, citoquinas proinflamatorias (IL-8) o la presencia de determinados compuestos químicos que activan al neutrófilo (phorbol-12-myristate-13-acetate o PMA) (195, 201-203) (Fig. 3A). El tiempo de formación de las NETs y su composición dependerá del tipo de estímulo que desencadene el proceso de NETosis. Una vez iniciado el proceso de NETosis, la cromatina comienza a descondensarse, y la eucromatina y heterocromatina se mezclan (204). Este proceso está mediado por las enzimas NE y MPO, ambas contenidas en los gránulos azurófilos, que son translocadas al núcleo mediante un mecanismo desconocido (Fig. 3B). Dentro del núcleo la elastasa degrada la histona H1 y las histonas del núcleo histónico octamérico, lo cual lleva a la desorganización del nucleosoma y a la descondensación de la cromatina. Este proceso es acelerado por la MPO (205, 206). Luego se produce la ruptura de la membrana nuclear, permitiendo que la cromatina se expanda dentro de la célula y ocupe todo el espacio citoplasmático. En esta etapa se produce la ruptura de la membrana de los gránulos y la cromatina se mezcla con el contenido bactericida de estos (204) (Fig. 3B). Finalmente, se produce la ruptura de la membrana celular y las NETs son liberadas al espacio extracelular

(207) (Fig. 3C). La generación de ROS es considerada el estímulo iniciador del proceso de NETosis (204). Pero para que la formación de NETs ocurra se requiere tanto de la generación de ROS a través de la NADPH oxidasa como de la activación de la vía autofágica. Estudios recientes demuestran que la inhibición de la autofagia impide la descondensación de la cromatina y la formación de NETs aún en condiciones que determinan la generación de ROS, demostrando que la actividad de la NADPH oxidasa es necesaria pero no suficiente para iniciar el proceso de NETosis (208). Por otro lado estudios recientes demuestran que la formación de NETs puede ser independiente de la generación de ROS (209), demostrando la existencia de diversos mecanismos desencadenantes de este proceso.

Algunos patógenos tienen mecanismos que les permiten evitar la acción bactericida de la NETs, por ejemplo a través de la secreción de endonucleasas que impiden la formación de NETs mediante la degradación del ADN, como es el caso de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* (210). Por otro lado, están los microorganismos como *Streptococcus pneumoniae* cuya cápsula polisacáridica carga a la superficie bacteriana de manera tal que impide su inmovilización (211).

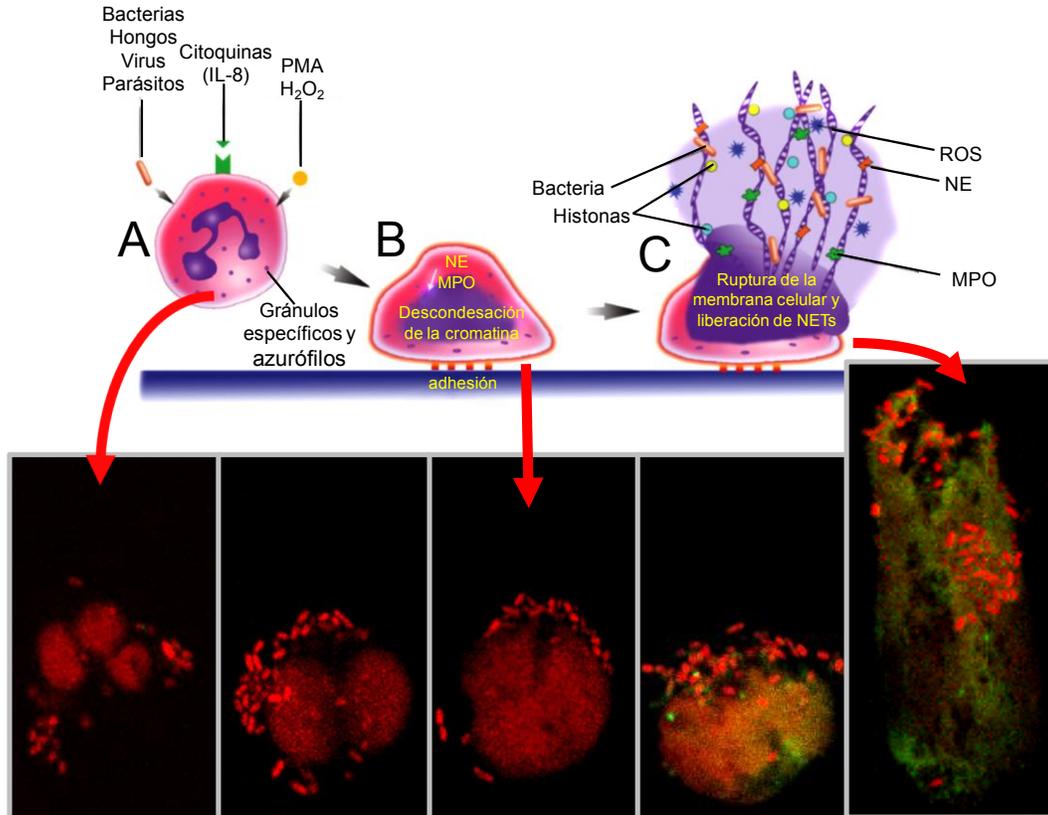


Figura 3. Etapas del proceso de formación de NETs. Diferentes estímulos entre los que se encuentran la interacción con bacterias, hongos, virus, parásitos, citoquinas o compuestos químicos (PMA, H₂O₂) desencadenan el proceso de NETosis (A), el cual comienza con la descondensación de la cromatina mediada por las enzimas elastasa (NE) y mieloperoxidasa (MPO). En esta etapa se produce la ruptura de la membrana nuclear y de las membranas de los gránulos permitiendo el mezclado del contenido de los gránulos con la cromatina (B). En la etapa final, se produce la ruptura de la membrana celular y la liberación de NETs al espacio extracelular inmovilizando a los microorganismos (C). En la figura se muestran imágenes representativas de cada etapa del proceso de NETosis obtenidas por microscopía confocal, en donde se distingue la cromatina (rojo) de la elastasa (verde) que conforman la NETs. Las bacterias se distinguen como cuerpos sólidos color rojo.

1.9 Balsas lipídicas de la membrana celular y su relación con las infecciones bacterianas

1.9.1 Balsas lipídicas

El concepto de balsa lipídica o dominio lipídico (lipid raft) fue introducido hace más de 30 años y surgió de la observación de que el colesterol y los esfingolípidos, junto con

ciertas proteínas de membrana, formaban complejos insolubles luego de la solubilización de la membrana con detergente Tritón X-100 a baja temperatura (212, 213), es por ello que las balsas lipídicas también han sido denominadas membranas resistentes a detergentes “detergent-resistant membranes-DRMs”.

Estos dominios están compuestos principalmente por esfingolípidos, colesterol y proteínas ancladas a dominios lipídicos. Los esfingolípidos se asocian a través de sus ácidos grasos de cadena larga saturada formando agrupaciones muy compactas, con reducido movimiento, estabilizadas por los puentes de hidrógeno que se producen entre los azúcares presentes en las cabezas polares. El colesterol, debido a su alta afinidad por los ácidos grasos saturados, se intercala entre las cadenas hidrocarbonadas de los esfingolípidos promoviendo la transición desde estructuras con reducido movimiento a estructuras líquidas ordenadas (LO) que permiten cierto movimiento lateral (Fig. 4). Estas estructuras en movimiento líquido ordenado son conocidas como dominios lipídicos o balsas lipídicas y se diferencian de la bicapa de fosfolípidos circundante porque ésta última permanece en una fase líquido desordenada, también llamada fluido líquido cristalina (LC), debido a las cadenas insaturadas de los fosfolípidos. Se puede decir que las balsas lipídicas son dominios relativamente ordenados que flotan en la desordenada bicapa fosfolipídica (Fig. 4).

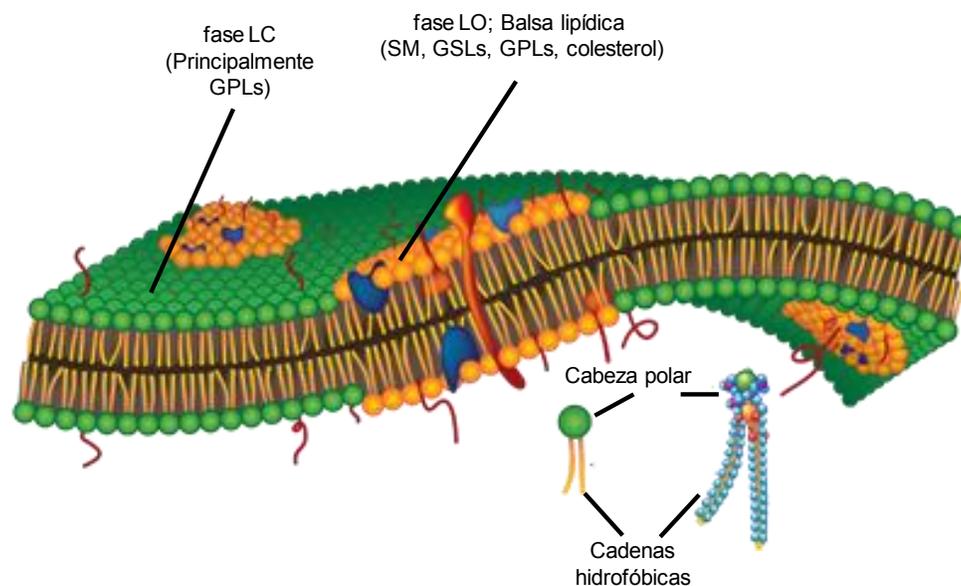


Figura 4. Organización de los lípidos en un microdominio lipídico (balsa lipídica). La organización de los lípidos de membrana depende de su carácter anfipático (cabezas polares

y colas hidrofóbicas), que intenta excluir el mayor número de moléculas de agua del interior de la misma. La forma Líquido cristalina (LC) parece ser la más estable desde el punto de vista termodinámico y está compuesta principalmente por glicerofosfolípidos (GPLs). En la fase “líquido-ordenada” (LO), los esfingolípidos (GSL) junto al colesterol y esfingomielina (SM) forman las balsas lipídicas donde se insertan otras moléculas de forma permanente o dinámica. (Fuente: Jarek Majewski, Understanding the Cell Membrane, <http://www.lanl.gov/science/1663/august2011/story3full.shtml>)

Estudios realizados utilizando microscopía de fuerza atómica indican que las balsas lipídicas miden aproximadamente 50 nm y solo una limitada cantidad de proteínas forman parte de estos dominios. La presencia de caveolina o flotilina define los dominios lipídicos, (212). Los dominios lipídicos, están particularmente enriquecidos en proteínas que participan en transducción de señales (214, 215). Entre ellas se incluyen: 1) Proteínas externas asociadas a la membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI), entre las que se encuentran CD14 (receptor de LPS bacterianos), CD16 (FcγRIIIb), CD48 y CD58 (moléculas de adhesión/coestimulación). Aunque estas proteínas no poseen un dominio transmembrana o citoplasmático, muchas de ellas son capaces de activar la transducción de señales a través de su interacción con moléculas efectoras presentes en las balsas lipídicas. 2) Proteínas transmembrana, por ejemplo, el receptor de IgE (FcεRI). 3) Proteínas citoplasmáticas que se asocian a la cara interna de las balsas lipídicas a través de acilaciones, entre ellas se encuentran las proteínas pertenecientes a la familia de las Ser tirosin quinasas. La acilación es un proceso post-traducciona l ábil y reversible, lo que da a las células la potencialidad de modificar y así controlar la asociación de estas proteínas a las balsas lipídicas. Otro tipo de asociación que se ha observado es por interacciones electrostáticas entre aminoácidos cargados en una proteína y la carga opuesta en la cabeza polar de los fosfolípidos.

1.9.2 Análisis de balsas lipídicas en las membranas celulares: Técnicas bioquímicas y morfológicas

Una técnica popularmente utilizada para estudiar la estructura y función de los dominios lipídicos es la utilización de drogas capaces de extraer el colesterol de la membrana plasmática. El colesterol es una molécula clave necesaria para mantener la integridad de estos dominios, su remoción de la membrana plasmática determina la

dispersión de lípidos y proteínas asociadas a los mismos. Un compuesto comúnmente utilizado para remover el colesterol de membrana es la metil- β -ciclodextrina (M β CD) (216), esta molécula es capaz de disolver lípidos mediante la formación de núcleos hidrofóbicos lo cual conlleva a la depleción del colesterol de la membrana plasmática seguido por la disociación de las proteínas asociadas a los dominios lipídicos (217). El mecanismo que permite a las ciclodextrinas remover el colesterol de las membranas celulares está relacionado con su habilidad para reducir la energía de activación para el reflujo de colesterol. El tratamiento de las células con agentes que unen colesterol, como nistatina o filipina (218, 219), o la inhibición de la síntesis de colesterol con lovastatina, un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (220), son otras de las estrategias utilizadas para desorganizar los dominios lipídicos resultando en la dispersión de las proteínas que pertenecen a los mismos.

También se han llevado a cabo estudios de microscopía confocal para determinar la localización de lípidos y proteínas asociados a éstos dominios lipídicos de la membrana plasmática (221), a través del uso de diferentes marcadores para estas moléculas entre los que se encuentran anticuerpos contra GM1 y flotilina, (222-224).

1.9.3 Dominios lipídicos y señalización intracelular

Hoy se sabe que los dominios lipídicos controlan numerosas interacciones lípido-lípido y proteína-lípido a través de su capacidad de coalescer formando grandes dominios en la membrana plasmática. La coalescencia entre estos dominios permite el acercamiento eventual de ciertas proteínas involucradas en la regulación de procesos complejos como los involucrados en la transducción de señales. Se especula que pequeños dominios lipídicos presentes en una célula en reposo mantienen la señalización proteica en un estado-*off*. La estimulación de la célula induce el reclutamiento de estos pequeños dominios, determinando la formación de dominios especializados en donde los patrones de señalización convergen y se activan (215, 225). Esta señalización vía balsa lipídica también involucra proteínas previamente no asociadas a los dominios lipídicos. El modelo de “coalescencia” en la transducción de señales puede ser ilustrado utilizando como ejemplo la señalización en la célula inmune (226-228). El entrecruzamiento de los receptores de la célula T o los receptores de la célula B determina un aumento en su afinidad por los

dominios lipídicos estabilizando su asociación con estos dominios y promoviendo su coalescencia durante el reconocimiento inmune de la célula T o de la célula B. La agregación de las balsas lipídicas también favorece el acercamiento de las moléculas coestimuladoras CD4 y CD8 a los receptores de antígenos, lo cual es necesario para la correcta activación de la célula T (229).

Los dominios lipídicos no sólo son requeridos para la respuesta inmune adaptativa, también están involucrados en el reconocimiento inmune innato (230). El TLR-4 se asocia con dominios lipídicos luego de la estimulación celular con LPS bacteriano. El TLR-4 no se encuentra normalmente en las balsas lipídicas, pero la unión del LPS al receptor anclado por GPI, CD14, dispara la asociación del TLR-4 con los dominios lipídicos, lo cual dispara la producción de citoquinas que intervienen en el montaje de la respuesta inmune frente al patógeno.

1.9.4 Interacción de dominios lipídicos con microorganismos

Muchas de las señales involucradas en la respuesta inmune adaptativa y en la innata se inician en los dominios lipídicos. Si bien las balsas lipídicas son sitios especializados encargados de mediar diferentes funciones inmunes en la célula mediante la traducción de señales a través de la membrana, algunos microorganismos patógenos, en general de difícil erradicación, han desarrollado estrategias para impedir la generación de estas señales utilizando la maquinaria de los dominios lipídicos para invadir y sobrevivir en las células del huésped, entre los cuales se incluyen virus, bacterias, hongos y parásitos. (215, 231-235). Estos microorganismos interactúan tanto con las proteínas como con los lípidos asociados a estos dominios como sitios de adhesión (Tabla 5).

Tabla 5. Interacción patógeno bacteriano-balsa lipídica. Receptores involucrados.

Patógeno	Sitio de unión/Receptor	Referencia
<i>Helicobacter pylori</i>	GalCer, sulfatido, LacCer, GM3, glicoproteínas	(233, 234)
<i>Shigella</i>	GSL no identificado, CD44	(236)
<i>Salmonella</i>	CD55 (proteína anclada por GPI)	(237)
<i>Borrelia burgdorferi</i>	GalCer, LacCer, Gb3, GD1a, GT1b	(238)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Motivo GalNac β 1-4 Gal en varios GSL	(239)
<i>Mycobacterium</i>	Colesterol	(240, 241)
<i>Brucella</i>	PrPC (cellular prion protein), GM1	(242, 243)
Fim H y Dr (+) <i>Escherichia coli</i>	CD48 (proteína anclada por GPI) CD55, integrina α 5 β 1	(244, 245)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	TLR2, CR3, CD14?	(246)
<i>Francisella tularensis</i>	No identificado	(247)
<i>Bordetella pertussis</i>	CR3	(248, 249)

La entrada a través de los dominios lipídicos confiere ciertas ventajas entre las cuales se encuentran la evasión de la vía degradativa, mediante la evasión de la fusión fagolisosomal, y la puesta en marcha de mecanismos de señalización celular que determinan la internalización no bactericida del patógeno (250).

Hay al menos dos estrategias utilizadas por los patógenos bacterianos para evadir la vía degradativa que dependen de la asociación del patógeno con los dominios lipídicos. En una de ellas la incorporación de componentes de los dominios lipídicos en la membrana del fagosoma determina un tráfico intracelular a través del aparato de Golgi donde el fagosoma secuestra vesículas conteniendo esfingolípidos y colesterol. De esta manera, el fagosoma bacteriano se enmascara simulando un origen biosintético y no entra en la vía degradativa, tal es el caso de *Chlamydia spp* (251). En la otra estrategia el fagosoma enriquecido en componentes de los dominios lipídicos dirige la bacteria hacia compartimientos con características de endosoma temprano y con acceso a la vía de reciclaje. Los dominios lipídicos no están distribuidos estocásticamente a lo largo de la vía endosomal, sino que se encuentran protegidos de la vía degradativa (252) y no se encuentran en endosomas tardíos

y lisosomas. La incorporación de componentes proteicos o lipídicos pertenecientes a dominios lipídicos a la membrana del fagosoma limita la accesibilidad de la bacteria a la maquinaria de procesamiento y presentación de antígenos resultando en la evasión del sistema inmune adaptativo (250). Por ejemplo, los fagosomas conteniendo *Mycobacterium spp*, reclutan la proteína TACO (*tryptophan-aspartate containing coat protein*) que previene la fusión con lisosomas (253). TACO se asocia con la membrana del fagosoma por medio del colesterol reclutado durante la entrada de la bacteria a través de los dominios lipídicos. Esto inhibe la maduración del fagosoma y permite la supervivencia en este tipo de vesículas. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que estas estructuras también cumplen un rol importante en la supervivencia de *B. pertussis* en diferentes tipos celulares (248, 249).

1.10 Antecedentes y objetivos

B. pertussis y *B. parapertussis* son los agentes causales de la tos convulsa. Mientras *B. pertussis* causa la tos convulsa típica, en su modalidad más severa, *B. parapertussis* causa una forma generalmente moderada. A pesar de la gran cobertura de vacunación la incidencia de esta enfermedad ha aumentado alarmantemente en los últimos años en todo el mundo, y ha sido declarada reemergente por la OMS. Datos epidemiológicos recientes indican que se ha verificado un aumento sostenido de la incidencia de *B. parapertussis* en los casos de tos convulsa cuyo comienzo coincide con la introducción de vacuna acelular contra la tos convulsa (25, 30, 42, 254). La vacuna celular clásica, formulada con bacterias inactivadas de *B. pertussis*, induce cierto grado de protección cruzada contra *B. parapertussis*, pero las vacunas acelulares actualmente en uso no generan protección alguna contra esta especie. Estas vacunas acelulares, introducidas en la década del '80, tienen una formulación antigénica limitada a ciertos factores de virulencia purificados de *B. pertussis* y generan un tipo de respuesta inmune fundamentalmente humoral (predominantemente Th2) y son menos protectoras que la vacuna celular contra *B. pertussis*. En lo que respecta a *B. parapertussis* estas vacunas no confieren ninguna protección a pesar de que ambas especies comparten todos los factores de virulencia incluidos en la misma, excepto PTx que solo se expresa en *B. pertussis*. La causa de esta falta de protección cruzada se origina en la presencia del antígeno O unido al lipopolisacárido de *B. parapertussis*, ausente en *B.*

pertussis. Según resultados recientes, la presencia de este antígeno en la superficie de *B. parapertussis* evita el reconocimiento de anticuerpos dirigidos contra antígenos comunes a ambas especies inducidos por la vacuna acelular (26, 126). En términos epidemiológicos esto significa que las personas no están protegidas contra *B. parapertussis* a menos que se hayan infectado recientemente con esta especie. Ambas especies son patógenos estrictamente humanos sin reservorio conocido por fuera del hombre. La clínica y la epidemiología de la enfermedad sugieren que existen portadores con sintomatología leve o incluso asintomáticos. La localización y los mecanismos de persistencia de ambas especies de *Bordetella* en estos portadores se desconocen lo cual ha obstruido el diseño de mejoras en las vacunas y en las estrategias inmuno-preventivas. *B. pertussis* y *B. parapertussis* pueden coexistir en una misma población hasta incluso en un mismo individuo (35, 255, 256). Estudios en modelos murinos sugieren que la infección con *B. pertussis* favorecería la infección con *B. parapertussis* debido fundamentalmente al efecto que PTx tiene sobre el sistema inmune del hospedador (257, 258). Esto, sumado a la falta de protección cruzada sugiere que la situación epidemiológica puede agravarse a medida que avance la utilización masiva de la vacuna acelular contra *B. pertussis*. En este contexto se enmarca la investigación que se llevó a cabo en este trabajo de Tesis. La situación epidemiológica requiere de estrategias preventivas también contra *B. parapertussis*. Nuestra hipótesis de trabajo es que el control de una enfermedad infecciosa de difícil erradicación depende fundamentalmente del conocimiento de los factores involucrados en el establecimiento de la infección aguda y/o crónica, y los mecanismos que hacen posible la aparición de nichos de persistencia para poder abordar el diseño de estrategias preventivas.

En este contexto, en este trabajo se estudió el resultado de la interacción de *B. parapertussis* con células relevantes en el sitio de infección, la eventual existencia de mecanismos que lleven al establecimiento de nichos de persistencia y el rol de anticuerpos específicos contra esta bacteria en dicha interacción. Para llevar a cabo estos estudios se eligieron sistemas *ex vivo* y cultivos primarios de células de origen humanos en aquellos casos en que fue posible, tal fue el caso del estudio de la interacción con neutrófilos y macrófagos. El estudio de la interacción con células epiteliales de pulmón se llevó a cabo *in vitro* empleando una línea celular establecida que ha retenido las características de las

células primarias que le dieron origen (16HBE14o-; células epiteliales bronquiales humanas).

En el **Capítulo 2** se muestran los resultados obtenidos en el estudio de la interacción de *B. parapertussis* con neutrófilos humanos, principales células encargadas del control de patógenos. Estos estudios mostraron que en ausencia de anticuerpos específicos en el sitio de infección la bacteria evade los mecanismos bactericidas del neutrófilo y sobrevive en localización extracelular inhibiendo los mecanismos de eliminación de patógenos extracelulares (degranulación y NETs) y en localización intracelular, mediante la inhibición de la maduración del fagosoma y la permanencia en compartimientos con características de endosoma temprano. También se observó que este patógeno es capaz de retardar la apoptosis inducida por fagocitosis lo que extendería su sobrevivencia en localización intracelular. Por el contrario, la fagocitosis mediada por anticuerpos determina una potente acción celular bactericida. En el **Capítulo 3** se muestran los resultados obtenidos en el estudio de la interacción de *B. parapertussis* con macrófagos humanos, un tipo celular que es nicho de persistencia de varios patógenos bacterianos de difícil erradicación. En estos estudios se demuestra que en ausencia de anticuerpos opsonizantes *B. parapertussis* sobrevive a la interacción con estas células y permanece viable en localización intracelular por períodos de tiempo prolongado, en fagosomas con características de endosoma temprano y con membranas enriquecidas en balsas lipídicas que lo mantiene alejado de la vía degradativa y en los que tiene acceso a nutrientes esenciales, todas características de un nicho de persistencia intracelular y de una bacteria que puede categorizarse como un patógeno intracelular facultativo. En el **Capítulo 4** se muestran los resultados obtenidos en el estudio de interacción de *B. parapertussis* con células respiratorias humanas, y su eventual implicancia en la persistencia de este patógeno en el hospedador. Estos estudios mostraron que *B. parapertussis* invade células del epitelio respiratorio, sobrevive en localización intracelular y es capaz de repoblar el medio extracelular. Un aspecto particularmente relevante es que *B. parapertussis* inhibe la secreción de interleuquinas proinflamatorias que podrían activar células inmunes e inducir actividad celular bactericida en el sitio de colonización. En el **Capítulo 5** se presenta la discusión general de los resultados obtenidos.

1.11 Referencias

1. Cone TC, Jr. 1970. Whooping cough is first described as a disease sui generis by Baillou in 1640. Pediatrics. 46:522
2. Bordet J, and Gengou O. 1906. Le microbe de la coqueluche. Ann Inst Pasteur Microbiol. 20:48-68.
3. Ledermann DW. 2004. Breve historia de la *Bordetella pertussis*, una elusiva damisela. Revista chilena de infectología. 21:241-246.
4. Eldering G, and Kendrick P. 1938. *Bacillus Para-Pertussis*: A Species Resembling Both *Bacillus Pertussis* and *Bacillus Bronchisepticus* but Identical with Neither. J Bacteriol. 35:561-572.
5. Miller JJ, Saito TM, and Silverberg RJ. 1941. Parapertussis. J. Pediatr. 19:229-240.
6. Bruckner IE, and Evans DG. 1939. The toxin of *B. parapertussis* and the relationship of this organism to *H. pertussis* and *Br. bronchiseptica*. J. Pathol. Bacteriol. 48:67-78.
7. Eldering G. 1942. A study of the antigenic properties of *Hemophilus pertussis* and related organisms: II. Protection tests in mice. American Journal of Epidemiology. 36:294-302.
8. Zuelzer WW, and Wheeler WE. 1946. Parapertussis pneumonia. J Pediatr. 29:493-497.
9. Rambar AC, Howell K, and Denenholz EJ. 1947. Pertussis-parapertussis vaccine. J Pediatr. 31:556-559.
10. Kohler-Kubelka N. 1967. The effect of the addition of *Bordetella parapertussis* suspensions on the protective power of the pertussis component of diphtheria-tetanus-pertussis vaccines. J Hyg (Lond). 65:435-438.
11. Muller AS, Leeuwenburg J, and Pratt DS. 1986. Pertussis: epidemiology and control. Bull World Health Organ. 64:321-331.
12. Cherry JD, and Seaton BL. 2012. Patterns of *Bordetella parapertussis* Respiratory Illnesses: 2008-2010. Clin Infect Dis. 54:534-537.
13. Hegerle N, and Guiso N. 2013. Epidemiology of whooping cough & typing of *Bordetella pertussis*. Future Microbiol. 8:1391-1403.
14. Kerr JR, and Preston NW. 2001. Current pharmacotherapy of pertussis. Expert Opin Pharmacother. 2:1275-1282.
15. He Q, Viljanen MK, Nikkari S, Lyytikainen R, and Mertsola J. 1994. Outcomes of *Bordetella pertussis* infection in different age groups of an immunized population. J Infect Dis. 170:873-877.
16. Heininger U, Stehr K, Christenson P, and Cherry JD. 1999. Evidence of efficacy of the Lederle/Takeda acellular pertussis component diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine but not the Lederle whole-cell component diphtheria and

- tetanus toxoids and pertussis vaccine against *Bordetella parapertussis* infection. Clin Infect Dis. 28:602-604.
17. Stehr K, Cherry JD, Heininger U, Schmitt-Grohe S, Überall M, Laussucq S, Eckhardt T, Meyer M, Engelhardt R, and Christenson P. 1998. A comparative efficacy trial in Germany in infants who received either the Lederle/Takeda acellular pertussis component DTP (DTaP) vaccine, the Lederle whole-cell component DTP vaccine, or DT vaccine. Pediatrics. 101:1-11.
 18. Mastrantonio P, Giuliano M, Stefanelli P, Sofia T, De Marzi L, Tarabini G, Quarto M, and Moiraghi A. 1997. *Bordetella parapertussis* infections. Dev Biol Stand. 89:255-259.
 19. He Q, Viljanen MK, Arvilommi H, Aittanen B, and Mertsola J. 1998. Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population. JAMA. 280:635-637.
 20. Bottero D, Gaillard ME, Errea A, Moreno G, Zurita E, Pianciola L, Rumbo M, and Hozbor D. 2013. Outer membrane vesicles derived from *Bordetella parapertussis* as an acellular vaccine against *Bordetella parapertussis* and *Bordetella pertussis* infection. Vaccine. 31:5262-5268.
 21. Bergfors E, Trollfors B, Taranger J, Lagergard T, Sundh V, and Zackrisson G. 1999. Parapertussis and pertussis: differences and similarities in incidence, clinical course, and antibody responses. Int J Infect Dis. 3:140-146.
 22. Harnden A, Grant C, Harrison T, Perera R, Brueggemann AB, Mayon-White R, and Mant D. 2006. Whooping cough in school age children with persistent cough: prospective cohort study in primary care. BMJ. 333:174-177.
 23. Zhang Q, Yin Z, Li Y, Luo H, Shao Z, Gao Y, Xu L, Kan B, Lu S, Zhang Y, Li M, Liu M, Yao P, Zhao Z, and He Q. 2014. Prevalence of asymptomatic *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections among school children in China as determined by pooled real-time PCR: a cross-sectional study. Scand J Infect Dis. 46:280-287.
 24. Mattoo S, and Cherry JD. 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. Clin Microbiol Rev. 18:326-382.
 25. Liese JG, Renner C, Stojanov S, and Belohradsky BH. 2003. Clinical and epidemiological picture of B pertussis and B parapertussis infections after introduction of acellular pertussis vaccines. Arch Dis Child. 88:684-687.
 26. Zhang X, Rodriguez ME, and Harvill ET. 2009. O antigen allows *B. parapertussis* to evade *B. pertussis* vaccine-induced immunity by blocking binding and functions of cross-reactive antibodies. PLoS One. 4:e6989.
 27. David S, van Furth R, and Mooi FR. 2004. Efficacies of whole cell and acellular pertussis vaccines against *Bordetella parapertussis* in a mouse model. Vaccine. 22:1892-1898.

28. Long GH, Karanikas AT, Harvill ET, Read AF, and Hudson PJ. 2010. Acellular pertussis vaccination facilitates *Bordetella parapertussis* infection in a rodent model of bordetellosis. *Proc Biol Sci.* 277:2017-2025.
29. Lautrop H. 1971. Epidemics of parapertussis. 20 years' observations in Denmark. *Lancet.* 1:1195-1198.
30. Borska K, and Simkovicova M. 1972. Studies on the circulation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in populations of children. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 16:159-172.
31. Mastrantonio P, Stefanelli P, Giuliano M, Herrera Rojas Y, Ciofi degli Atti M, Anemona A, and Tozzi AE. 1998. *Bordetella parapertussis* infection in children: epidemiology, clinical symptoms, and molecular characteristics of isolates. *J Clin Microbiol.* 36:999-1002.
32. Weber C, Boursaux-Eude C, Coralie G, Caro V, and Guiso N. 2001. Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years. *J Clin Microbiol.* 39:4396-4403.
33. Kourova N, Caro V, Weber C, Thiberge S, Chuprinina R, Tseneva G, and Guiso N. 2003. Comparison of the *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* isolates circulating in Saint Petersburg between 1998 and 2000 with Russian vaccine strains. *J Clin Microbiol.* 41:3706-3711.
34. Bokhari H, Said F, Syed MA, Mughal A, Kazi YF, Heuvelman K, and Mooi FR. 2011. Whooping cough in Pakistan: *Bordetella pertussis* vs *Bordetella parapertussis* in 2005-2009. *Scand J Infect Dis.* 43:818-820.
35. Zouari A, Smaoui H, Brun D, Njamkepo E, Sghaier S, Zouari E, Felix R, Menif K, Ben Jaballah N, Guiso N, and Kechrid A. 2012. Prevalence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections in Tunisian hospitalized infants: results of a 4-year prospective study. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 72:303-317.
36. Spicer KB, Salamon D, Cummins C, Leber A, and Marcon MJ. 2014. Occurrence of Three *Bordetella* Species during an Outbreak of Cough Illness in Ohio: Epidemiology, Clinical Features, Laboratory Findings, and Antimicrobial Susceptibility. *Pediatr Infect Dis J.* 33:e162-167.
37. Sato Y, and Sato H. 1999. Development of acellular pertussis vaccines. *Biologicals.* 27:61-69.
38. Riffelmann M, Littmann M, Hulsse C, Hellenbrand W, and Wirsing von König CH. 2008. Pertussis: not only a disease of childhood. *Dtsch Arztebl Int.* 105:623-628.
39. Heininger U, Stehr K, Schmitt-Grohe S, Lorenz C, Rost R, Christenson PD, Uberall M, and Cherry JD. 1994. Clinical characteristics of illness caused by *Bordetella parapertussis* compared with illness caused by *Bordetella pertussis*. *Pediatr Infect Dis. J* 13:306-309.
40. Correa-Londono A, and Ellner PD. Case report. *Clinical Microbiology Newsletter.* 2:4.

41. Wallihan R, Selvarangan R, Marcon M, Koranyi K, Spicer K, and Jackson MA. 2013. *Bordetella parapertussis* bacteremia: two case reports. *Pediatr Infect Dis J*. 32:796-798.
42. Watanabe M, and Nagai M. 2004. Whooping cough due to *Bordetella parapertussis*: an unresolved problem. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2:447-454.
43. Goodnow RA. 1980. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Rev*. 44:722-738.
44. Musser JM, Hewlett EL, Pepler MS, and Selander RK. 1986. Genetic diversity and relationships in populations of *Bordetella* spp. *J Bacteriol*. 166:230-237.
45. Amador C, Chiner E, Calpe JL, Ortiz de la Table V, Martinez C, and Pasquau F. 1991. Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a patient with AIDS. *Rev Infect Dis*. 13:771-772.
46. Belen O, Campos JM, Cogen PH, and Jantusch BA. 2003. Postsurgical meningitis caused by *Bordetella bronchiseptica*. *Pediatr Infect Dis J*. 22:380-381.
47. Diavatopoulos DA, Cummings CA, Schouls LM, Brinig MM, Relman DA, and Mooi FR. 2005. *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. *PLoS Pathog*. 1:e45.
48. Gueirard P, Weber C, Le Coustumier A, and Guiso N. 1995. Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. *J Clin Microbiol*. 33:2002-2006.
49. Lorenzo-Pajuelo B, Villanueva JL, Rodriguez-Cuesta J, Vergara-Irigaray N, Bernabeu-Wittel M, Garcia-Curiel A, and Martinez de Tejada G. 2002. Cavitory pneumonia in an AIDS patient caused by an unusual *Bordetella bronchiseptica* variant producing reduced amounts of pertactin and other major antigens. *J Clin Microbiol*. 40:3146-3154.
50. Woodard DR, Cone LA, and Fostvedt K. 1995. *Bordetella bronchiseptica* infection in patients with AIDS. *Clin Infect Dis*. 20:193-194.
51. Woolfrey BF, and Moody JA. 1991. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin Microbiol Rev*. 4:243-255.
52. Lindquist SW, Weber DJ, Mangum ME, Hollis DG, and Jordan J. 1995. *Bordetella holmesii* sepsis in an asplenic adolescent. *Pediatr Infect Dis J*. 14:813-815.
53. Morris JT, and Myers M. 1998. Bacteremia due to *Bordetella holmesii*. *Clin Infect Dis*. 27:912-913.
54. Tang YW, Hopkins MK, Kolbert CP, Hartley PA, Severance PJ, and Persing DH. 1998. *Bordetella holmesii*-like organisms associated with septicemia, endocarditis, and respiratory failure. *Clin Infect Dis*. 26:389-392.
55. Weyant RS, Hollis DG, Weaver RE, Amin MF, Steigerwalt AG, O'Connor SP, Whitney AM, Daneshvar MI, Moss CW, and Brenner DJ. 1995. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J Clin Microbiol*. 33:1-7.

56. Hoppe JE. 1999. Update on respiratory infection caused by *Bordetella parapertussis*. *Pediatr Infect Dis J*. 18:375-381.
57. Cummings CA, Brinig MM, Lepp PW, van de Pas S, and Relman DA. 2004. *Bordetella* species are distinguished by patterns of substantial gene loss and host adaptation. *J Bacteriol*. 186:1484-1492.
58. Gerlach G, von Wintzingerode F, Middendorf B, and Gross R. 2001. Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Microbes Infect*. 3:61-72.
59. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MT, Churcher CM, Bentley SD, Mungall KL, Cerdeno-Tarraga AM, Temple L, James K, Harris B, Quail MA, Achtman M, Atkin R, Baker S, Basham D, Bason N, Cherevach I, Chillingworth T, Collins M, Cronin A, Davis P, Doggett J, Feltwell T, Goble A, Hamlin N, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, Leather S, Moule S, Norberczak H, O'Neil S, Ormond D, Price C, Rabinowitsch E, Rutter S, Sanders M, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Unwin L, Whitehead S, Barrell BG, and Maskell DJ. 2003. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet*. 35:32-40.
60. van der Zee A, Mooi F, Van Embden J, and Musser J. 1997. Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp.: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences. *J Bacteriol*. 179:6609-6617.
61. Hester SE, Park J, Goodfield LL, Feaga HA, Preston A, and Harvill ET. 2013. Horizontally acquired divergent O-antigen contributes to escape from cross-immunity in the classical bordetellae. *BMC Evol Biol*. 13:209.
62. Marchitto KS, Smith SG, Loch C, and Keith JM. 1987. Nucleotide sequence homology to pertussis toxin gene in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *Infect Immun*. 55:497-501.
63. Finn TM, and Stevens LA. 1995. Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol Microbiol*. 16:625-634.
64. Arico B, Miller JF, Roy C, Stibitz S, Monack D, Falkow S, Gross R, and Rappuoli R. 1989. Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:6671-6675.
65. Cotter PA, and Miller JF. 1994. BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect Immun*. 62:3381-3390.
66. Cotter PA, and DiRita VJ. 2000. Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu Rev Microbiol*. 54:519-565.
67. Cotter PA, and Jones AM. 2003. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol*. 11:367-373.

68. Stibitz S, and Yang MS. 1991. Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the vir locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 173:4288-4296.
69. Boucher PE, and Stibitz S. 1995. Synergistic binding of RNA polymerase and BvgA phosphate to the pertussis toxin promoter of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 177:6486-6491.
70. Deora R, Bootsma HJ, Miller JF, and Cotter PA. 2001. Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol Microbiol.* 40:669-683.
71. Melton AR, and Weiss AA. 1993. Characterization of environmental regulators of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 61:807-815.
72. Scarlato V, Arico B, Prugnola A, and Rappuoli R. 1991. Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J* 10:3971-3975.
73. Veal-Carr WL, and Stibitz S. 2005. Demonstration of differential virulence gene promoter activation in vivo in *Bordetella pertussis* using RIVET. *Mol Microbiol.* 55:788-798.
74. Cummings CA, Bootsma HJ, Relman DA, and Miller JF. 2006. Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by *Bordetella* BvgAS. *J Bacteriol.* 188:1775-1785.
75. Kinnear SM, Boucher PE, Stibitz S, and Carbonetti NH. 1999. Analysis of BvgA activation of the pertactin gene promoter in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 181:5234-5241.
75. Kinnear SM, Boucher PE, Stibitz S, and Carbonetti NH. 1999. Analysis of BvgA activation of the pertactin gene promoter in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 181:5234-5241.
76. Basler M, Masin J, Osicka R, and Sebo P. 2006. Pore-forming and enzymatic activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes. *Infect Immun.* 74:2207-2214.
77. Harvill ET, Cotter PA, Yuk MH, and Miller JF. 1999. Probing the function of *Bordetella bronchiseptica* adenylate cyclase toxin by manipulating host immunity. *Infect Immun.* 67:1493-1500.
78. Welch RA. 1991. Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol.* 5:521-528.
79. Rose T, Sebo P, Bellalou J, and Ladant D. 1995. Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem.* 270:26370-26376.
80. 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*.

81. Hewlett EL, Gordon VM, McCaffery JD, Sutherland WM, and Gray MC. 1989. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Identification and purification of the holotoxin molecule. *J Biol Chem.* 264:19379-19384.
82. Rogel A, Schultz JE, Brownlie RM, Coote JG, Parton R, and Hanski E. 1989. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: purification and characterization of the toxic form of the enzyme. *Embo J.* 8:2755-2760.
83. Rogel A, Meller R, and Hanski E. 1991. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. The relationship between induction of cAMP and hemolysis. *J Biol Chem.* 266:3154-3161.
84. Guermonprez P, Khelef N, Blouin E, Rieu P, Ricciardi-Castagnoli P, Guiso N, Ladant D, and Leclerc C. 2001. The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med.* 193:1035-1044.
85. El-Azami-El-Idrissi M, Bauche C, Loucka J, Osicka R, Sebo P, Ladant D, and Leclerc C. 2003. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J Biol Chem.* 278:38514-38521.
86. Wolff J, Cook GH, Goldhammer AR, and Berkowitz SA. 1980. Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:3841-3844.
87. Confer DL, Slungaard AS, Graf E, Panter SS, and Eaton JW. 1984. *Bordetella* adenylate cyclase toxin: entry of bacterial adenylate cyclase into mammalian cells. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* 17:183-187.
88. Hanski E, and Farfel Z. 1985. *Bordetella pertussis* invasive adenylate cyclase. Partial resolution and properties of its cellular penetration. *J Biol Chem.* 260:5526-5532.
89. Hanski E. 1989. Invasive adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Trends Biochem Sci.* 14:459-463.
90. Moullem M, Farfel Z, and Hanski E. 1990. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: intoxication of host cells by bacterial invasion. *Infect Immun.* 58:3759-3764.
91. Confer DL, and Eaton JW. 1982. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science.* 217:948-950.
92. Khelef N, Zychlinsky A, and Guiso N. 1993. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun.* 61:4064-4071.
93. Pearson RD, Symes P, Conboy M, Weiss AA, and Hewlett EL. 1987. Inhibition of monocyte oxidative responses by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J Immunol.* 139:2749-2754.
94. Friedman RL, Fiederlein RL, Glasser L, and Galgiani JN. 1987. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: effects of affinity-purified adenylate cyclase on human polymorphonuclear leukocyte functions. *Infect Immun.* 55:135-140.
95. Kamanova J, Kofronova O, Masin J, Genth H, Vojtova J, Linhartova I, Benada O, Just I, and Sebo P. 2008. Adenylate cyclase toxin subverts phagocyte function by RhoA inhibition and unproductive ruffling. *J Immunol.* 181:5587-5597.

96. Betsou F, Sebo P, and Guiso N. 1995. The C-terminal domain is essential for protective activity of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun.* 63:3309-3315.
97. Parton R. 1999. Review of the biology of *Bordetella pertussis*. *Biologicals.* 27:71-76.
98. Pittman M. 1984. The concept of pertussis as a toxin-mediated disease. *Pediatr Infect Dis.* 3:467-486.
99. Gronow S, and Brade H. 2001. Lipopolysaccharide biosynthesis: which steps do bacteria need to survive? *J Endotoxin Res.* 7:3-23.
100. Schaeffer LM, McCormack FX, Wu H, and Weiss AA. 2004. *Bordetella pertussis* lipopolysaccharide resists the bactericidal effects of pulmonary surfactant protein A. *J Immunol.* 173:1959-1965.
101. van den Akker WM. 1998. Lipopolysaccharide expression within the genus *Bordetella*: influence of temperature and phase variation. *Microbiology.* 144:1527-1535.
102. 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.
103. Watanabe M, Takimoto H, Kumazawa Y, and Amano K. 1990. Biological properties of lipopolysaccharides from *Bordetella* species. *J Gen Microbiol.* 136:489-493.
104. Ayme G, Caroff M, Chaby R, Haeffner-Cavaillon N, Le Dur A, Moreau M, Muset M, Mynard MC, Roumiantzeff M, Schulz D, and Szabo L. 1980. Biological activities of fragments derived from *Bordetella pertussis* endotoxin: isolation of a nontoxic, Shwartzman-negative lipid A possessing high adjuvant properties. *Infect Immun.* 27:739-745.
105. Trent MS, Stead CM, Tran AX, and Hankins JV. 2006. Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. *J Endotoxin Res.* 12:205-223.
106. Takada H, and Kotani S. 1989. Structural requirements of lipid A for endotoxicity and other biological activities. *Crit Rev Microbiol.* 16:477-523.
107. Palsson-McDermott EM, and O'Neill LA. 2004. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology.* 113:153-162.
108. Geurtsen J, Angevaere E, Janssen M, Hamstra HJ, ten Hove J, de Haan A, Kuipers B, Tommassen J, and van der Ley P. 2007. A novel secondary acyl chain in the lipopolysaccharide of *Bordetella pertussis* required for efficient infection of human macrophages. *J Biol Chem.* 282:37875-37884.
109. Miller SI, Ernst RK, and Bader MW. 2005. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol.* 3:36-46.
110. Dixon DR, and Darveau RP. 2005. Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid a structure. *J Dent Res.* 84:584-595.
111. de Gouw D, Diavatopoulos DA, Bootsma HJ, Hermans PW, and Mooi FR. 2011. Pertussis: a matter of immune modulation. *FEMS Microbiol Rev.* 35:441-474.

112. Marr N, Tirsoaga A, Blanot D, Fernandez R, and Caroff M. 2008. Glucosamine found as a substituent of both phosphate groups in *Bordetella* lipid A backbones: role of a BvgAS-activated ArnT ortholog. *J Bacteriol.* 190:4281-4290.
113. Tirsoaga A, El Hamidi A, Perry MB, Caroff M, and Novikov A. 2007. A rapid, small-scale procedure for the structural characterization of lipid A applied to *Citrobacter* and *Bordetella* strains: discovery of a new structural element. *J Lipid Res.* 48:2419-2427.
114. Wolfe DN, Buboltz AM, and Harvill ET. 2009. Inefficient Toll-like receptor-4 stimulation enables *Bordetella parapertussis* to avoid host immunity. *PLoS One.* 4:e4280.
115. Mann PB, Wolfe D, Latz E, Golenbock D, Preston A, and Harvill ET. 2005. Comparative toll-like receptor 4-mediated innate host defense to *Bordetella* infection. *Infect Immun.* 73:8144-8152.
116. Wolfe DN, Kirimanjeswara GS, and Harvill ET. 2005. Clearance of *Bordetella parapertussis* from the lower respiratory tract requires humoral and cellular immunity. *Infect Immun.* 73:6508-6513.
117. Isobe T, White KA, Allen AG, Peacock M, Raetz CR, and Maskell DJ. 1999. *Bordetella pertussis* waaA encodes a monofunctional 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase that can complement an *Escherichia coli* waaA mutation. *J Bacteriol.* 181:2648-2651.
118. Preston A, Allen AG, Cadisch J, Thomas R, Stevens K, Churcher CM, Badcock KL, Parkhill J, Barrell B, and Maskell DJ. 1999. Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *Bordetellae*. *Infect Immun.* 67:3763-3767.
119. Preston A, and Maskell D. 2001. The molecular genetics and role in infection of lipopolysaccharide biosynthesis in the *Bordetellae*. *J Endotoxin Res.* 7:251-261.
120. Allen A, and Maskell D. 1996. The identification, cloning and mutagenesis of a genetic locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 19:37-52.
121. Allen AG, Isobe T, and Maskell DJ. 1998. Identification and cloning of waaF (rfaF) from *Bordetella pertussis* and use to generate mutants of *Bordetella* spp. with deep rough lipopolysaccharide. *J Bacteriol.* 180:35-40.
122. Duerr CU, Zenk SF, Chassin C, Pott J, Gutle D, Hensel M, and Hornef MW. 2009. O-antigen delays lipopolysaccharide recognition and impairs antibacterial host defense in murine intestinal epithelial cells. *PLoS Pathog.* 5:e1000567.
123. Engels W, Endert J, Kamps MA, and van Boven CP. 1985. Role of lipopolysaccharide in opsonization and phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 49:182-189.
124. Burns VC, Pishko EJ, Preston A, Maskell DJ, and Harvill ET. 2003. Role of *Bordetella* O antigen in respiratory tract infection. *Infect Immun.* 71:86-94.
125. Goebel EM, Wolfe DN, Elder K, Stibitz S, and Harvill ET. 2008. O antigen protects *Bordetella parapertussis* from complement. *Infect Immun.* 76:1774-1780.

126. Zhang X, Goebel EM, Rodriguez ME, Preston A, and Harvill ET. 2009. The O antigen is a critical antigen for the development of a protective immune response to *Bordetella parapertussis*. *Infect Immun.* 77:5050-5058.
127. Wolfe DN, Goebel EM, Bjornstad ON, Restif O, and Harvill ET. 2007. The O antigen enables *Bordetella parapertussis* to avoid *Bordetella pertussis*-induced immunity. *Infect Immun.* 75:4972-4979.
128. van den Berg BM, Beekhuizen H, Mooi FR, and van Furth R. 1999. Role of antibodies against *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to human bronchial epithelial cells. *Infect Immun.* 67:1050-1055.
129. van den Akker WM. 1998. The filamentous hemagglutinin of *Bordetella parapertussis* is the major adhesin in the phase-dependent interaction with NCI-H292 human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 252:128-133.
130. van den Berg BM, Beekhuizen H, Willems RJ, Mooi FR, 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.
131. Luker KE, Tyler AN, Marshall GR, and Goldman WE. 1995. Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in pertussis. *Mol Microbiol.* 16:733-743.
132. Cowell JL, Hewlett EL, and Manclark CR. 1979. Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 25:896-901.
133. Walker KE, and Weiss AA. 1994. Characterization of the dermonecrotic toxin in members of the genus *Bordetella*. *Infect Immun.* 62:3817-3828.
134. McGuirk P, and Mills KH. 2000. Direct anti-inflammatory effect of a bacterial virulence factor: IL-10-dependent suppression of IL-12 production by filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Eur J Immunol.* 30:415-422.
135. McGuirk P, McCann C, and Mills KH. 2002. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med.* 195:221-231.
136. Hickey FB, Brereton CF, and Mills KH. 2008. Adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* inhibits TLR-induced IRF-1 and IRF-8 activation and IL-12 production and enhances IL-10 through MAPK activation in dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 84:234-243.
137. Ross PJ, Lavelle EC, Mills KH, and Boyd AP. 2004. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* synergizes with lipopolysaccharide to promote innate interleukin-10 production and enhances the induction of Th2 and regulatory T cells. *Infect Immun.* 72:1568-1579.
138. Boyd AP, Ross PJ, Conroy H, Mahon N, Lavelle EC, and Mills KH. 2005. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin modulates innate and adaptive immune responses: distinct roles for acylation and enzymatic activity in immunomodulation and cell death. *J Immunol.* 175:730-738.

139. Fedele G, Celestino I, Spensieri F, Frasca L, Nasso M, Watanabe M, Remoli ME, Coccia EM, Altieri F, and Ausiello CM. 2007. Lipooligosaccharide from *Bordetella pertussis* induces mature human monocyte-derived dendritic cells and drives a Th2 biased response. *Microbes Infect.* 9:855-863.
140. Fedele G, Nasso M, Spensieri F, Palazzo R, Frasca L, Watanabe M, and Ausiello CM. 2008. Lipopolysaccharides from *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* differently modulate human dendritic cell functions resulting in divergent prevalence of Th17-polarized responses. *J Immunol.* 181:208-216.
141. Wolfe DN, Karanikas AT, Hester SE, Kennett MJ, and Harvill ET. 2010. IL-10 induction by *Bordetella parapertussis* limits a protective IFN-gamma response. *J Immunol.* 184:1392-1400.
142. Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovics ML, Harvill ET, and Rodriguez ME. 2010. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun.* 78:907-913.
143. Hackstadt T. 2000. Redirection of host vesicle trafficking pathways by intracellular parasites. *Traffic.* 1:93-99.
144. Meresse S, Steele-Mortimer O, Moreno E, Desjardins M, Finlay B, and Gorvel JP. 1999. Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death. *Nat Cell Biol.* 1:E183-188.
145. Alexander J, Satoskar AR, and Russell DG. 1999. Leishmania species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci.* 112:2993-3002.
146. Cianciotto NP. 2001. Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol.* 291:331-343.
147. Duclos S, and Desjardins M. 2000. Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. *Cell Microbiol.* 2:365-377.
148. Ibarra JA, and Steele-Mortimer O. 2009. Salmonella--the ultimate insider. Salmonella virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell Microbiol.* 11:1579-1586.
149. Roop RM, 2nd, and Caswell CC. 2013. Bacterial persistence: finding the "sweet spot". *Cell Host Microbe.* 14:119-120.
150. de Chastellier C. 2009. The many niches and strategies used by pathogenic mycobacteria for survival within host macrophages. *Immunobiology.* 214:526-542.
151. Huynh KK, and Grinstein S. 2007. Regulation of vacuolar pH and its modulation by some microbial species. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71:452-462.
152. Palm NW, and Medzhitov R. 2009. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev.* 227:221-233.
153. Rhee SH. 2011. Basic and translational understandings of microbial recognition by toll-like receptors in the intestine. *J Neurogastroenterol Motil.* 17:28-34.
154. Tjelle TE, Lovdal T, and Berg T. 2000. Phagosome dynamics and function. *Bioessays.* 22:255-263.

155. Beron W, Alvarez-Dominguez C, Mayorga L, and Stahl PD. 1995. Membrane trafficking along the phagocytic pathway. *Trends Cell Biol.* 5:100-104.
156. Flannagan RS, Cosio G, and Grinstein S. 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol.* 7:355-366.
157. Desjardins M, Celis JE, van Meer G, Dieplinger H, Jahraus A, Griffiths G, and Huber LA. 1994. Molecular characterization of phagosomes. *J Biol Chem.* 269:32194-32200.
158. Stenmark H, and Olkkonen VM. 2001. The Rab GTPase family. *Genome Biol.* 2:REVIEWS3007.
159. Flannagan RS, Jaumouille V, and Grinstein S. 2012. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol.* 7:61-98.
160. Lawe DC, Patki V, Heller-Harrison R, Lambright D, and Corvera S. 2000. The FYVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 binding. Critical role of this dual interaction for endosomal localization. *J Biol Chem.* 275:3699-3705.
161. Sasaki T, Sasaki J, Sakai T, Takasuga S, and Suzuki A. 2007. The physiology of phosphoinositides. *Biol Pharm Bull.* 30:1599-1604.
162. Fairn GD, and Grinstein S. 2012. How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol.* 33:397-405.
163. Vieira OV, Botelho RJ, and Grinstein S. 2002. Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J.* 366:689-704.
164. Huynh KK, Eskelinen EL, Scott CC, Malevanets A, Saftig P, and Grinstein S. 2007. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *Embo J.* 26:313-324.
165. van Deurs B, Holm PK, and Sandvig K. 1996. Inhibition of the vacuolar H(+)-ATPase with bafilomycin reduces delivery of internalized molecules from mature multivesicular endosomes to lysosomes in HEp-2 cells. *Eur J Cell Biol.* 69:343-350.
166. Bayer N, Schober D, Prehla E, Murphy RF, Blaas D, and Fuchs R. 1998. Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection. *J Virol.* 72:9645-9655.
167. van Weert AW, Dunn KW, Geuze HJ, Maxfield FR, and Stoorvogel W. 1995. Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump. *J Cell Biol.* 130:821-834.
168. D'Arrigo A, Bucci C, Toh BH, and Stenmark H. 1997. Microtubules are involved in bafilomycin A1-induced tubulation and Rab5-dependent vacuolation of early endosomes. *Eur J Cell Biol.* 72:95-103.
169. Russell DG. 2001. Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:569-577.

170. Starr T, Ng TW, Wehrly TD, Knodler LA, and Celli J. 2008. Brucella intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic*. 9:678-694.
171. Rathman M, Sjaastad MD, and Falkow S. 1996. Acidification of phagosomes containing *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Infect Immun*. 64:2765-2773.
172. Fortier AH, Leiby DA, Narayanan RB, Asafodjei E, Crawford RM, Nacy CA, and Meltzer MS. 1995. Growth of *Francisella tularensis* LVS in macrophages: the acidic intracellular compartment provides essential iron required for growth. *Infect Immun*. 63:1478-1483.
173. Wong D, Bach H, Sun J, Hmama Z, and Av-Gay Y. 2011. Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:19371-19376.
174. Bowman BJ, McCall ME, Baertsch R, and Bowman EJ. 2006. A model for the proteolipid ring and bafilomycin/concanamycin-binding site in the vacuolar ATPase of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem*. 281:31885-31893.
175. Bowman EJ, Siebers A, and Altendorf K. 1988. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:7972-7976.
176. Wang Y, Inoue T, and Forgac M. 2005. Subunit a of the yeast V-ATPase participates in binding of bafilomycin. *J Biol Chem*. 280:40481-40488. Epub 2005 Oct 40410.
177. Weisz OA. 2003. Acidification and protein traffic. *Int Rev Cytol*. 226:259-319.
178. Pohlmann R, Kruger S, Hasilik A, and von Figura K. 1984. Effect of monensin on intracellular transport and receptor-mediated endocytosis of lysosomal enzymes. *Biochem J*. 217:649-658.
179. Reijngoud DJ, Oud PS, and Tager JM. 1976. Effect of ionophores on intralysosomal pH. *Biochim Biophys Acta*. 448:303-313.
180. Tartakoff AM. 1983. Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin. *Cell*. 32:1026-1028.
181. Gutkind JS, and Robbins KC. 1989. Translocation of the FGR protein-tyrosine kinase as a consequence of neutrophil activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:8783-8787.
182. Mocsai A, Jakus Z, Vantus T, Berton G, Lowell CA, and Ligeti E. 2000. Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *J Immunol*. 164:4321-4331.
183. Borregaard N, and Cowland JB. 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 89:3503-3521.

184. Miller LJ, Bainton DF, Borregaard N, and Springer TA. 1987. Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and p150, 95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface. *J Clin Invest.* 80:535-544.
185. Ross GD, and Vetvicka V. 1993. CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clin Exp Immunol.* 92:181-184.
186. Sengelov H, Follin P, Kjeldsen L, Lollike K, Dahlgren C, and Borregaard N. 1995. Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J Immunol.* 154:4157-4165.
187. Lynn WA, Raetz CR, Qureshi N, and Golenbock DT. 1991. Lipopolysaccharide-induced stimulation of CD11b/CD18 expression on neutrophils. Evidence of specific receptor-based response and inhibition by lipid A-based antagonists. *J Immunol.* 147:3072-3079.
188. Soehnlein O, Zerneck A, and Weber C. 2009. Neutrophils launch monocyte extravasation by release of granule proteins. *Thromb Haemost.* 102:198-205.
189. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, and Cassatella MA. 2000. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev.* 177:195-203.
190. Soehnlein O, Weber C, and Lindbom L. 2009. Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol.* 30:538-546.
191. N'Diaye EN, Darzacq X, Astarie-Dequeker C, Daffe M, Calafat J, and Maridonneau-Parini I. 1998. Fusion of azurophil granules with phagosomes and activation of the tyrosine kinase Hck are specifically inhibited during phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils. *J Immunol.* 161:4983-4991.
192. Cougoule C, Constant P, Etienne G, Daffe M, and Maridonneau-Parini I. 2002. Lack of fusion of azurophil granules with phagosomes during phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis* by human neutrophils is not actively controlled by the bacterium. *Infect Immun.* 70:1591-1598.
193. Staali L, Bauer S, Morgelin M, Bjorck L, and Tapper H. 2006. *Streptococcus pyogenes* bacteria modulate membrane traffic in human neutrophils and selectively inhibit azurophilic granule fusion with phagosomes. *Cell Microbiol.* 8:690-703.
194. Gregoire C, Welch H, Astarie-Dequeker C, and Maridonneau-Parini I. 1998. Expression of azurophil and specific granule proteins during differentiation of NB4 cells in neutrophils. *J Cell Physiol.* 175:203-210.
195. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, and Zychlinsky A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 303:1532-1535.
196. Lu T, Kobayashi SD, Quinn MT, and DeLeo FR. 2012. A NET Outcome. *Front Immunol.* 3:365.
197. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, and Zychlinsky A. 2009. Neutrophil extracellular traps

- contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 5:e1000639.
198. Cho JH, Sung BH, and Kim SC. 2009. Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochim Biophys Acta.* 1788:1564-1569.
 199. Mendez-Samperio P. 2010. The human cathelicidin hCAP18/LL-37: a multifunctional peptide involved in mycobacterial infections. *Peptides.* 31:1791-1798.
 200. Halverson TW, Wilton M, Poon KK, Petri B, and Lewenza S. 2015. DNA is an antimicrobial component of neutrophil extracellular traps. *PLoS Pathog.* 11:e1004593.
 201. Zawrotniak M, and Rapala-Kozik M. 2013. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta Biochim Pol.* 60:277-284.
 202. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, and Papayannopoulos V. 2014. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol.* 15:1017-1025.
 203. Branzk N, and Papayannopoulos V. 2013. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Semin Immunopathol.* 35:513-530.
 204. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, and Zychlinsky A. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 176:231-241.
 205. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, and Zychlinsky A. 2010. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 191:677-691.
 206. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, Wahn V, Papayannopoulos V, and Zychlinsky A. 2011. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood.* 117:953-959.
 207. Brinkmann V, and Zychlinsky A. 2012. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol.* 198:773-783.
 208. Remijsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, Noppen S, Delforge M, Willems J, and Vandenabeele P. 2011. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* 21:290-304.
 209. Gabriel C, McMaster WR, Girard D, and Descoteaux A. 2010. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *J Immunol.* 185:4319-4327.
 210. Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, and Henriques-Normark B. 2006. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol.* 16:401-407.
 211. Wartha F, Beiter K, Albiger B, Fernebro J, Zychlinsky A, Normark S, and Henriques-Normark B. 2007. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect

- Streptococcus pneumoniae against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol.* 9:1162-1171.
212. Thomas CM, and Smart EJ. 2008. Caveolae structure and function. *J Cell Mol Med.* 12:796-809.
 213. London E, and Brown DA. 2000. Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim Biophys Acta.* 1508:182-195.
 214. Anderson RG, and Jacobson K. 2002. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science.* 296:1821-1825.
 215. Fantini J, Garmy N, Mahfoud R, and Yahi N. 2002. Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases. *Expert Rev Mol Med.* 4:1-22.
 216. Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, and Rothblat GH. 1997. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res.* 38:2264-2272.
 217. Ilangumaran S, and Hoessli DC. 1998. Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J.* 335:433-440.
 218. Hooper NM. 1999. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Mol Membr Biol.* 16:145-156.
 219. Dhungana S, Merrick BA, Tomer KB, and Fessler MB. 2009. Quantitative proteomics analysis of macrophage rafts reveals compartmentalized activation of the proteasome and of proteasome-mediated ERK activation in response to lipopolysaccharide. *Mol Cell Proteomics.* 8:201-213.
 220. Keller P, and Simons K. 1998. Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol.* 140:1357-1367.
 221. Matko J, and Szollosi J. 2002. Landing of immune receptors and signal proteins on lipid rafts: a safe way to be spatio-temporally coordinated? *Immunol Lett.* 82:3-15.
 222. Slaughter N, Laux I, Tu X, Whitelegge J, Zhu X, Effros R, Bickel P, and Nel A. 2003. The flotillins are integral membrane proteins in lipid rafts that contain TCR-associated signaling components: implications for T-cell activation. *Clin Immunol.* 108:138-151.
 223. Barrias ES, Dutra JM, De Souza W, and Carvalho TM. 2007. Participation of macrophage membrane rafts in *Trypanosoma cruzi* invasion process. *Biochem Biophys Res Commun.* 363:828-834.
 224. Haglund K, Ivankovic-Dikic I, Shimokawa N, Kruh GD, and Dikic I. 2004. Recruitment of Pyk2 and Cbl to lipid rafts mediates signals important for actin reorganization in growing neurites. *J Cell Sci.* 117:2557-2568.
 225. Simons K, and Toomre D. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:31-39.

226. Harder T. 2004. Lipid raft domains and protein networks in T-cell receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol.* 16:353-359.
227. Pierce SK. 2002. Lipid rafts and B-cell activation. *Nat Rev Immunol.* 2:96-105.
228. Pizzo P, and Viola A. 2004. Lipid rafts in lymphocyte activation. *Microbes Infect.* 6:686-692.
229. Miceli MC, Moran M, Chung CD, Patel VP, Low T, and Zinnanti W. 2001. Co-stimulation and counter-stimulation: lipid raft clustering controls TCR signaling and functional outcomes. *Semin Immunol.* 13:115-128.
230. Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, and Triantafilou K. 2002. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci.* 115:2603-2611.
231. Duncan MJ, Shin JS, and Abraham SN. 2002. Microbial entry through caveolae: variations on a theme. *Cell Microbiol.* 4:783-791.
232. Norkin LC. 2001. Caveolae in the uptake and targeting of infectious agents and secreted toxins. *Adv Drug Deliv Rev.* 49:301-315.
233. Tang W, Seino K, Ito M, Konishi T, Senda H, Makuuchi M, Kojima N, and Mizuochi T. 2001. Requirement of ceramide for adhesion of *Helicobacter pylori* to glycosphingolipids. *FEBS Lett.* 504:31-35.
234. Simon PM, Goode PL, Mobasser A, and Zopf D. 1997. Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides. *Infect Immun.* 65:750-757.
235. van der Goot FG, and Harder T. 2001. Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. *Semin Immunol.* 13:89-97.
236. Lafont F, Tran Van Nhieu G, Hanada K, Sansonetti P, and van der Goot FG. 2002. Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction. *Embo J.* 21:4449-4457.
237. Catron DM, Sylvester MD, Lange Y, Kadekoppala M, Jones BD, Monack DM, Falkow S, and Haldar K. 2002. The *Salmonella*-containing vacuole is a major site of intracellular cholesterol accumulation and recruits the GPI-anchored protein CD55. *Cell Microbiol.* 4:315-328.
238. Backenson PB, Coleman JL, and Benach JL. 1995. *Borrelia burgdorferi* shows specificity of binding to glycosphingolipids. *Infect Immun.* 63:2811-2817.
239. Krivan HC, Roberts DD, and Ginsburg V. 1988. Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc beta 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:6157-6161.
240. Gatfield J, and Pieters J. 2000. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science.* 288:1647-1650.
241. Peyron P, Bordier C, N'Diaye EN, and Maridonneau-Parini I. 2000. Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J Immunol.* 165:5186-5191.

242. Watarai M. 2004. Interaction between *Brucella abortus* and cellular prion protein in lipid raft microdomains. *Microbes Infect.* 6:93-100.
243. Naroeni A, and Porte F. 2002. Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun.* 70:1640-1644.
244. Baorto DM, Gao Z, Malaviya R, Dustin ML, van der Merwe A, Lublin DM, and Abraham SN. 1997. Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature.* 389:636-639.
245. Kansau I, Berger C, Hospital M, Amsellem R, Nicolas V, Servin AL, and Bernet-Camard MF. 2004. Zipper-like internalization of Dr-positive *Escherichia coli* by epithelial cells is preceded by an adhesin-induced mobilization of raft-associated molecules in the initial step of adhesion. *Infect Immun.* 72:3733-3742.
246. Wang M, and Hajishengallis G. 2008. Lipid raft-dependent uptake, signalling and intracellular fate of *Porphyromonas gingivalis* in mouse macrophages. *Cell Microbiol.* 10:2029-2042.
247. Tamilselvam B, and Daefler S. 2008. *Francisella* targets cholesterol-rich host cell membrane domains for entry into macrophages. *J Immunol.* 180:8262-8271.
248. Lamberti Y, Alvarez Hayes J, Perez Vidakovics ML, and Rodriguez ME. 2009. Cholesterol-dependent attachment of human respiratory cells by *Bordetella pertussis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 56:143-150. Epub 2009 Apr 2006.
249. Lamberti Y, Perez Vidakovics ML, van der Pol LW, and Rodriguez ME. 2008. Cholesterol-rich domains are involved in *Bordetella pertussis* phagocytosis and intracellular survival in neutrophils. *Microb Pathog.* 44:501-511.
250. Manes S, del Real G, and Martinez AC. 2003. Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol.* 3:557-568.
251. Norkin LC, Wolfrom SA, and Stuart ES. 2001. Association of caveolin with *Chlamydia trachomatis* inclusions at early and late stages of infection. *Exp Cell Res.* 266:229-238.
252. Simons K, and Gruenberg J. 2000. Jamming the endosomal system: lipid rafts and lysosomal storage diseases. *Trends Cell Biol.* 10:459-462.
253. Ferrari G, Langen H, Naito M, and Pieters J. 1999. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell.* 97:435-447.
254. Maixnerova M. 2003. The 2001 serological survey in the Czech Republic--parapertussis. *Cent Eur J Public Health.* 11 Suppl:S23-24.
255. Bjornstad ON, and Harvill ET. 2005. Evolution and emergence of *Bordetella* in humans. *Trends Microbiol.* 13:355-359.
256. Iwata S, Aoyama T, Goto A, Iwai H, Sato Y, Akita H, Murase Y, Oikawa T, Iwata T, Kusano S, and et al. 1991. Mixed outbreak of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an apartment house. *Dev Biol Stand.* 73:333-341.

257. Kawai H, Aoyama T, Murase Y, Tamura C, and Imaizumi A. 1996. A causal relationship between *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections. Scand J Infect Dis. 28:377-381.
258. Worthington ZE, Van Rooijen N, and Carbonetti NH. 2011. Enhancement of *Bordetella parapertussis* infection by *Bordetella pertussis* in mixed infection of the respiratory tract. FEMS Immunol Med Microbiol. 63:119-128.

CAPITULO 2

Bordetella parapertussis sobrevive a la acción bactericida de neutrófilos humanos.

2. *Bordetella parapertussis* sobrevive a la acción bactericida de neutrófilos humanos.

2.1 Introducción

Durante la infección *B. parapertussis* se enfrenta a distintos factores de la inmunidad innata y adquirida. Uno de los principales efectores de la inmunidad innata son los neutrófilos que constituyen la primera barrera contra las infecciones bacterianas. En el sitio de infección los neutrófilos reconocen al microorganismo invasor, se adhieren a él, lo fagocitan y, eventualmente, lo inactivan. Los neutrófilos poseen además mecanismos bactericidas extracelulares como lo son la degranulación, que lleva a la liberación de componentes bactericidas de los gránulos al medio extracelular, y la formación de trampas de ADN extracelulares o “NETs”, conformadas por cromatina, proteínas nucleares y componentes de los gránulos, que inmoviliza los microorganismos en un entorno bactericida.

Los mecanismos bactericidas puestos en juego tras el ingreso del microorganismo al hospedador dependen del tipo de receptores involucrados en el reconocimiento del patógeno. Estudios previos llevados a cabo en un modelo murino demuestran que la eliminación de *B. parapertussis* del hospedador depende de la presencia simultánea de neutrófilos y anticuerpos específicos contra la bacteria en el sitio de infección (1). La falta de alguno de estos componentes determina la colonización del huésped. Estos estudios siguieron que la eliminación de *B. parapertussis* requiere de la acción bactericida de los neutrófilos y la participación de los receptores Fc, poniendo de manifiesto la importancia de la respuesta inmune adaptativa en el control de este patógeno.

Las vacunas actuales contra la tos convulsa formuladas con componentes derivados únicamente de *B. pertussis*, generan anticuerpos que reconocen deficientemente a *B. parapertussis* (2-4). En particular, mientras que la vacuna celular confiere algún grado de protección contra *B. parapertussis*, mediado principalmente por anticuerpos que reconocen antígenos en la estructura del LPS (4, 5), la vacuna acelular no genera protección contra esta bacteria (2, 4, 6). Estudios previos demuestran que el antígeno O de *B. parapertussis* es el responsable de la falta de protección cruzada entre estas especies. El antígeno O genera

un efecto de apantallamiento de los antígenos expuestos en la superficie bacteriana e impide que *B. parapertussis* sea reconocida por anticuerpos generados por vacunación con antígenos comunes a ambas especies (4, 5). En la actualidad gran parte de los países han remplazado las vacunas celulares por las vacunas acelulares menos reactogénicas y más seguras, pero también menos protectoras contra *B. parapertussis*. Por encima del reemplazo de la vacuna celular contra pertussis por la vacuna acelular en los esquemas de vacunación obligatorios, históricamente dirigido sólo a infantes, la reemergencia de la enfermedad ha determinado un cambio en las estrategias de vacunación que incluye la inmunización de adultos también con vacuna acelular (7). Esto ha tenido un impacto muy significativo en la incidencia de *B. parapertussis* porque las vacunas acelulares en uso no solo no protegen contra ésta especie sino que favorecen el establecimiento de infecciones causadas por esta bacteria (2, 8).

La falta de prevención por vacunación significa que el control de la infección por *B. parapertussis* en la población depende exclusivamente de la inmunidad innata a menos que el individuo haya sido previamente infectado con *B. parapertussis* (6). Como se menciona más arriba uno de los efectores más importantes de la inmunidad innata son los neutrófilos el resultado de la interacción con este tipo de células suele ser crítico en la resolución de la infección. Los estudios que han abordado esta temática se han llevado a cabo *in vivo* en modelos murinos y muestran que los neutrófilos son necesarios pero no suficientes para controlar la infección (1, 9). Aunque obtenidos en un modelo muy cuestionado por tratarse de un patógeno estrictamente humano, estos resultados alertan acerca de la eventual existencia de mecanismos de inmunoevasión en *B. parapertussis*.

En este trabajo empleamos neutrófilos humanos, que es un modelo relevante para este tipo de patógenos, para estudiar en detalle la interacción de *B. parapertussis* con éstas células del sistema inmune tanto en ausencia como en presencia de anticuerpos opsonizantes, el papel del antígeno O en esta interacción, y los receptores involucrados en la generación de actividad celular bactericida.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Para la realización de este estudio se emplearon las siguientes cepas. *B. parapertussis* CN2591 (cepa salvaje) y una cepa mutante isogénica defectiva en la expresión del antígeno O denominada CN2591 Δ *wbm* (10, 11). Se empleó además *B. pertussis* Tohama I (cepa salvaje) y un mutante isogénico defectivo en la expresión de CyaA (12). Las bacterias fueron cultivadas en placas de Agar Bordet Gengou (DIFCO Laboratories, USA), suplementada con 15% v/v de sangre desfibrinada de carnero (ABGs), durante 24 hs a 37°C. Al cabo de este tiempo se repicó en una nueva placa ABGs y se cultivó a 37°C durante 20 hs.

2.2.2 Células

En estos estudios se emplearon neutrófilos de sangre periférica aislados de sangre humana heparinizada utilizando gradientes de centrifugación Ficoll-Histopaque (Sigma, St. Louis, MO, USA). Los glóbulos rojos remanentes en la suspensión de polimorfonucleares (PMN) fueron removidos por lisis hipotónica logrando una pureza mayor al 95%. La viabilidad celular se determinó por tinción vital con Trypan Blue obteniéndose un nivel de viabilidad superior al 99%. Previo a la realización de los ensayos funcionales, los neutrófilos fueron lavados dos veces con DMEM suplementado con 0.2% p/v de BSA (Sigma), resuspendidos y utilizados inmediatamente. Todos los experimentos descritos en este capítulo fueron llevados a cabo utilizando neutrófilos purificados en el momento. El nivel de expresión del receptor Fc γ RI (CD64) fue monitoreado mediante criometría de flujo utilizando el mAc anti Fc γ RI 22 (13). Solo fueron utilizados aquellos neutrófilos que no presentaban niveles detectables de expresión de CD64.

2.2.3 Anticuerpos y sueros

Los siguientes anticuerpos fueron utilizados en este ensayo: anticuerpos policlonales de conejo anti-elastasa (Calbiochem-Merk; Millipore; Darmstad, Germany), anticuerpos policlonales de conejo anti-flotilina humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anticuerpos monoclonales (mAc) de ratón anti-proteína lisosomal asociada a membrana

(LAMP-1) (Pharmingen, San Diego, CA) y mAc de ratón anti-hFcγRI (CD64) mAc 22 (mIgG1) (Medarex, Annandale, NJ). Fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con CY3 y Fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC (ambos de Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con CY3 y Fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con ficoeritrina (PE) (ambos de Molecular Probes, Eugene, OR). Fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con FITC (Southern Biotechnology). También fueron utilizadas fracciones de IgG obtenidas a partir de un pool de sueros de pacientes con elevado título contra *B. parapertussis*, según se determinó por ELISA (14), obtenida como se describe en Rodríguez *et al.* (15), suero anti-*B. parapertussis* de conejo obtenido según se describe en Hellwig *et al.* (16), y suero anti-*B. parapertussis* de ratón obtenidos según se describe en (5). Estos sueros presentan elevado título contra *B. parapertussis*, según se determinó por ELISA (14).

2.2.4 Tratamiento de neutrófilos con drogas desorganizadoras de balsas lipídicas

La desorganización de los dominios lipídicos se llevó a cabo mediante la incubación de las células con diferentes drogas que extraen o se adhieren al colesterol de membrana. Para ello, previo a la infección, las células fueron incubadas con 1, 3.5 o 10 mg/ml de metil-β-ciclodextrina (Sigma) durante 15 min a 37°C o con 35 μg/ml de nistatina (Sigma) durante 30 min a 37°C en medio DMEM suplementado con BSA (0.2% p/v). En los ensayos que se utilizó metil-β-ciclodextrina. Luego de la incubación con esta droga las células fueron lavadas y suspendidas en medio de cultivo suplementado con lovastatina (5 μg/ml) (Sigma) (DMEM-BSA-Lovastatina) la cual fue mantenida durante todo el ensayo. La lovastatina inhibe la síntesis *de novo* de colesterol impidiendo la reposición de colesterol en la membrana plasmática. La viabilidad celular no fue afectada por el tratamiento con estas drogas según se determinó mediante tinción vital con Trypan Blue y recuento en cámara de Neubauer.

2.2.5 Cuantificación de la adhesión y fagocitosis

La fagocitosis bacteriana se evaluó por microscopía de fluorescencia. Las bacterias fueron incubadas con neutrófilos humanos a una multiplicidad de infección (MDI) de 30 o 300 durante 15 min a 37°C para permitir la adhesión. El inóculo bacteriano fue cuantificado mediante recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en ABGs. En determinados experimentos los neutrófilos fueron tratados con 200 ng/ml citocalasina D (Sigma) antes de la infección para inhibir la fagocitosis (17). Luego de lavar para remover las bacterias no adheridas, las células fueron incubadas 1 h a 37°C para permitir la fagocitosis. Para detener la fagocitosis los neutrófilos fueron colocados en hielo. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Luego de la fijación, los neutrófilos se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) y se incubaron con NH₄CL 50 mM durante 10 minutos a temperatura ambiente. El número de bacterias adheridas a la superficie del neutrófilo y aquellas internalizadas fueron determinadas por doble marcación fluorescente y microscopía de fluorescencia. Para determinar el número de bacterias adheridas las células fueron incubadas con anticuerpos policlonales de conejo anti-*B. parapertussis* (30 min a 4°C), seguido por la incubación con fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con CY3 (30 min a 4°C). Para determinar el número de bacterias intracelulares las células fueron lavadas y permeabilizadas mediante la incubación con una solución de saponina 0.1% (Sigma) y BSA 0.2% (Sigma) (30 min a 25°C), seguido de la tinción de las bacterias por inmunofluorescencia indirecta. Para ello las células fueron incubadas con anticuerpos policlonales de conejo anti-*B. parapertussis* en PBS con saponina 0.1% y BSA 0.2% (30 minutos a 25°C), seguido por la incubación con fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC (30 min a 25°C) en presencia de saponina 0.1% y BSA 0.2%. Luego del lavado con agua destilada para eliminar el exceso de sales, las muestras se montaron sobre cubreobjetos y fueron analizadas por microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio DMLB acoplado a una cámara DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Switzerland). El número de bacterias extracelulares (rojas y verdes) e intracelulares (verdes) se determinó por la observación de al menos 100 células en cada condición. Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces por triplicado. En determinados experimentos, las bacterias

fueron opsonizadas con IgG humana con alto título anti- anti-*B. parapertussis* (200 µg/ml) durante 30 min a 37°C previo a la incubación con los macrófagos (MDI: 30).

2.2.6 Activación de la respuesta oxidativa

La producción de ROS se determinó según ha sido descrito anteriormente (18). Para ello, 1×10^5 neutrófilos fueron infectados con 50 µl de una suspensión conteniendo 3×10^6 bacterias opsonizadas con IgG o 3×10^7 bacterias no opsonizadas en presencia de 600 µl de luminol 180 µM (Sigma). La respuesta quimioluminisciente fue determinada cada 30 min a 37°C mediante la utilización de un luminómetro (Luminoskan TL Plus; Thermo Lab Systems, Finland).

2.2.7 Microscopía confocal

Los estudios de colocalización fueron realizados como ha sido descrito anteriormente (19), con algunas modificaciones. Neutrófilos incubados con las diferentes cepas bacterianas (MDI: 30 o 300) durante 15 min a 37°C fueron lavados para remover bacterias no adheridas y posteriormente incubados durante 1 h a 37°C. En determinados experimentos se tomó muestra cada 20 minutos hasta las 2 h posteriores a la infección. Las células infectadas fueron fijadas con paraformaldehído 4% o fueron incubadas con LysoTracker DND-99 200 nM (Molecular Probes) (5 min a 37°C) previo a su fijación. Aquellas células que fueron teñidas con LysoTracker fueron lavadas e incubadas durante 10 minutos con NH₄Cl 50 mM. Luego del lavado, las células fueron incubadas con PBS suplementado con saponina 0,1% p/v (Sigma) y BSA (Sigma) 0.2% p/v durante 30 minutos a 25°C y luego incubadas con anticuerpos policlonales de conejo anti-*B. parapertussis* (30 min a 25°C) en presencia de 0.1% saponina y 0.2% BSA. Luego de tres lavados, los neutrófilos fueron incubados con fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC (30 min a 25°C) en presencia de saponina 0.1% y BSA 0.2%. Aquellas muestras incubadas durante 1 h a 37°C que no fueron teñidas con LysoTracker, luego de la fijación, fueron lavadas e incubadas durante 10 min con NH₄Cl 50 mM. Luego del lavado las células fueron incubadas con PBS suplementado con saponina 0,1% p/v (Sigma) y BSA (Sigma) 0.2% p/v durante 30 min. Posteriormente las células fueron incubadas con anticuerpos policlonales de conejo anti-flotilina y anticuerpos policlonales

de ratón anti-*B. parapertussis* (30 min a 25°C) o con anticuerpos monoclonales de ratón anti-LAMP-1 y anticuerpos policlonales de conejo anti-*B. parapertussis* (30 min a 25°C) en presencia de 0.1% saponina y 0.2% BSA. Luego de tres lavados, los macrófagos fueron incubados con fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con CY3 y fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con FITC (30 at 25°C) o con fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC y fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con CY3 (30 min a 25°C) en presencia de 0.1% saponina y 0.2% BSA. Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos todas las incubaciones fueron realizadas en presencia de 25% v/v de suero normal humano inactivado por calor. Las muestras fueron analizadas por microscopia confocal (Leica TCS SP5, Germany). El porcentaje de bacterias que colocalizan con un marcador determinado fue calculado mediante la observación de al menos 50 fagosomas.

2.2.8 Estudios de adquisición de transferrina humana

Los estudios fueron realizados según se ha descrito anteriormente (20) con modificaciones menores. Neutrófilos humanos incubados durante 15 min a 37°C con las diferentes bacterias, fueron lavados e incubados nuevamente durante 1 h a 37°C para permitir que la fagocitosis transcurra. Posteriormente los neutrófilos fueron deplecionados de transferrina exógena mediante la incubación en medio DMEM conteniendo BSA 1% p/v durante 1 h a 37°C. Posteriormente las células fueron incubadas con 10 µg/ml de transferrina marcada con Alexa-594 (Molecular Probes) durante 10 min a 4°C en medio DMEM con BSA 1% p/v para permitir la unión de la transferrina a los receptores de la membrana de los neutrófilos. Luego fueron incubados a 37°C durante 5 minutos para que la transferrina sea internalizada y posteriormente lavados con DMEM-BSA 1% p/v. Finalmente fueron incubados durante 45 min a 37°C y fijados para ser observados por microscopía confocal. La colocalización de las bacterias (verde) con la transferrina (roja) fue analizada observando al menos 50 fagosomas.

2.2.9 Sobrevida intracelular: ensayo de protección a polimixina B

Los neutrófilos fueron infectados con *B. parapertussis* (MDI: 30 o 300) según se describió en los ensayos de adhesión. El inóculo bacteriano fue cuantificado mediante recuento de UFC en ABGs. Luego de 15 min de incubación a 37°C con 5% CO₂, los neutrófilos fueron lavados para eliminar las bacterias no adheridas. Las células fueron incubadas con polimixina B (100 µg/ml) (Sigma) durante 1 h a 37°C, a esta concentración y este tiempo el antibiótico no penetra en las células eucariotas (21). La polimixina B inactiva solo las bacterias extracelulares adheridas al neutrófilo y las bacterias en suspensión que no fueron eliminadas por los lavados. Posteriormente los neutrófilos fueron lavados y la sobrevida intracelular de *B. parapertussis* se determinó como se describe a continuación. Los neutrófilos fueron sedimentados por centrifugación y cada muestra se dividió en dos alícuotas. Una de ellas se utilizó para determinar el número de células viables mediante tinción con Trypan Blue y recuento en cámara de Neubauer, y la otra fue incubada en agua destilada durante 10 min a 4°C para provocar la lisis de la célula permitiendo la liberación de las bacterias intracelulares. Se realizaron diluciones seriadas en agua destilada con saponina 0,1% p/v y finalmente se sembraron alícuotas en ABGs para determinar el número de bacterias por recuento de UFC, el cual se refirió al número de neutrófilos presentes en la muestra utilizando el recuento de células mencionado más arriba. Paralelamente se determinó el número de bacterias fagocitadas a los 15 minutos que permitió calcular el porcentaje de bacterias internalizadas que permanecieron viables durante 1 hora después de la fagocitosis. El número de bacterias fagocitadas se determinó por microscopia de fluorescencia según se describió anteriormente. En experimentos control se evaluó la actividad bactericida de la polimixina B. Para ello, muestras de 5×10^8 bacterias fueron incubadas con 1 ml de polimixina B (100 µg/ml) durante 1 h a 37°C, lavadas y sembradas en ABGs. El tratamiento determinó una disminución del 99,999% en la viabilidad bacteriana, según se determinó por recuento de UFC. Paralelamente, se determinó si luego del tratamiento de las células con polimixina B había bacterias viables en el sobrenadante no encontrándose bacterias viables a diferentes tiempos después de la infección según se determinó por recuento de UFC. Cabe señalar que las diferentes cepas utilizadas no mostraron diferencias significativas en la sensibilidad a la polimixina B. En determinados

experimentos, las bacterias fueron opsonizadas con IgG humana (200 µg/ml) durante 30 min a 37°C previo a la incubación con los neutrófilos (MDI: 30).

2.2.10 Liberación de la enzima lisosomal β-glucuronidasa

Neutrófilos en suspensión (5×10^6 células/ml) fueron incubados con las diferentes cepas bacterianas durante 1 h a 37°C, y luego centrifugados a 10000 x g durante 10 min para eliminar bacterias y células en suspensión. La actividad enzimática de la β-glucuronidasa fue determinada en los sobrenadantes según ha sido descrito en Gregoire *et al.* (22). Como control se realizó la medida de actividad enzimática en el sobrenadante de neutrófilos (5×10^6 células/ml) no infectados, lisados por tratamiento con 0.2% v/v de Triton X-100. Mediante este tratamiento se induce la liberación de la totalidad de la enzima β-glucuronidasa contenida en los gránulos y por lo tanto este valor corresponde al 100% de liberación esperado.

2.2.11 Determinación de la formación de NETs

Para la determinación de la formación de NETs, se infectaron neutrófilos (1×10^6 células/ml) con las diferentes cepas bacterianas (MDI: 300) en placas de 24 pocillos conteniendo cubreobjetos de 12 mm. Como control positivo de la formación de NETs se utilizó PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) 20 mM, que induce la formación de NETs en neutrófilos por activación simultánea de la NADPH oxidasa y de la vía autofágica (24, 25). A diferentes tiempos post-infección (1, 2, 3 o 4 horas), las células fueron fijadas por tratamiento con paraformaldehído y la formación de NETs se determinó mediante la marcación del ADN con yoduro de propidio y microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio DMLB acoplado a una cámara DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Switzerland). El número de NETs formadas se determinó por observación de al menos 100 células en cada condición. Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces por duplicado. En determinados experimentos, los neutrófilos fueron infectados durante 30 minutos con las diferentes bacterias, previo al tratamiento con PMA 20 mM. Para los estudios de colocalización las células fijadas, fueron marcadas con anticuerpos policlonales de conejo anti-elastasa seguido por la incubación con fragmentos F(ab)₂ de

anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC y yoduro de propidio, y luego analizadas por microscopía confocal.

2.2.12 Determinación de apoptosis

Para la determinación de los niveles de apoptosis, neutrófilos (1×10^6 células/ml) fueron incubados en medio DMEM suplementado con SFB 10% con las diferentes cepas (MDI: 300) durante 4 horas a 37°C. A este tiempo, las células fueron teñidas con anexina V conjugada a FITC y yoduro de propidio de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Invitrogen). Las muestras fueron analizadas inmediatamente por citometría de flujo (BD FACSCalibur instrument) y los resultados fueron procesados utilizando el programa WinMDI.

2.2.13 Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación de los valores obtenidos (medias) se utilizó el test de Menor Diferencia Significativa (LSD) con un grado de significación del 95% ($P < 0.05$). Los resultados se muestran como el valor medio y la desviación estándar (DE).

2.3 Resultados

2.3.1 El antígeno O está involucrado en la interacción innata de *B. parapertussis* con los neutrófilos

En estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio se determinó que en ausencia de anticuerpos específicos *B. parapertussis* evita en gran medida la adhesión y fagocitosis por neutrófilos humanos (4). En estudios preliminares realizados durante este trabajo pudimos determinar que en ausencia de anticuerpos opsonizantes los niveles de adhesión de *B. parapertussis* disminuyen aproximadamente 10 veces respecto a los niveles de adhesión alcanzados con bacterias opsonizadas. En condiciones no opsonizantes solo un 6% de las bacterias incubadas con la célula inmune es fagocitado mientras que la captura de las bacterias opsonizadas es mayor al 60%. (datos no mostrados). Estos bajos niveles de adhesión y fagocitosis en ausencia de anticuerpos sugieren que *B. parapertussis* posee mecanismos que le permiten escapar a la captura por neutrófilos. Diferentes patógenos que expresan estructuras polisacáridos en su superficie dificultan la interacción innata con células inmunes. El antígeno O es un factor determinante en la virulencia de diferentes patógenos, capaz de modular de la fagocitosis de la bacteria por las células inmunes (26-28). Para evaluar si el antígeno O de *B. parapertussis* está implicado en la evasión de la captura de esta bacteria en la interacción innata con neutrófilos, empleamos neutrófilos humanos aislados de donantes sanos y dos cepas de *B. parapertussis*, la cepa salvaje y una cepa mutante deficiente en la expresión del antígeno O. Los neutrófilos fueron incubados con cada una de las cepas durante 15 minutos para permitir la adhesión, lavados para eliminar las bacterias no adheridas e incubados 1 hora a 37°C para permitir la fagocitosis. Luego del fijarlos, se determinó el número de bacterias adheridas e internalizadas por doble marcación fluorescente y microscopia de fluorescencia. En la Figura 1A se puede ver que la fagocitosis de la cepa deficiente en la expresión del antígeno O fue significativamente superior que la fagocitosis de la cepa salvaje de *B. parapertussis*, sugiriendo que el antígeno O interviene en la interacción de esta bacteria con neutrófilos humanos. Dado que la diferencias observadas en los niveles de fagocitosis puede deberse a diferencias en la adhesión o en la velocidad con que son fagocitadas ambas cepas se evaluó la interacción de *B. parapertussis* con neutrófilos humanos en presencia de citocalasina D, un inhibidor de la

polimerización de microfilamentos de actina que inhibe la fagocitosis permitiendo estudiar la adhesión bacteriana de manera independiente. Para ello, luego de 15 minutos de incubación con citocalasina D, los neutrófilos fueron infectados con la cepa salvaje o la cepa mutante durante 15 minutos a 37°C. Luego de lavar las células para eliminar las bacterias no adheridas, los neutrófilos se incubaron durante 1 hora a 37°C. La citocalasina D se mantuvo en el medio durante todo el ensayo. El número de bacterias adheridas por neutrófilo se determinó mediante microscopia de fluorescencia. En la Figura 1B se observa que el grado de adhesión de la cepa mutante es significativamente mayor que para la cepa salvaje de *B. parapertussis*. Comparando este resultado con el de la Figura 1A se puede observar que el número de bacterias adheridas por neutrófilo es similar al número de bacterias que fueron fagocitadas una hora después de la infección. Estos resultados demuestran que el antígeno O interfiere principalmente en la adhesión de la bacteria a los neutrófilos y sugieren la existencia de diferentes blancos de interacción para la cepa salvaje y la cepa mutante en la membrana del neutrófilo.

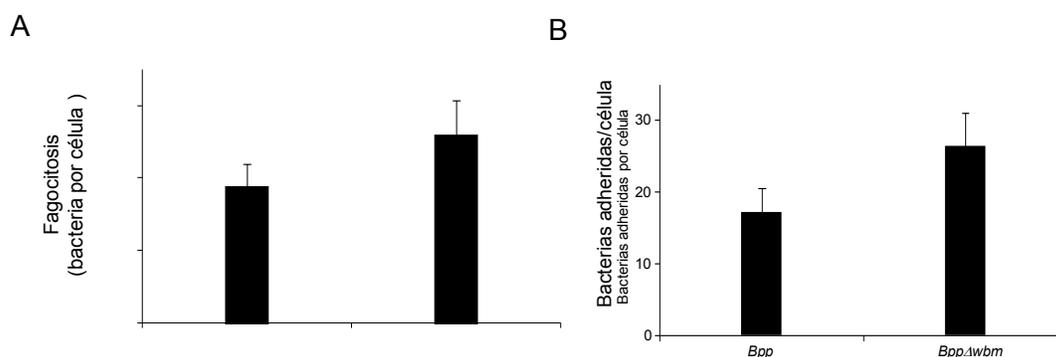


Figura 1. Adhesión y fagocitosis de *B. parapertussis* por neutrófilos humanos. (A) *B. parapertussis* cepa salvaje (*Bpp*) o un mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*BppΔwbm*) fueron incubadas con neutrófilos humanos (MDI: 300) durante 15 min a 37°C para permitir la adhesión. Luego, las células fueron lavadas para eliminar bacterias no adheridas e incubadas 1 h a 37°C para permitir la fagocitosis. Las células fueron fijadas y permeabilizadas previo a la marcación de las bacterias intracelulares con una marca verde fluorescente, y las bacterias extracelulares con marcas verde y rojo fluorescente. El número de bacterias intracelulares y extracelulares fueron determinadas por microscopia de fluorescencia. Al menos 100 células fueron analizadas por cada condición. En la figura se muestran los valores medios \pm DE de cuatro experimentos independientes expresados como el número de bacterias adheridas que fueron fagocitadas 1 h después de la infección. Los niveles de fagocitosis de la cepa salvaje de *B. parapertussis* difiere significativamente de los niveles de fagocitosis de la cepa mutante para el antígeno O ($P < 0.05$). (B) *B. parapertussis* (*Bpp*) o un mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*BppΔwbm*)

fueron incubadas con neutrófilos humanos (MDI: 300) durante 15 min a 37°C en presencia de citocalasina D. Seguido, las células fueron lavadas para eliminar bacterias no adheridas e incubadas 1 h a 37°C en presencia de citocalasina D. Las células fueron fijadas y permeabilizadas, y el número de bacterias intracelulares y extracelulares fueron determinados por doble marcación fluorescente y microscopia de fluorescencia. El número de bacterias adheridas se determinó mediante el análisis de al menos 100 células. En ambos casos (*Bpp* y *BppΔwbm*), el total de las bacterias se encontraron en localización extracelular, indicando que la fagocitosis fue bloqueada de manera eficiente. En la figura se muestran los valores medios \pm DE de cuatro experimentos independientes expresados como el número de bacterias adheridas por célula 1 hora después de la infección. Los niveles de adhesión de la cepa salvaje de *B. parapertussis* difieren significativamente de los niveles de adhesión observados para la cepa mutante ($P < 0.05$).

2.3.2 En ausencia de anticuerpos *B. parapertussis* inhibe de la fusión fagolisosomal y dirige la bacteria a compartimientos con características de endosoma temprano en un mecanismo dependiente del antígeno O

En el estudio descrito en el punto anterior se observó que la interacción innata de *B. parapertussis* con neutrófilos humanos conduce a una baja tasa de captura y fagocitosis de la bacteria. El antígeno O está de alguna manera involucrado en la interacción, lo que podría favorecer una interacción no bactericida. Para estudiar el tráfico intracelular de *B. parapertussis* en neutrófilos humanos, empleamos microscopía confocal y diferentes marcadores intracelulares. En primer lugar determinamos el grado de colocación con el marcador de lisosomas Lysotracker, una molécula ácido trófica que penetra en la célula por difusión y una vez protonada (pH ácido) es retenida en los compartimiento que han sido acidificados. Esta molécula emite fluorescencia roja cuando es excitada en longitudes de onda de 594 nm. Los estudios de colocación de *B. parapertussis* con este marcador se llevaron a cabo a distintos tiempos post-infección. Se evaluaron al menos 50 fagosomas por condición en células elegidas al azar. En la Figura 2 se observa que 20 minutos después de la infección un gran porcentaje de bacterias no colocan con Lysotracker ($63 \pm 4\%$). Este porcentaje no se vio modificado de manera significativa a tiempos mayores, indicando que aquellas bacterias que evaden la fusión con lisosomas a tiempos cortos post-infección permanecen en vesículas que no son acidificadas en el tiempo.

Para investigar si la presencia de anticuerpos opsonizantes determina un cambio en el destino intracelular de la bacteria, se evaluaron los niveles de colocación de *B.*

parapertussis con Lysotracker en presencia de anticuerpos opsonizantes. Dado que nuestros resultados demostraron que la opsonización de la bacteria determina un aumento de aproximadamente ~10 veces en los niveles de fagocitosis de *B. parapertussis* en neutrófilos, en los ensayos que involucran la presencia de anticuerpos se empleó una multiplicidad de infección 10 veces menor (MDI: 30) que la utilizada en ausencia de anticuerpos (MDI: 300) de modo que los niveles de infección sean similares en cada condición. En la Figura 2, se observa que en presencia de anticuerpos opsonizantes el tráfico intracelular de *B. parapertussis* es dirigido mayoritariamente a compartimientos ácidos. Dos horas post-infección aproximadamente el 90% de las bacterias se encuentra colocalizando con el marcador Lysotracker, demostrando que la fagocitosis vía FcR induce una ruta intracelular que determina la formación del fagolisosoma. Para descartar la posibilidad de que el tráfico intracelular observado en la cepa opsonizada sea consecuencia de la utilización de una multiplicidad de infección menor, evaluamos el tráfico intracelular de *B. parapertussis* no opsonizada a la misma multiplicidad de infección que la utilizada en condiciones opsonizantes (MDI: 30). A pesar de que el número de bacterias no opsonizadas en localización intracelular disminuyó significativamente, el porcentaje de bacterias colocalizando con Lysotracker mostró ser independiente de la multiplicidad de infección utilizada (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que en ausencia de anticuerpos *B. parapertussis* interfiere con la fusión fagolisosomal y permanece en compartimientos que no son acidificados.

En estudios previos se ha observado que en el caso de algunos patógenos bacterianos el antígeno O interviene en la interacción innata con células inmunes y determina la evasión de la vía degradativa (29). El tipo de receptores de la célula eucariota involucrados en la interacción inicial con el patógeno determinan el tráfico intracelular que sigue la bacteria. Dado que nuestros resultados sugieren que el antígeno O de *B. parapertussis* está involucrado en la interacción inicial de esta bacteria con los neutrófilos, decidimos estudiar si en el caso de *B. parapertussis* el antígeno O es responsable de la evasión de la maduración del fagosoma observada. Para ello, se evaluó el grado de colocalización con Lysotracker de una cepa de *B. parapertussis* defectiva en la expresión del antígeno O. En la Figura 2 se observa que el porcentaje de colocalización de la cepa mutante de *B. parapertussis* con el marcador Lysotracker es significativamente mayor que

el porcentaje de colocalización de la cepa salvaje a todos los tiempos ensayados, demostrando que el antígeno O está implicado en la evasión de la maduración fagolisosomal en ausencia de anticuerpos.

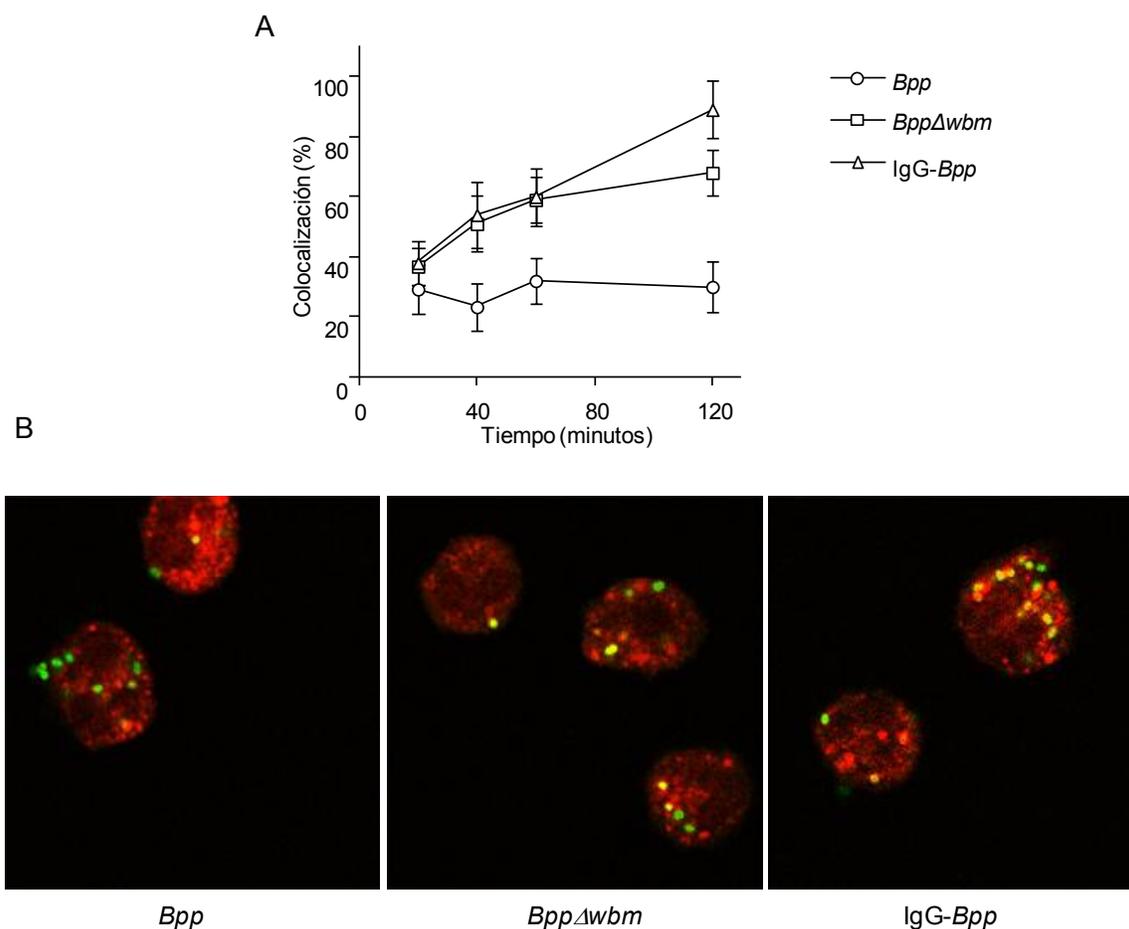


Figura 2. Colocalización de *B. parapertussis* con marcadores de Lysotracker. *B. parapertussis* no opsonizada (*Bpp*), *B. parapertussis* opsonizada con IgG (IgG-*Bpp*) o un mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*Bpp*Δ*wbm*) fueron incubados con neutrófilos humanos (MDI: 300 no opsonizada; MDI: 30 opsonizada) durante 15 min a 37°C, lavados extensivamente y tratados con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares. A diferentes tiempos después de la infección las células fueron incubadas con Lysotracker durante 5 min y fijadas. Luego de la tinción indirecta de las bacterias intracelulares las muestras fueron analizadas por microscopía confocal. Al menos 50 fagosomas fueron analizados por cada condición. (A) El gráfico muestra el porcentaje de bacterias colocalizando con el marcador Lysotracker a diferentes tiempos después de la infección. Los datos representan la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes. El número de bacterias *B. parapertussis* cepa salvaje que colocaliza con el marcador Lysotracker a 1 hora post-infección no muestra diferencias significativas con los valores observados a tiempos mayores ($P < 0.05$). El número de bacterias deficientes en la

expresión del antígeno O y cepa salvaje opsonizada muestran un aumento significativo en el número de bacterias colocalizando con el marcador en el tiempo ($P < 0.05$) (B) Se muestran imágenes representativas de neutrófilos infectados una hora posterior a la infección obtenidas por microscopía confocal. La colocalización se evidencia por la convergencia de fluoróforos en zonas amarillas. Se muestran imágenes representativas de uno de tres experimentos independientes.

Con el fin de estudiar las características del fagosoma de *B. parapertussis* empleamos microscopía confocal y marcadores de endosomas tempranos y endosomas tardíos/lisosomas. En la Figura 3A, se observa que el porcentaje de fagosomas conteniendo la cepa salvaje de *B. parapertussis* que no adquieren el marcador de endosomas tardíos/lisosomas, LAMP-1, es similar al porcentaje de fagosomas que no mostraron fusión con lisosomas una hora después de la fagocitosis (Figura 2), indicando que aquellas bacterias que evitan la acidificación de los fagosomas permanecen en compartimientos que no adquieren características de endosoma tardío o lisosoma a este tiempo post-infección. En paralelo, se evaluó el grado de colocalización de *B. parapertussis* opsonizada con IgG y *B. parapertussis* defectiva en la expresión del antígeno O con este mismo marcador. Como se muestra en la Figura 3A el porcentaje de bacterias colocalizando con LAMP-1, tanto de la cepa mutante como de la cepa salvaje opsonizada con IgG, fue similar al porcentaje de bacterias que se encontraron en compartimientos ácidos mostrados en la Figura 2. Para evaluar si las bacterias que no muestran signos de colocalización con marcadores de endosoma tardío o lisosoma se encuentran en endosomas tempranos, se utilizó como marcador transferrina conjugada a un fluoróforo y microscopía confocal. La transferrina ingresa a la célula a través de receptores específicos vía ruta de reciclaje y se fusiona con endosomas tempranos de baja acidez (pH 6,5-6,0) induciendo la liberación de hierro en el lumen del compartimiento. Finalmente la transferrina es reciclada hacia la membrana de la célula hospedadora evitando los mecanismos de degradación como la fusión con lisosomas. Junto a la transferrina, la vacuola transporta nutrientes del medio extracelular. Los estudios de colocalización con transferrina marcada permiten, por lo tanto, determinar características de maduración del fagosoma y evaluar al mismo tiempo si la bacteria tiene acceso a nutrientes extracelulares. Como se puede observar en la Figura 3B, una hora después de la infección el $59 \pm 5\%$ de los fagosomas conteniendo la cepa salvaje de *B. parapertussis* adquiere transferrina, sugiriendo que la bacteria se encuentra en compartimientos con

características de endosoma temprano y con acceso a nutrientes esenciales. Por otro lado, y de acuerdo con los resultados anteriores que muestran que tanto la cepa defectiva en el antígeno O como la cepa salvaje opsonizada se encuentran principalmente en compartimentos que siguen la maduración lisosomal, los porcentajes de colocalización con transferrina en ambos casos, fueron significativamente inferiores a los observados con la cepa salvaje de *B. parapertussis* sin opsonizar (Fig. 3B).

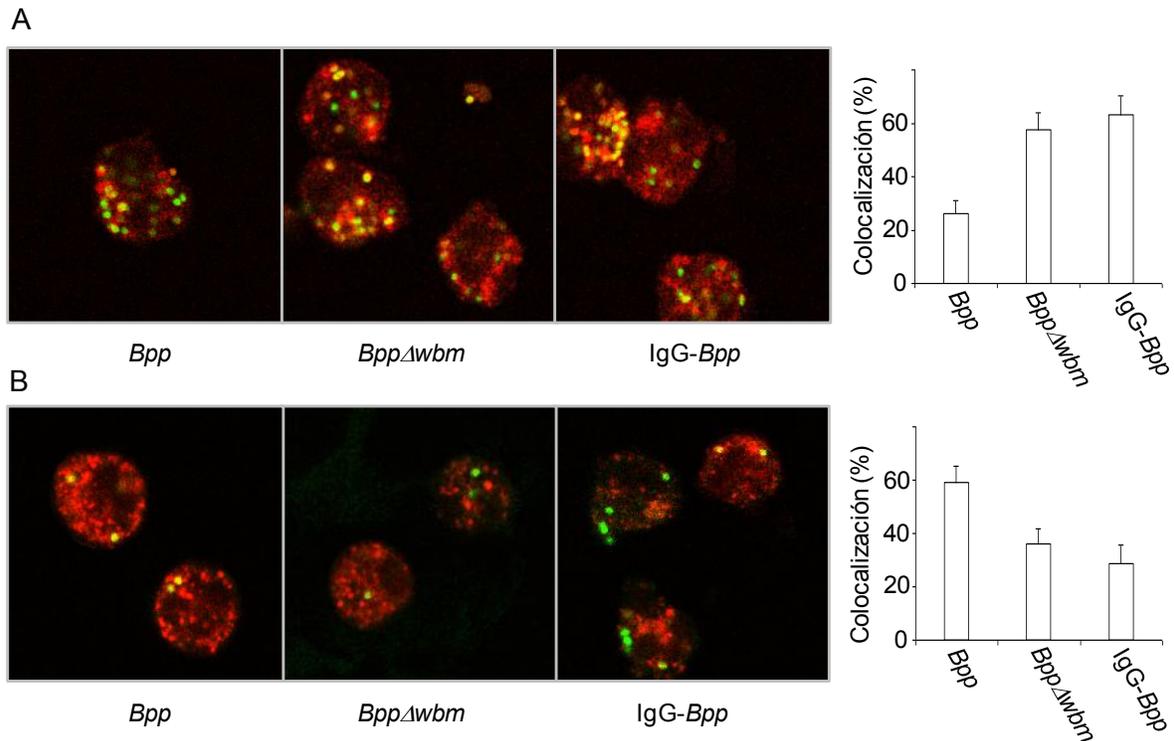


Figura 3. Colocalización de *B. parapertussis* con LAMP-1 y transferrina. *B. parapertussis* no opsonizada (*Bpp*), *B. parapertussis* opsonizada con IgG (IgG-*Bpp*) o un mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*Bpp* Δ *wbm*) fueron incubados con neutrófilos (MDI: 300 no opsonizada; MDI: 30 opsonizada) durante 15 minutos a 37°C. Luego de lavar para eliminar las bacterias no adheridas, las células fueron incubadas 1 h a 37°C y divididas en dos alícuotas. (A) Una muestra fue fijada y permeabilizada previo a la incubación con anticuerpos contra LAMP-1. (B) La otra muestra fue incubada con transferrina conjugada a Alexa-594 y luego fijada. Las células fueron analizadas por microscopía confocal. Los datos representan la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes expresados como el porcentaje de bacterias colocalizando con un determinado marcador. Los niveles de colocalización de la cepa salvaje de *B. parapertussis* (verde) con LAMP-1 (rojo) o transferrina (rojo) en ausencia de anticuerpos difieren significativamente de los niveles de colocalización observados para la cepa

mutante y para la cepa opsonizada ($P < 0.05$). Se muestran imágenes representativas de uno de tres experimentos independientes.

2.3.3 En ausencia de anticuerpos *B. parapertussis* modula la activación de los neutrófilos evitando la generación del estallido respiratorio a través un mecanismo dependiente del antígeno O.

El tráfico intracelular que sigue un patógeno dentro del neutrófilo depende del estado de activación de la célula. El grado de activación dependerá del tipo de receptores de membrana involucrados en la interacción con el patógeno. La activación del neutrófilo determina el montaje de mecanismos bactericidas como son los mecanismos dependientes de la producción de ROS y los mecanismos oxígeno-independientes mediados a través de la acción de diversas enzimas hidrolíticas. Los resultados anteriores demuestran que el antígeno O de *B. parapertussis* está involucrado en la evasión de los mecanismos bactericidas del neutrófilo. Por esta razón, evaluamos si se induce la generación de ROS en estas células inmunes cuando interaccionan con *B. parapertussis*. Para ello, neutrófilos humanos fueron infectados con *B. parapertussis* en presencia de luminol, una molécula que en contacto con ROS genera una reacción de quimioluminiscencia emitiendo una cantidad de fotones proporcional a la concentración de ROS. La determinación de la respuesta quimioluminisciente se hizo cada 1 minuto a 37°C utilizando un luminómetro. Como se observa en la Figura 4, en ausencia de anticuerpos opsonizantes *B. parapertussis* no induce la generación de ROS. Esta interacción no activadora parece depender como en el caso de otros Gram negativos (30) de la presencia del antígeno O. Según podemos observar en la Figura 4, la cepa mutante defectiva en la expresión del antígeno O indujo una respuesta significativamente mayor que la cepa salvaje, sugiriendo que el antígeno O de *B. parapertussis* está involucrado en la inhibición de la activación del neutrófilo y la consiguiente generación de ROS. Como se esperaba, en presencia de anticuerpos opsonizantes *B. parapertussis* induce una fuerte activación del neutrófilo (Fig. 4).

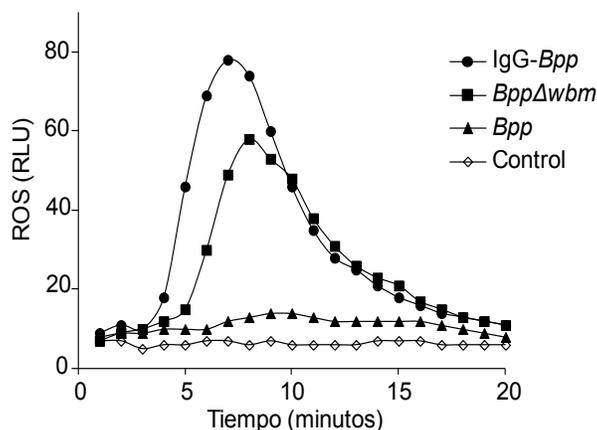


Figura 4. Generación de la respuesta oxidativa en neutrófilos humanos. *B. parapertussis* no opsonizada (*Bpp*), *B. parapertussis* opsonizada con IgG (IgG-*Bpp*) o un mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*BppΔwbm*) fueron incubados con neutrófilos (MDI: 300 no opsonizada; MDI: 30 opsonizada) en presencia de luminol a 37°C. La respuesta quimioluminiscente generada por la activación del neutrófilo fue medida cada un minuto durante 20 minutos. Como control se incubaron neutrófilos con PBS. Los datos representan la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes expresados. Los niveles de generación de ROS en respuesta a la infección con la cepa salvaje de *B. parapertussis* difiere significativamente de los niveles observados en la infección con la cepa de *B. parapertussis* deficiente en la expresión del antígeno O y la cepas salvaje opsonizada. RLU, unidades relativas de luminiscencia.

2.3.4 El antígeno O favorece la sobrevida intracelular de *B. parapertussis* en la interacción innata con neutrófilos

Dado que en ausencia de anticuerpos opsonizantes la infección con *B. parapertussis* no induce la generación de una respuesta oxidativa y la bacteria permanece en fagosomas que no muestran signos de maduración lisosomal, investigamos si esto se refleja en una mayor sobrevida de la bacteria a la interacción con una de las células más agresivas del sistema inmune. Para ello evaluamos la viabilidad intracelular de *B. parapertussis* en presencia o en ausencia de anticuerpos opsonizantes. En la Figura 5 se observa que 1 hora post-infección la sobrevida de *B. parapertussis* en ausencia de anticuerpos fue significativamente mayor que en presencia de estos. Acorde a los resultados obtenidos en los estudios del tráfico intracelular y de la activación de respuesta oxidativa, la falta de expresión del antígeno O determinó una disminución significativa en la sobrevida de *B. parapertussis*. Estos resultados confirman que, en ausencia de anticuerpos, el antígeno O de

B. parapertussis cumple un rol determinante en la interacción con neutrófilos permitiéndole a la bacteria evadir los mecanismos bactericidas y sobrevivir en localización intracelular.

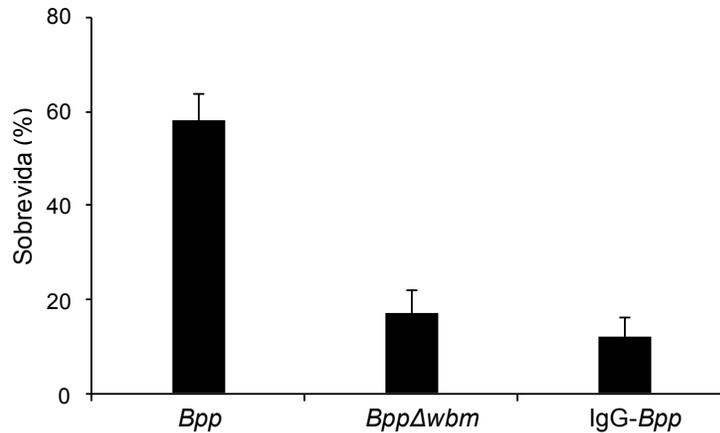


Figura 5. Sobrevivida intracelular de *B. parapertussis* en neutrófilos humanos. *B. parapertussis* no opsonizada (*Bpp*), *B. parapertussis* opsonizada con IgG (IgG-*Bpp*) o un mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*Bpp*Δwbm) fueron incubados con neutrófilos humanos (MDI: 300 no opsonizada; MDI: 30 opsonizada) durante 15 min a 37°C, lavados para eliminar las bacterias no adheridas y tratados con polimixina B para inactivar bacterias extracelulares. El número de bacterias viables por célula fue determinado 1 hora post-infección por recuento de UFC y recuento de neutrófilos en cámara de Neubauer. Los resultados se expresaron como el porcentaje de bacterias vivas por neutrófilo una hora después de la infección, respecto al número de bacterias internalizadas a los 15 minutos después de la infección. Los datos representan la media ± DE de al menos tres experimentos independientes. El número de bacterias no opsonizadas viables difiere significativamente del número de bacterias mutantes y opsonizadas viables una hora posterior a la infección ($P < 0.05$).

2.3.5 La sobrevivida de *B. parapertussis* a la fagocitosis está ligada a su interacción con las balsas lipídicas de la membrana de la célula huésped a través del antígeno O.

En otros patógenos se ha postulado que el rol del antígeno O en la inhibición de la fusión del fagosoma con lisosomas está determinado por su capacidad de interacción con sitios ricos en colesterol en la membrana plasmática, denominados balsas lipídicas, que formarían un fagosoma enriquecido en estas estructuras, manteniendo a la bacteria fuera de la vía degradativa (29, 31). Dado que nuestros resultados indican que el antígeno O está involucrado en la adhesión al neutrófilo, que cumple un rol importante en la sobrevivida intracelular de *B. parapertussis*, y que está involucrado en la inhibición de la maduración

del fagosoma, investigamos el rol de los dominios ricos en colesterol en la interacción de *B. parapertussis* con neutrófilos. Para ello, neutrófilos humanos fueron pre-incubados con metil- β -ciclodextrina, un compuesto capaz de extraer los lípidos de membrana a través de sus núcleos hidrofóbicos (32), desorganizando así las balsas lipídicas. Luego del tratamiento con metil- β -ciclodextrina, los neutrófilos fueron infectados y los niveles de fagocitosis se evaluaron según se describió anteriormente. Los ensayos se realizaron en presencia de lovastatina, un inhibidor de la síntesis *de novo* de colesterol, para evitar la reposición de colesterol en la membrana plasmática. En la Figura 6 se observa que el tratamiento con metil- β -ciclodextrina disminuyó significativamente los niveles de fagocitosis de *B. parapertussis*. Resultados similares se obtuvieron en presencia de nistatina, una droga que se une a colesterol sin extraerlo de la membrana plasmática. Por otro lado, la fagocitosis de la cepa defectiva en la expresión del antígeno O no se vio afectada por el tratamiento de los neutrófilos con los agentes disruptores de balsas lipídicas, indicando que el antígeno O media la interacción de *B. parapertussis* con neutrófilos humanos a través de estos dominios (Fig. 6).

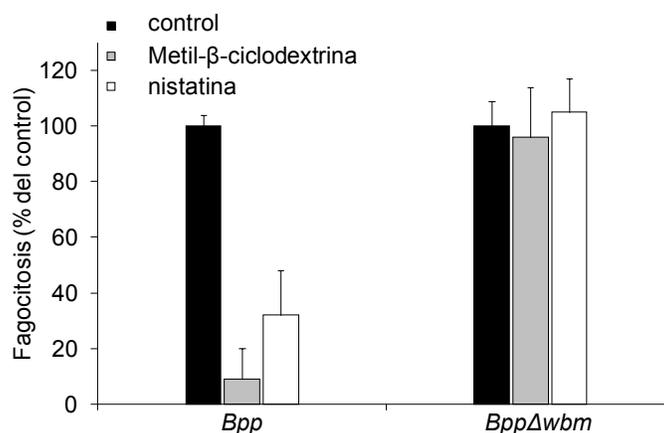


Figura 6. Efecto de la metil- β -ciclodextrina y nistatina en la fagocitosis de *B. parapertussis* por neutrófilos humanos. Neutrófilos tratados con metil- β -ciclodextrina (10 mg/ml), nistatina (35 μ g/ml) o sin tratar, fueron incubados con *B. parapertussis* cepa salvaje (*Bpp*) o un mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*Bpp* Δ *wbm*) (MDI: 300) durante 15 min a 37°C, en presencia de lovastatina, un inhibidor de la síntesis de colesterol. Luego de lavar extensivamente para eliminar las bacterias no adheridas, los neutrófilos se incubaron 1 hora a 37°C para permitir la internalización de las bacterias. Las células fueron fijadas y permeabilizadas previo a la marcación de las bacterias intracelulares con una marca verde fluorescente, y las bacterias extracelulares con marcas

verde y rojo fluorescente. El número de bacterias intracelulares y extracelulares fueron determinadas por microscopía de fluorescencia. Al menos 100 células fueron analizadas por cada condición. En la figura se muestran los valores medios \pm DE de al menos tres experimentos independientes. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de bacterias fagocitadas 1 h después de la infección respecto al control sin tratar (100%) para cada cepa. Los niveles de fagocitosis de la cepa salvaje en neutrófilos tratados con metil- β -cyclodextrina o nistatina difiere significativamente de los niveles de fagocitosis observados en neutrófilos sin tratar ($P < 0.05$). La depleción de colesterol no afectó de manera significativa los niveles de fagocitosis de la cepa mutante de *B. parapertussis* ($P < 0.05$).

Para confirmar la interacción de *B. parapertussis* con las balsas lipídicas, se empleó el marcador flotilina y microscopía confocal. Para ello, neutrófilos infectados con las diferentes cepas bacterianas fueron fijados una hora después de la interacción inicial, sus membranas permeabilizadas, y las bacterias y balsas lipídicas marcadas con diferentes fluoróros. Como se observa en la Figura 7, aproximadamente un 80% de los fagosomas conteniendo la cepa salvaje de *B. parapertussis* se encuentra colocalizando con flotilina. Por el contrario no se observa colocalización de flotilina con la cepa deficiente en la expresión del antígeno O. Este resultado confirma que *B. parapertussis* interacciona con balsas lipídicas y que el antígeno O tiene un rol en esta interacción.

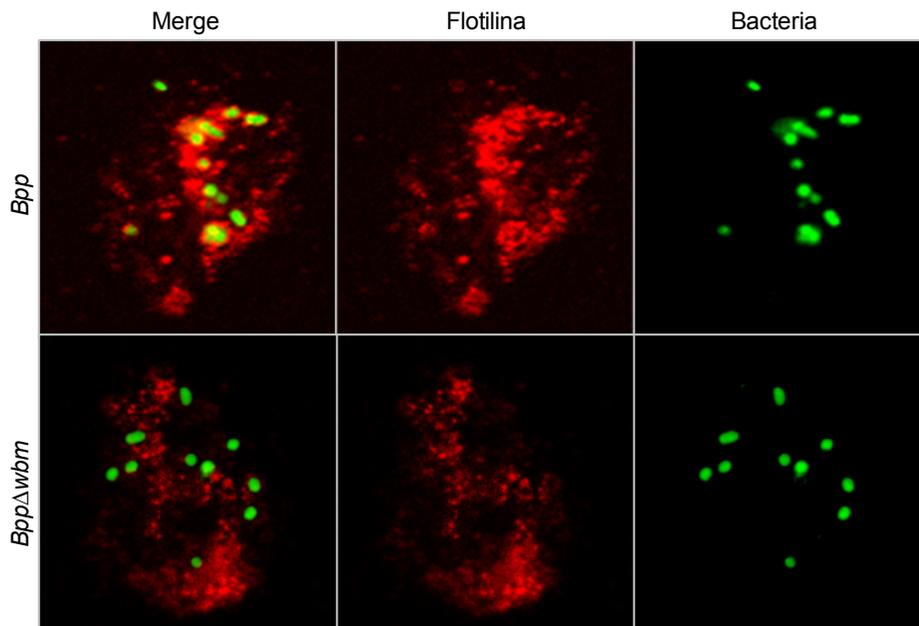


Figura 7. Colocalización de *B. parapertussis* con flotilina. *B. parapertussis* no opsonizada (*Bpp*) o un mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*Bpp* Δ *wbm*)

fueron incubados con neutrófilos (MDI: 300) durante 15 minutos a 37°C. Luego de lavar para eliminar las bacterias no adheridas, las células fueron incubadas 1 h a 37°C, fijadas y permeabilizadas previo a la incubación con anticuerpos contra flotilina-1. La colocalización se evidencia por la acumulación del marcador para flotilina (rojo) alrededor de la bacteria (verde). Se muestran imágenes representativas de uno de tres experimentos independientes.

Por último estudiamos la implicancia de la interacción de *B. parapertussis* con balsas lipídicas en el tráfico intracelular y la sobrevivencia de esta bacteria en neutrófilos. Para esto, se infectaron neutrófilos previamente tratados con metil- β -ciclodextrina, y los niveles de sobrevivencia se determinaron 1 hora post-infección según fue descrito anteriormente. En la Figura 8 se observa que el tratamiento con metil- β -ciclodextrina indujo un aumento significativo en los niveles de colocalización de la cepa salvaje de *B. parapertussis* con LAMP-1, pero no modificó el tráfico de la cepa deficiente en la expresión del antígeno O, indicando que la interacción con las balsas lipídicas a través del antígeno O es lo que dirige a *B. parapertussis* hacia una ruta que evade la fusión fagolisosomal.

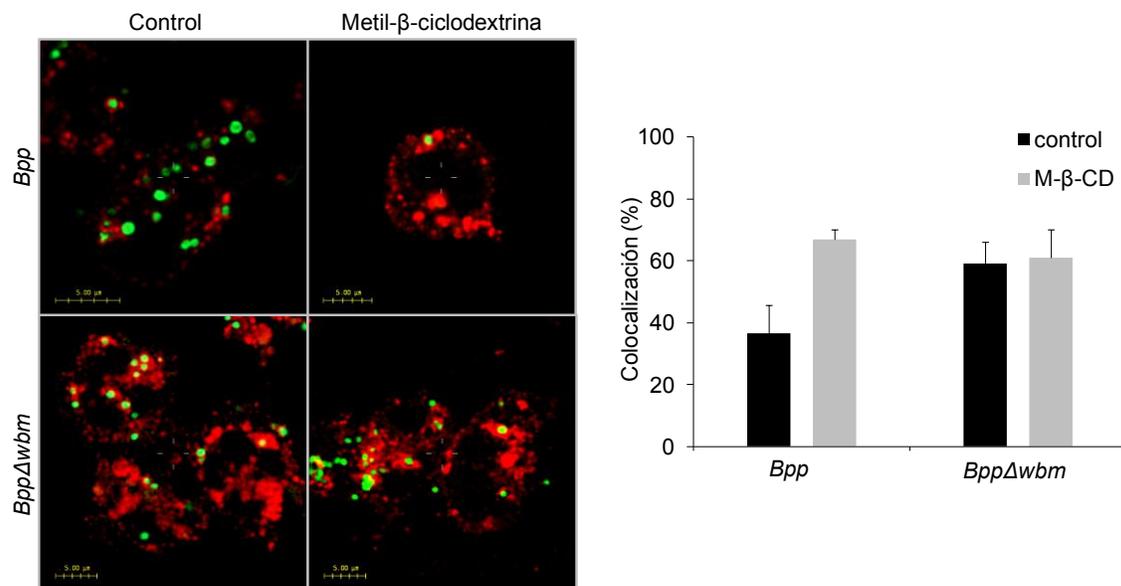


Figura 8. Efecto de la metil- β -ciclodextrina en el tráfico intracelular de *B. parapertussis*. Neutrófilos sin tratar o tratados con metil- β -ciclodextrina (M- β -CD) (10 mg/ml) fueron incubados con *B. parapertussis* cepa salvaje (*Bpp*) o un mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*Bpp Δ *wbm*) (MDI: 300) durante 15 min a 37°C, en presencia de lovastatina, un inhibidor de la síntesis de colesterol. Luego de lavar extensivamente para eliminar las bacterias no adheridas, las células fueron tratadas con*

polimixina B para inactivar bacterias extracelulares e incubadas 1 hora a 37°C. Luego de fijar, las células fueron incubadas con anticuerpos contra LAMP-1 (rojo) y analizadas por microscopia confocal. Los datos representan la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes expresados como el porcentaje de bacterias colocalizando con el marcador LAMP-1. La colocalización se evidencia por la acumulación de Lamp-1 (rojo) alrededor de las bacterias (verde). Los niveles de colocalización de la cepa salvaje de *B. parapertussis* (verde) con LAMP-1 (rojo) en neutrófilos tratados con metil- β -cyclodextrina difieren significativamente de los niveles de colocalización en neutrófilos que no fueron tratados ($P < 0.05$). No se observan diferencias significativas en células tratadas o sin tratar con metil- β -cyclodextrina, infectadas con la cepa deficiente en expresión del antígeno O ($P < 0.05$). Se muestran imágenes representativas de uno de tres experimentos independientes.

En línea con este resultado, mientras que el tratamiento de los neutrófilos con metil- β -cyclodextrina no indujo una disminución significativa en los niveles de sobrevivencia de la cepa deficiente en la expresión del antígeno O, los niveles de sobrevivencia de la cepa salvaje de *B. parapertussis* disminuyeron de forma drástica luego del tratamiento, indicando que el ingreso a través de dominios lipídicos mediado por el antígeno O favorece la sobrevivencia intracelular de esta bacteria (Fig. 9).

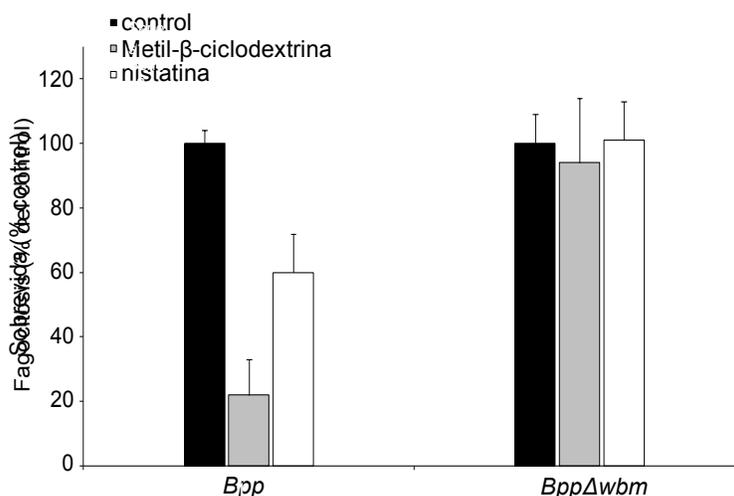


Figura 9. Efecto de la metil- β -cyclodextrina y nistatina en la sobrevivencia intracelular de *B. parapertussis*. Neutrófilos tratados con metil- β -cyclodextrina (10 mg/ml), nistatina (35 μ g/ml) o sin tratar, fueron incubados con *B. parapertussis* cepa salvaje (*Bpp*) o un mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*BppΔwbm*) (MDI: 300) durante 15 min a 37°C, en presencia de lovastatina, un inhibidor de la síntesis de colesterol. Luego de lavar

extensivamente para eliminar las bacterias no adheridas, las células fueron tratadas con polimixina B para inactivar bacterias extracelulares e incubadas 1 hora a 37°C. El número de bacterias viables por célula fue determinado a este tiempo por recuento de UFC y recuento de neutrófilos en cámara de Neubauer. En la figura se muestran los valores medios \pm DE de al menos tres experimentos independientes. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de bacterias vivas por neutrófilo 1 h después de la infección respecto al control sin tratar (100%) para cada cepa. La sobrevivencia de la cepa salvaje en neutrófilos tratados con metil- β -ciclodextrina o nistatina difiere significativamente de la sobrevivencia observada en neutrófilos sin tratar ($P < 0.05$). La depleción de colesterol no afectó de manera significativa los niveles de sobrevivencia de la cepa mutante de *B. parapertussis* ($P < 0.05$).

2.3.6 El antígeno O de *B. parapertussis* evita mecanismos bactericidas extracelulares del neutrófilo

Durante la fagocitosis mediada por neutrófilos el fagosoma nascente se fusiona con los gránulos azurófilos, un tipo especializado de lisosomas secretorios que contiene enzimas lisosomales, proteasas neutras y péptidos bactericidas. Como resultado se produce la formación del fagolisosoma que determina la liberación de parte del contenido de los gránulos azurófilos al medio extracelular (33). Los componentes bactericidas y las citoquinas liberadas generan un entorno hostil que determina la eliminación de patógenos extracelulares y la modulación de la respuesta inmune (34-36). Dado que nuestros resultados muestran que *B. parapertussis* inhibe la maduración fagolisosomal, investigamos si esta bacteria es capaz de evitar la degranulación del neutrófilo y la liberación de componentes de los gránulos al medio extracelular. La liberación de componentes de los gránulos se determinó mediante la medida de la actividad enzimática de la enzima β -glucuronidasa, una de las enzimas contenida en los gránulos azurófilos. La determinación se llevó a cabo en sobrenadantes de neutrófilos infectados con *B. parapertussis* 1 hora post-infección. Como control negativo se utilizó el medio sobrenadante de neutrófilos no infectados. Como control positivo se empleó el sobrenadante de neutrófilos incubados con 0.2% v/v de Triton X-100, que induce la liberación de la totalidad de la enzima β -glucuronidasa contenida en los gránulos (considerado como el 100% de liberación). Todos los valores fueron referidos a este valor. En la Figura 10 se observa que la fagocitosis de la cepa salvaje de *B. parapertussis* no induce una liberación significativa de componentes de los gránulos al medio extracelular. Dado que nuestros resultados demuestran que el antígeno O de *B. parapertussis* determina la evasión de la fusión fagolisosomal, evaluamos

si esta molécula está implicada en la inhibición de la degranulación del neutrófilo. En la Figura 10 se puede observar que la cepa deficiente en la expresión del antígeno O induce la liberación de componentes de los gránulos al medio extracelular, demostrando que esta molécula está implicada en la inhibición de este mecanismo. De acuerdo con los resultados mencionados anteriormente que demuestran que la opsonización de la bacteria determina la activación de la respuesta oxidativa y la maduración del fagolisosoma, en presencia de opsoninas la liberación componentes de los gránulos fue significativamente mayor que en condiciones no opsonizantes (Fig. 10). Estos resultados demuestran que en ausencia de anticuerpos opsonizantes *B. parapertussis* interacciona con los neutrófilos a través del antígeno O inhibiendo la liberación de gránulos azurófilos, evitando así uno de los mecanismos bactericidas extracelulares de estas células.

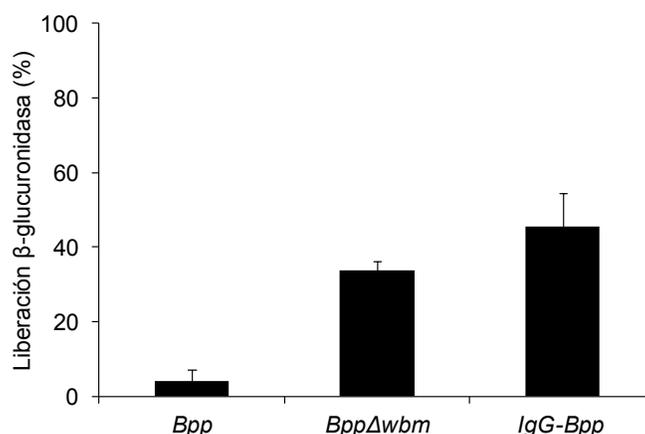


Figura 10. Liberación de gránulos azurófilos por interacción con *B. parapertussis*. Neutrófilos humanos fueron infectados con *B. parapertussis* no opsonizada (*Bpp*), *B. parapertussis* opsonizada con IgG (IgG-*Bpp*) o un mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*Bpp*Δwbm) (MDI: 300 no opsonizada; MDI: 30 opsonizada) durante 1 hora a 37°C. Luego de centrifugar para eliminar neutrófilos y bacterias, se midió la actividad β-glucuronidasa en los sobrenadantes. Como control se utilizaron los sobrenadantes de neutrófilos lisados con Triton X-100. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de β-glucuronidasa liberado al medio extracelular respecto al control. Los datos presentados representan la media ± DE de al menos tres experimentos independientes utilizando neutrófilos de diferentes donantes. La liberación de β-glucuronidasa inducida por *B. parapertussis* en condiciones no opsonizantes difiere significativamente de la liberación inducida por la cepa deficiente en la expresión del antígeno O y de *B. parapertussis* opsonizada ($P < 0,05$).

El otro mecanismo bactericida extracelular importante de los neutrófilos es la liberación al medio extracelular de trampas de ADN extracelulares o NETs (neutrophil extracellular traps), conformadas por cromatina y proteínas con actividad bactericida. La formación de NETs es inducida por diferentes estímulos que determinan la generación de ROS a través de la activación de la NADPH oxidasa en combinación con otros estímulos (24). Dado que nuestros resultados mostraron que *B. parapertussis* evita la formación de ROS, decidimos investigar si esta bacteria es capaz también de evadir este mecanismo bactericida extracelular.

Las células que desarrollan NETs sufren una serie de cambios que se inicia con la descondensación de la cromatina y la desorganización de la envoltura nuclear, finalizando con la ruptura de la membrana plasmática y la liberación del contenido de los gránulos azurófilos y específicos junto a proteínas nucleares y cromatina al medio extracelular. Por lo tanto, la formación de NETs puede determinarse siguiendo los cambios estructurales de la cromatina. En estos ensayos utilizamos yoduro de propidio y microscopía de fluorescencia para la determinación de la formación de NETs. Como control positivo se utilizó PMA (forbol-12-miristato-13-acetato), que induce la formación de NETs mediante la generación de ROS por activación de la NADPH oxidasa y la activación de la vía autofágica (24). La metodología que se empleó en este estudio permite la cuantificación de células netóticas en un estadio temprano de maduración, cuando aún no se ha producido la liberación de cromatina al medio extracelular. Las células netóticas (que liberaran NETs al espacio extracelular) quedan evidenciadas por la aparición de neutrófilos en los que la cromatina ocupa todo el espacio citoplasmático y el núcleo celular se ha desorganizado. En un ensayo preliminar se determinó la cinética de liberación de NETs al medio extracelular por neutrófilos activados por tratamiento con PMA. En la Figura 11A, se observa que 2 horas después del tratamiento con PMA un gran número de neutrófilos (54.9%) ha reorganizado su cromatina y ya no se visualiza el núcleo en su interior, indicado que es una célula netótica que se encuentra en un estadio temprano de maduración y aún no ha liberado la cromatina al medio extracelular. Luego de 3 horas de incubación con PMA ya se ha producido la liberación de cromatina al medio extracelular. A este tiempo de incubación ya no se pueden cuantificar las células que se volvieron netóticas, por lo tanto, en los ensayos siguientes la inducción de células netóticas por un determinado estímulo se evaluó

a las 2 horas post exposición a dicho estímulo. En la Figura 11B se observa que la infección con la cepa salvaje de *B. parapertussis* no induce la formación de NETs si se las compara con las células sin infectar. Este resultado se mantuvo invariable a tiempos mayores (4 horas post-infección; no se muestran los datos). Cabe destacar que a pesar de que la cepa deficiente en la expresión del antígeno O induce la generación de ROS, no se observó inducción de NETs en neutrófilos infectados con una cepa deficiente en la expresión del antígeno O. (Fig. 11B). Este resultado sugiere que *B. parapertussis* inhibe la formación de NETs a través de otros factores bacterianos diferentes del antígeno O, o que no induce la activación de la vía autofágica necesaria para la inducción de NETosis en presencia de la respuesta oxidativa (24).

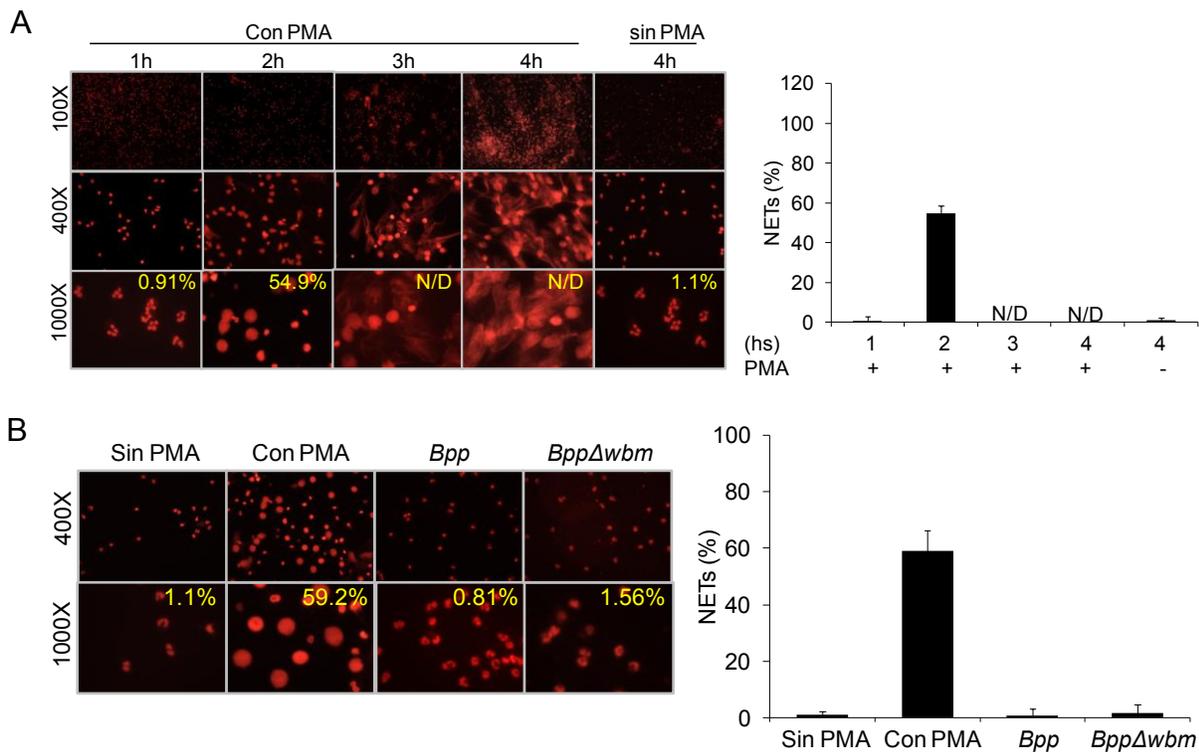


Figura 11. Determinación de la inducción de NETs en neutrófilos humanos. (A) Neutrófilos sin tratar o tratados con PMA fueron incubados durante 2 horas a 37°C. A diferentes tiempos post-infección las células fueron fijadas, teñidas con yoduro de propidio y analizadas por microscopia de fluorescencia. Los resultados se expresaron como el porcentaje de neutrófilos que desarrollaron NETs respecto al total de neutrófilos, a cada tiempo post-infección. Se observa un aumento significativo en la formación de NETs en el tiempo ($P < 0,05$). Se muestran imágenes representativas de uno de tres experimentos independientes. (B) Neutrófilos sin infectar, infectados con *B. parapertussis* cepa salvaje

(*Bpp*) o un mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*Bpp* Δ *wbm*) (MDI: 300) fueron incubados durante 2 horas a 37°C. Luego de fijar las células, se determinó el número de NETs formadas mediante tinción con ioduro de propidio (rojo) y microscopia de fluorescencia. Como control de la formación de NETs se utilizaron neutrófilos tratados con PMA (20 mM). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de neutrófilos que desarrollaron NETs 2 horas post-infección respecto al total de neutrófilos. Los datos presentados representan la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes utilizando neutrófilos de diferentes donantes. La formación de NETs inducida por la cepa salvaje de *B. parapertussis* y la cepa deficiente en la expresión del antígeno O es significativamente menor que la formación de NETs observada en neutrófilos tratados con PMA ($P < 0,05$). Se muestran imágenes representativas de uno de tres experimentos independientes. (N/D: no determinado).

Además de la interacción con bacterias, diferentes estímulos, entre los que se encuentran citoquinas liberadas por células epiteliales o del sistema inmune (25, 37), determinan la inducción de la formación de NETs y contribuyen a la eliminación del patógeno en el sitio de infección. Muchos patógenos han desarrollado la capacidad de inhibir la NETosis desencadenada por factores externos lo cual contribuye significativamente al establecimiento de la infección. Estudios previos demuestran que *CyaA* de *B. pertussis* es capaz de inhibir la formación de NETs inducida por un estímulo externo (PMA) (38). Para determinar si *B. parapertussis* es capaz de inhibir la formación de NETs inducida por PMA, neutrófilos infectados con *B. parapertussis* durante 30 minutos se incubaron con PMA y luego de 2 horas las células fueron fijadas por tratamiento con paraformaldehído, teñidas con ioduro de propidio y analizadas por microscopia de fluorescencia. Como control se evaluó en paralelo la formación de NETs inducida por incubación con PMA en neutrófilos previamente infectados con una cepa salvaje de *B. pertussis* (control negativo) o con una cepa de *B. pertussis* deficiente en la expresión de la *CyaA* (control positivo). Según se puede observar en la Figura 12 tanto la cepa salvaje de *B. parapertussis* como la cepa deficiente en la expresión del antígeno O inhiben de manera eficiente la formación de NETs inducida por PMA. Esta inhibición es dependiente de la viabilidad de la bacteria, dado que la infección con la cepa salvaje de *B. parapertussis* muerta por tratamiento con paraformaldehído (MF *Bpp*) no inhibe la formación de NETs inducida por PMA (Fig. 12). Estos resultados demuestran que *B. parapertussis* inhibe activamente la inducción de NETs aún en presencia de estímulos externos.

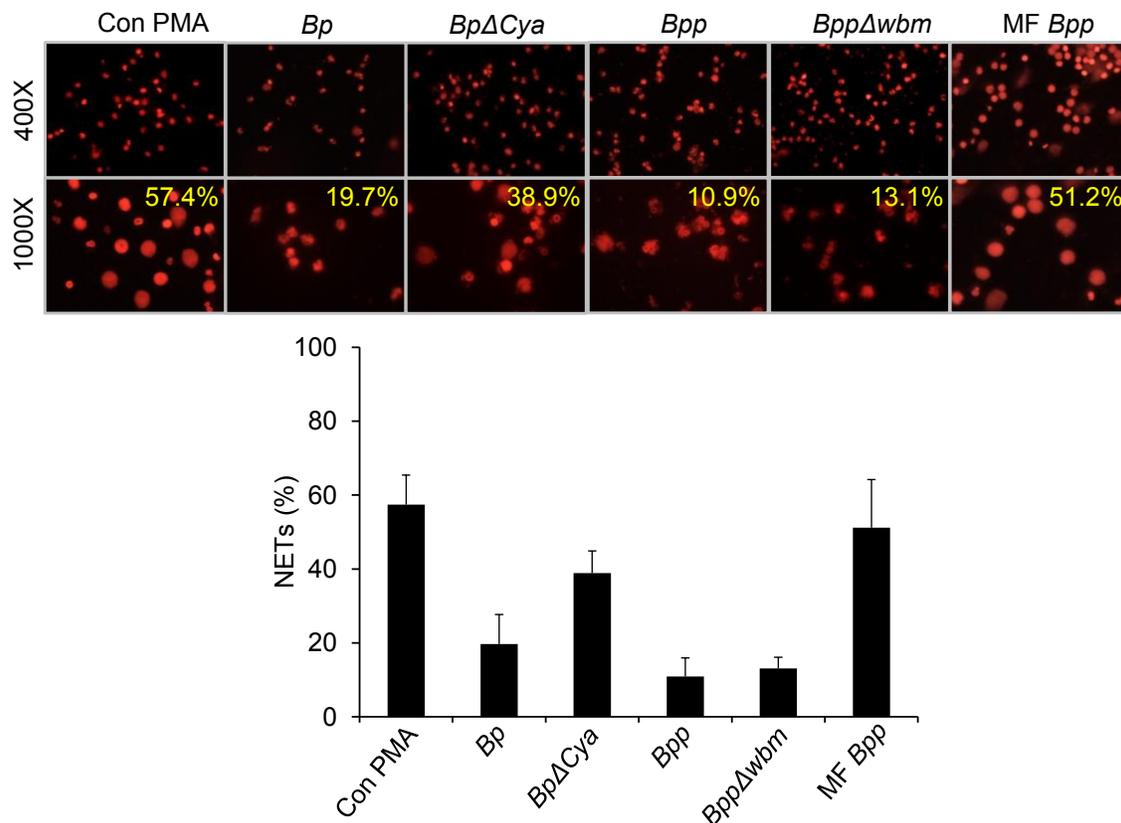


Figura 12. Efecto de la infección con *B. parapertussis* en la formación de NETs inducida por PMA. Neutrófilos sin infectar, infectados con *B. pertussis* cepa salvaje (*Bp*), *B. pertussis* deficiente en la expresión de *CyaA* (*Bp*Δ*Cya*), *B. parapertussis* cepa salvaje (*Bpp*), *B. parapertussis* muerta por paraformaldehído (MF *Bpp*) o un mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*Bpp*Δ*wbm*) (MDI: 300) fueron incubados durante 30 min a 37°C. Luego las células fueron incubadas con PMA 20 nM durante 2 horas y fijadas por tratamiento con paraformaldehído. El número de NETs formadas se determinó mediante tinción con yoduro de propidio (rojo) y microscopia de fluorescencia. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de neutrófilos que desarrollaron NETs 2 horas post-infección respecto al total de neutrófilos. Los datos presentados representan la media ± DE de al menos tres experimentos independientes utilizando neutrófilos de diferentes donantes. Se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes.

Las NETs están formadas por fibras de cromatina intercaladas con diferentes proteínas con actividad bactericida entre las que se encuentra la elastasa (25, 39). Para confirmar la inhibición de la formación de NETs por *B. parapertussis* se estudió si lo que se observa en el control positivo es efectivamente formación de NETs. Para ello se realizaron estudios de colocalización utilizando yoduro de propidio para la marcación del ADN, y anticuerpos contra elastasa. En las células sin infectar que no fueron tratadas con

PMA la elastasa se encuentra en estructuras pequeñas consistentes con gránulos y la cromatina aparece condensada dentro del núcleo (Fig. 13). En los neutrófilos tratados con PMA, la elastasa aparece colocalizando con el ADN, ocupando todo el citoplasma, y formando estructuras que sugieren la generación de NETs (Fig. 13). Cuando los neutrófilos son infectados con *B. parapertussis* previo al tratamiento con PMA, la elastasa permanece localizada por fuera de la cromatina que permanece condensada, confirmando que la bacteria inhibe la formación de NETs. Esta inhibición depende de la viabilidad de la bacteria. En la Figura 13 se observa que la infección con una cepa salvaje de *B. parapertussis* muerta por tratamiento con paraformaldehído induce la formación de NETs funcionales. Estos resultados sugieren que la infección de los neutrófilos previo a la incubación con PMA, bloquea la formación de NETs en una etapa previa a la translocación de la elastasa al núcleo y a la descondensación de la cromatina, en un mecanismo dependiente de la viabilidad de la bacteria.

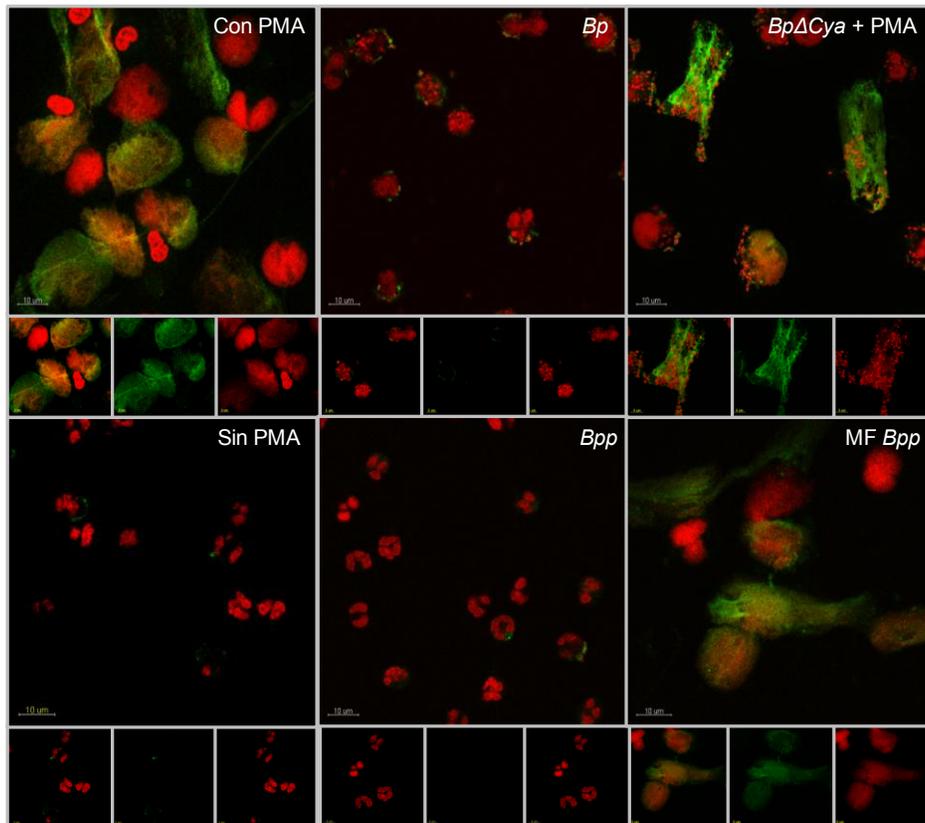


Figura 13. Evaluación de la integridad y composición de las NETs. Neutrófilos sin infectar, infectados con *B. pertussis* cepa salvaje (*Bp*), *B. pertussis* deficiente en la

expresión de *CyaA* (*BpΔCya*), *B. parapertussis* cepa salvaje (*Bpp*) o *B. parapertussis* muerta por paraformaldehído (MF *Bpp*) (MDI: 300) fueron incubados durante 30 min a 37°C. Luego las células fueron incubadas con PMA 20 nM durante 2 horas, fijadas por tratamiento con paraformaldehído y teñidas con yoduro de propidio (rojo), anticuerpos anti-elastasa (verde) y analizadas por microscopia confocal. La formación de NETs se evidencia por la colocalización del marcador para elastasa (verde) con el marcador para ADN (rojo). Se muestran imágenes representativas de uno de tres experimentos independientes.

2.3.7 El antígeno O de *B. parapertussis* inhibe la apoptosis del neutrófilo.

La apoptosis es un proceso que permite, entre otras cosas, limitar la capacidad destructiva de los neutrófilos que han sido activados disminuyendo así los efectos citotóxicos sobre los tejidos adyacentes, y constituye la etapa final en la resolución de los procesos infecciosos. La apoptosis puede ser retrasada o inducida por diferentes microorganismos dependiendo de las estrategias de inmunoevasión de los mismos (40-42). Dado que nuestros resultados demuestran que *B. parapertussis* sobrevive a la interacción innata con los neutrófilos y permanece viable en localización intracelular, decidimos evaluar si, además, *B. parapertussis* modula la apoptosis de estas células lo cual le permitiría una sobrevivencia más larga en un nicho protegido. Para ello neutrófilos sin infectar o infectados con *B. parapertussis* durante 4 horas fueron teñidos con anexina V conjugada a FITC, que se une a la fosfatidilserina solo expuesta en la membrana de las células apoptóticas y yoduro de propidio, que tiñe el núcleo de las células independientemente del estado de viabilidad de la misma, y analizadas por citometría de flujo. El número de células apoptóticas fue determinado a las 4 horas post-infección. En la Figura 14 se observa que la cepa salvaje de *B. parapertussis* induce niveles de apoptosis similares a los de los neutrófilos que no han sido infectados y un gran porcentaje de células permanecen viables sin signos de apoptosis a este tiempo. La falta de expresión del antígeno O o la opsonización de la bacteria inducen niveles de apoptosis significativamente mayores que el control, indicando que en ausencia de anticuerpos opsonizantes *B. parapertussis* inhibe la apoptosis inducida por la infección en un mecanismo dependiente del antígeno O.

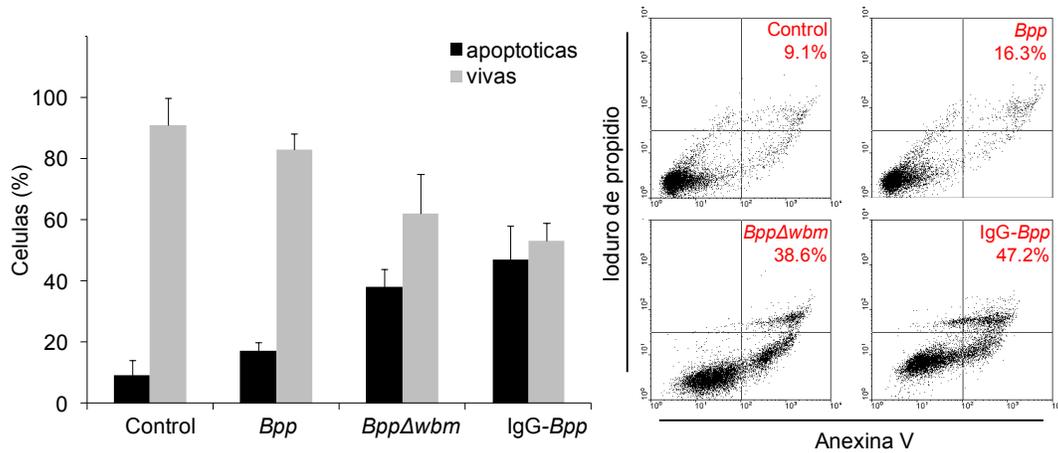


Fig. 14. Determinación de la apoptosis en neutrófilos infectados con *B. parapertussis*. Neutrófilos sin infectar, infectados con *B. parapertussis* no opsonizada (*Bpp*), *B. parapertussis* opsonizada con IgG (*IgG-Bpp*) o un mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*BppΔwbm*) (MDI: 300) fueron incubados durante 4 horas a 37°C. Las células fueron marcadas con anexina V conjugada a FITC (verde) y ioduro de propidio (rojo), y analizadas inmediatamente por citometría de flujo. Los niveles de apoptosis fueron expresados como el porcentaje de células que adquirieron el marcador anexina V respecto al total. Los niveles de apoptosis inducidos por la cepa salvaje de *B. parapertussis* no presentan diferencias significativas con el control, pero si con la cepa deficiente en la expresión del antígeno O y con la cepa salvaje opsonizada ($P < 0,05$). Se muestran diagramas representativos de uno de tres experimentos independientes.

2.4 Discusión

Dado que las vacunas acelulares no inducen anticuerpos capaces de reconocer a *B. parapertussis* ni protección alguna contra esta especie (2, 6), el control de la infección en la mayor parte de la población dependerá exclusivamente de la inmunidad innata. Los neutrófilos son la primera línea de defensa del hospedador y las células efectoras más importantes contra las infecciones bacterianas. Los resultados mostrados en este capítulo, sin embargo, demuestran que en ausencia de anticuerpos opsonizantes *B. parapertussis* sobrevive a la fagocitosis por neutrófilos humanos, y permanece viable en localización intracelular. A diferencia de lo que ocurre en presencia de anticuerpos, la falta de opsonización determina que *B. parapertussis* inhiba la fusión fagolisosomal, siguiendo un tráfico no bactericida, y permanezca en localización intracelular dentro de fagosomas con características de endosoma temprano y con acceso a nutrientes. En ausencia de opsoninas *B. parapertussis* inhibe dos de las actividades microbicidas extracelulares del neutrófilo: la degranulación, evitando la liberación de componentes bactericidas al medio extracelular, y la formación de NETs. Este conjunto de mecanismos de evasión de las distintas actividades bactericidas en neutrófilo da como resultado que una gran proporción (cercana al 98%) de las bacterias que se enfrentan con los neutrófilos sobreviva.

El antígeno O está involucrado en estos mecanismos de evasión de la actividad bactericida. Los resultados muestran que la expresión del antígeno O no solo determina una disminución significativa en la fagocitosis de *B. parapertussis*, sino que además evita la activación de la célula inmune, impidiendo la generación de ROS, y determina un tráfico intracelular que lleva a la evasión de la maduración del fagosoma. Se observó que el nivel de fagocitosis de *B. parapertussis* deficiente en la expresión del antígeno O es significativamente mayor que el de la cepa salvaje, y que un gran porcentaje de los fagosomas conteniendo ésta bacteria adquiere marcadores lisosomales rápidamente, indicando que el antígeno O está involucrado en el tráfico intracelular no bactericida. En línea con estos resultados, la interacción de la cepa deficiente en la expresión del antígeno O indujo la generación de ROS y fue eliminada más eficientemente por la célula inmune.

Estudios previos en otros patógenos mostraron que la presencia del antígeno O dirige a la bacteria a las balsas lipídicas de la membrana celular, y esta interacción es la

que evita que los fagosomas entren en la vía degradativa (29). La asociación a las balsas lipídicas genera un fagosoma enriquecido en componentes de los dominios lipídicos que no se fusiona con lisosomas (31). Nuestros resultados sugieren que *B. parapertussis* podría presentar un mecanismo de este tipo. A diferencia de lo observado con la cepa mutante defectiva en la expresión del antígeno O, la fagocitosis de la cepa salvaje de *B. parapertussis* demostró ser dependiente de la integridad de las balsas lipídicas. Mientras que en la cepa deficiente en la expresión del antígeno O no mostró diferencias en los niveles de fagocitosis por neutrófilos tratados con drogas que desorganizan los dominios lipídicos o se adhieren a estos, la fagocitosis de la cepa salvaje mostró una disminución drástica luego del tratamiento. La dependencia del antígeno O en esta interacción fue confirmada por microscopia confocal utilizando el marcador de balsas lipídicas flotilina. Mientras que la cepa salvaje de *B. parapertussis* mostró elevados niveles de colocalización con áreas enriquecidas en flotilina, la cuales se visualizan como vesículas (rojas) que rodean a la bacteria (verde), no se encontró colocalización del marcador con la cepa deficiente en la expresión del antígeno O. En línea con estos resultados, la evasión de la fusión fagolisosomal y la sobrevida intracelular de *B. parapertussis* mostró ser dependiente tanto de la expresión del antígeno O como de la integridad de las balsas lipídicas. Mientras que el tratamiento con metil- β -ciclodextrina determinó un aumento significativo en los niveles de colocalización de la cepa salvaje de *B. parapertussis* con el marcador lisosomal LAMP-1, el tráfico intracelular de la cepa deficiente en la expresión del antígeno O se mantuvo invariable. Por otro lado, la falta de expresión del antígeno O o el tratamiento con drogas que secuestran colesterol y desorganizan los dominios lipídicos produjo una disminución significativa en los niveles de sobrevida de *B. parapertussis*. Estos resultados sugieren un rol central de las balsas lipídicas y el antígeno O en la fagocitosis, el tráfico intracelular y la sobrevida de *B. parapertussis* en condiciones no opsonizantes, y demuestran el papel crítico del antígeno O en dirigir la bacteria hacia los dominios lipídicos. Por otro lado, nuestros resultados muestran que la interacción a través del antígeno O determina la inhibición de la apoptosis inducida por infección con *B. parapertussis*. Mientras que la cepa deficiente en la expresión del antígeno O indujo altos niveles de apoptosis, las células infectadas con la cepa salvaje de *B. parapertussis* no mostraron diferencias significativas con las células sin infectar. Estos resultados

demuestran que en ausencia de anticuerpos opsonizantes el antígeno O de *B. parapertussis* no solo evita los mecanismos intracelulares de eliminación de patógenos del neutrófilo, sino que también, aumenta la sobrevivencia de la célula inmune. Si bien los neutrófilos no son células adecuadas para el establecimiento de nichos de persistencia, la inhibición de los mecanismos de muerte celular podría contribuir a la persistencia dentro del hospedador de patógenos que sobrevivan en localización intracelular (45).

El antígeno O está involucrado también en la inhibición de los mecanismos de eliminación extracelulares. Nuestros resultados muestran que la interacción a través del antígeno O determina el desacoplamiento de la fusión del fagosoma naciente con los gránulos azurófilos evitando la liberación de componentes bactericidas al medio extracelular. Mientras la cepa deficiente en la expresión del antígeno O indujo la liberación de componentes de los gránulos al medio extracelular, la infección con la cepa salvaje de *B. parapertussis* no indujo la degranulación del neutrófilo. En conjunto, estos resultados demuestran que en ausencia de anticuerpos opsonizantes *B. parapertussis* inhibe tanto la actividad bactericida intracelular como extracelular a través de un mecanismo dependiente del antígeno O, dejando claro que el antígeno O es un factor de virulencia clave en la evasión de mecanismos inmunes. Estos resultados explican la dependencia de la expresión del antígeno O en la colonización del tracto respiratorio observada en ensayos *in vivo* (46). Es interesante destacar que recientemente se ha demostrado que *B. pertussis* (47) también sobrevive a la interacción con estas células inmunes. Sin embargo solo *B. parapertussis* parece depender de la expresión del antígeno O. *B. pertussis* no expresa el antígeno O en su molécula de LPS, y por lo tanto, la interacción no bactericida con estas células no depende de su presencia, lo que refleja la existencia de mecanismos de inmunoevasión distintos y únicos de cada una de éstas especies, ambas estrechamente relacionadas y estrictamente humanas.

Dentro de los mecanismos de eliminación de patógenos extracelulares de los neutrófilos se encuentra la formación de trampas de ADN extracelulares o NETs, conformadas por componentes bactericidas de los gránulos, proteínas nucleares y cromatina. Las NETs se inducen por interacción con determinados patógenos o por determinadas citoquinas (25, 48-50). Nuestros resultados muestran que durante la infección, *B. parapertussis* no induce la formación de NETs. Esto no depende del antígeno

O ya que tampoco se observa inducción de NETs en neutrófilos incubados con la cepa deficiente en la expresión de este antígeno, a pesar de que esta induce la generación de ROS. Si bien la generación de ROS es considerada uno de los estímulos inductores de la generación de NETs, estudios recientes demuestran que este estímulo no es suficiente para desencadenar el proceso de NETosis (23, 51). Nuestros resultados parecen confirmar estos estudios. Cabe señalar, sin embargo, que no se puede descartar que la inducción de NETs dependa de un cierto nivel de ROS que no se alcanza en la interacción de los neutrófilos con la cepa de *B. parapertussis* deficiente en la expresión del antígeno O.

B. parapertussis también bloquea la inducción de NETs en respuesta a estímulos externos. Esta inhibición es dependiente de la viabilidad de la bacteria o de la actividad enzimática de alguna de sus toxinas, dado que la infección con una cepa salvaje de *B. parapertussis* tratada con paraformaldehído no inhibe la formación de NETs inducida por PMA. Actualmente se está trabajando para intentar determinar qué factores bacterianos se encuentran implicados en esta inhibición por *B. parapertussis*. Estudios previos sugieren que CyaA podría ser la responsable de esta inhibición, dado que en *B. pertussis* cumple un rol fundamental en la inhibición de la formación de NETs por estímulos externos (38). De cualquier manera nuestros resultados muestran que *B. parapertussis* inhibe la inducción de NETs y que ésta inhibición es independiente de la presencia del antígeno O.

En presencia de anticuerpos opsonizantes la fagocitosis, la liberación de componentes de los gránulos al medio extracelular, la generación de ROS y la actividad bactericida de la célula inmune aumentan drásticamente. La fagocitosis de la bacteria a través de receptores FcR produce un gran aumento en el porcentaje de bacterias colocalizando con marcadores lisosomales, indicando una ruta intracelular bactericida. En efecto, la presencia de opsoninas aumenta aproximadamente 10 veces la eficiencia de eliminación de *B. parapertussis*. La fagocitosis de la cepa opsonizada a través de Fcy además determina la inducción de apoptosis en neutrófilos, contribuyendo a la resolución del proceso infeccioso. Estos resultados coinciden con resultados *in vivo*, mencionados anteriormente, que demuestran que tanto la presencia de anticuerpos específicos contra *B. parapertussis* como los neutrófilos son necesarios para la eliminación de la bacteria en ratones (1), y sugieren que la presencia de anticuerpos en el sitio de infección es crítica para una eliminación eficiente de este patógeno.

Los resultados presentados en este capítulo se suman a resultados previos en los que se demuestran las diferentes funciones inmunoevasoras del antígeno O, y remarcan el rol central de esta molécula en la patogenicidad de *B. parapertussis*. Además de proteger a la bacteria del reconocimiento por anticuerpos inducidos por vacunación o infección por *B. pertussis* (4, 5) y evitar la activación de complemento, el antígeno O evita la acción bactericida de neutrófilos en huéspedes no inmunes. Estos resultados subrayan la necesidad de considerar la inclusión de antígenos que induzcan la generación de anticuerpos que reconozcan a *B. parapertussis* en las vacunas contra la tos convulsa.

2.5 Referencias

1. Wolfe DN, Kirimanjeswara GS, and Harvill ET. 2005. Clearance of *Bordetella parapertussis* from the lower respiratory tract requires humoral and cellular immunity. *Infect Immun.* 73:6508-6513.
2. David S, van Furth R, and Mooi FR. 2004. Efficacies of whole cell and acellular pertussis vaccines against *Bordetella parapertussis* in a mouse model. *Vaccine.* 22:1892-1898.
3. He Q, Viljanen MK, Arvilommi H, Aittanen B, and Mertsola J. 1998. Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population. *JAMA.* 280:635-637.
4. Zhang X, Rodriguez ME, and Harvill ET. 2009. O antigen allows *B. parapertussis* to evade *B. pertussis* vaccine-induced immunity by blocking binding and functions of cross-reactive antibodies. *PLoS One.* 4:e6989.
5. Zhang X, Goebel EM, Rodriguez ME, Preston A, and Harvill ET. 2009. The O antigen is a critical antigen for the development of a protective immune response to *Bordetella parapertussis*. *Infect Immun.* 77:5050-5058.
6. Watanabe M, and Nagai M. 2004. Whooping cough due to *Bordetella parapertussis*: an unresolved problem. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2:447-454.
7. Chiappini E, Stival A, Galli L, and de Martino M. 2013. Pertussis re-emergence in the post-vaccination era. *BMC Infect Dis.* 13:151.
8. Long GH, Karanikas AT, Harvill ET, Read AF, and Hudson PJ. 2010. Acellular pertussis vaccination facilitates *Bordetella parapertussis* infection in a rodent model of bordetellosis. *Proc Biol Sci.* 277:2017-2025.
9. Mann PB, Wolfe D, Latz E, Golenbock D, Preston A, and Harvill ET. 2005. Comparative toll-like receptor 4-mediated innate host defense to *Bordetella* infection. *Infect Immun.* 73:8144-8152.
10. Allen A, and Maskell D. 1996. The identification, cloning and mutagenesis of a genetic locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 19:37-52.
11. Preston A, Allen AG, Cadisch J, Thomas R, Stevens K, Churcher CM, Badcock KL, Parkhill J, Barrell B, and Maskell DJ. 1999. Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in bordetellae. *Infect Immun.* 67:3763-3767.
12. Weiss AA, Melton AR, Walker KE, Andraos-Selim C, and Meidl JJ. 1989. Use of the promoter fusion transposon Tn5 lac to identify mutations in *Bordetella pertussis* vir-regulated genes. *Infect Immun.* 57:2674-2682.
13. Repp R, Valerius T, Sendler A, Gramatzki M, Iro H, Kalden JR, and Platzer E. 1991. Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 78:885-889.

14. Wolfe DN, Goebel EM, Bjornstad ON, Restif O, and Harvill ET. 2007. The O antigen enables *Bordetella parapertussis* to avoid *Bordetella pertussis*-induced immunity. *Infect Immun.* 75:4972-4979.
15. Rodriguez ME, Van der Pol WL, and Van de Winkel JG. 2001. Flow cytometry-based phagocytosis assay for sensitive detection of opsonic activity of pneumococcal capsular polysaccharide antibodies in human sera. *J Immunol Methods.* 252:33-44.
16. Hellwig SM, van Oirschot HF, Hazenbos WL, van Spruiel AB, Mooi FR, and van De Winkel JG. 2001. Targeting to Fc γ receptors, but not CR3 (CD11b/CD18), increases clearance of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis.* 183:871-879.
17. Van den Herik-Oudijk IE, Capel PJ, van der Bruggen T, and Van de Winkel JG. 1995. Identification of signaling motifs within human Fc γ RIIa and Fc γ RIIb isoforms. *Blood.* 85:2202-2211.
18. Schmitz FJ, Veldkamp KE, Van Kessel KP, Verhoef J, and Van Strijp JA. 1997. Delta-toxin from *Staphylococcus aureus* as a costimulator of human neutrophil oxidative burst. *J Infect Dis.* 176:1531-1537.
19. Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovics ML, Harvill ET, and Rodriguez ME. 2010. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun.* 78:907-913.
20. Sturgill-Koszycki S, Schaible UE, and Russell DG. 1996. *Mycobacterium*-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *EMBO J.* 15:6960-6968.
21. Lee CK, Roberts AL, Finn TM, Knapp S, and Mekalanos JJ. 1990. A new assay for invasion of HeLa 229 cells by *Bordetella pertussis*: effects of inhibitors, phenotypic modulation, and genetic alterations. *Infect Immun.* 58:2516-2522.
22. Gregoire C, Welch H, Astarie-Dequeker C, and Maridonneau-Parini I. 1998. Expression of azurophil and specific granule proteins during differentiation of NB4 cells in neutrophils. *J Cell Physiol.* 175:203-210.
23. Remijnsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, and Vanden Berghe T. 2011. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell death and differentiation.* 18:581-588.
24. Remijnsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, Noppen S, Delforge M, Willems J, and Vandenabeele P. 2011. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* 21:290-304.
25. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, and Zychlinsky A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 303:1532-1535.
26. Saldias MS, Ortega X, and Valvano MA. 2009. *Burkholderia cenocepacia* O antigen lipopolysaccharide prevents phagocytosis by macrophages and adhesion to epithelial cells. *J Med Microbiol.* 58:1542-1548.

27. Klena J, Zhang P, Schwartz O, Hull S, and Chen T. 2005. The core lipopolysaccharide of *Escherichia coli* is a ligand for the dendritic-cell-specific intercellular adhesion molecule nonintegrin CD209 receptor. *J Bacteriol.* 187:1710-1715.
28. Eder K, Vizler C, Kusz E, Karcagi I, Glavinas H, Balogh GE, Vigh L, Duda E, and Gyorfy Z. 2009. The role of lipopolysaccharide moieties in macrophage response to *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* 389:46-51.
29. Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S, and Liautard JP. 2003. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun.* 71:1481-1490.
30. Matiasovic J, Stepanova H, Volf J, Kubala L, Ovesna P, Rychlik I, and Faldyna M. 2011. Influence of the lipopolysaccharide structure of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on interactions with pig neutrophils. *Vet Microbiol.* 150:167-172.
31. Manes S, del Real G, and Martinez AC. 2003. Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol.* 3:557-568.
32. Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, and Sandvig K. 1999. Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell.* 10:961-974.
33. Borregaard N, and Cowland JB. 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 89:3503-3521.
34. Soehnlein O, Zerneck A, and Weber C. 2009. Neutrophils launch monocyte extravasation by release of granule proteins. *Thromb Haemost.* 102:198-205.
35. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, and Cassatella MA. 2000. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev.* 177:195-203.
36. Soehnlein O, Weber C, and Lindbom L. 2009. Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol.* 30:538-546.
37. Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, Wardini AB, Pinto-da-Silva LH, and Saraiva EM. 2012. ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. *J Parasitol Res.* 2012:929743.
38. Hewlett EL, Gordon VM, McCaffery JD, Sutherland WM, and Gray MC. 1989. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Identification and purification of the holotoxin molecule. *J Biol Chem.* 264:19379-19384.
39. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, and Zychlinsky A. 2010. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 191:677-691.
40. Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Muller K, Solbach W, and Laskay T. 2002. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol.* 169:898-905.

41. Eby JC, Gray MC, and Hewlett EL. 2014. Cyclic AMP-mediated suppression of neutrophil extracellular trap formation and apoptosis by the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect Immun.* 82:5256-5269.
42. Blomgran R, Zheng L, and Stendahl O. 2004. Uropathogenic *Escherichia coli* triggers oxygen-dependent apoptosis in human neutrophils through the cooperative effect of type 1 fimbriae and lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 72:4570-4578.
43. Lavine J, Broutin H, Harvill ET, and Bjornstad ON. 2010. Imperfect vaccine-induced immunity and whooping cough transmission to infants. *Vaccine* 29:11-16.
44. Liese JG, Renner C, Stojanov S, and Belohradsky BH. 2003. Clinical and epidemiological picture of *B pertussis* and *B parapertussis* infections after introduction of acellular pertussis vaccines. *Arch Dis Child.* 88:684-687.
45. Scaife H, Woldehiwet Z, Hart CA, and Edwards SW. 2003. *Anaplasma phagocytophilum* reduces neutrophil apoptosis in vivo. *Infect Immun.* 71:1995-2001.
46. Burns VC, Pishko EJ, Preston A, Maskell DJ, and Harvill ET. 2003. Role of *Bordetella O* antigen in respiratory tract infection. *Infect Immun.* 71:86-94.
47. Lamberti Y, Perez Vidakovics ML, van der Pol LW, and Rodriguez ME. 2008. Cholesterol-rich domains are involved in *Bordetella pertussis* phagocytosis and intracellular survival in neutrophils. *Microb Pathog.* 44:501-511.
48. Zawrotniak M, and Rapala-Kozik M. 2013. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta Biochim Pol.* 60:277-284.
49. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, and Papayannopoulos V. 2014. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol.* 15:1017-1025.
50. Branzk N, and Papayannopoulos V. 2013. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Semin Immunopathol.* 35:513-530.
51. Douda DN, Yip L, Khan MA, Grasemann H, and Palaniyar N. 2014. Akt is essential to induce NADPH-dependent NETosis and to switch the neutrophil death to apoptosis. *Blood.* 123:597-600.

CAPITULO 3

Bordetella parapertussis sobrevive dentro de macrófagos.
Posible nicho de persistencia intracelular.

3. *Bordetella parapertussis* sobrevive dentro de macrófagos. Posible nicho de persistencia intracelular.

3.1 Introducción

En los estudios mostrados en el capítulo anterior observamos que en ausencia de anticuerpos opsonizantes *B. parapertussis* evade los mecanismos bactericidas del neutrófilo y sobrevive en localización intracelular. El ingreso al neutrófilo a través de balsas lipídicas favorece la sobrevivencia de *B. parapertussis* al evitar la biogénesis del fagolisosoma. Diferentes patógenos intracelulares interactúan con balsas lipídicas y las retienen en sus fagosomas previniendo la entrada en la vía degradativa y evitando la acción bactericida de las células inmunes. Tal es el caso de *Mycobacterium spp.*, *Brucella spp.*, y *Legionella pneumophila* (1-7). La sobrevivencia por tiempos prolongados en localización intracelular permite que estos patógenos desarrollen infecciones crónicas, muchas veces subclínicas o inclusive asintomáticas. Los mecanismos de inmunoevasión observados en *B. parapertussis* sugieren que esta bacteria podría presentar un mecanismo de este tipo.

Esta evasión de la actividad bactericida del neutrófilo en individuos no inmunes probablemente contribuya al desarrollo de la infección. Sin embargo, en el sitio de infección *B. parapertussis* deberá enfrentar otros fagocitos profesionales como son los macrófagos, el resultado de la interacción con este tipo celular también será clave para el establecimiento de la infección. Los macrófagos son células bactericidas, aunque menos agresivas que los neutrófilos, y de vida media más larga. En el pulmón los macrófagos alveolares cumplen una función primordial en la inmunidad del huésped, en virtud de su alta capacidad fagocítica y su participación en la presentación antigénica. Sin embargo varios patógenos intracelulares obligados y facultativos han desarrollado mecanismos mediante los cuales sobreviven y establecen infecciones intracelulares prolongadas dentro de estas células (8-10). Los macrófagos cumplen un rol fundamental como efectores de la inmunidad innata y como moduladores de la inmunidad adaptativa en respuesta a infecciones bacterianas. Por este motivo estas células son determinantes en el curso que pueda tomar una infección. Los microorganismos que tienen la capacidad de afectar el funcionamiento normal de los macrófagos pueden indirectamente influenciar la respuesta

inmune del hospedador (11). Por lo tanto, la infección intracelular en este tipo de células puede contribuir a la colonización del huésped de varias formas; brindándole a la bacteria un nicho protegido de agentes bactericidas que se encuentran en circulación o componentes del sistema inmune que actúan fuera de la célula, e influyendo en la generación de la respuesta adaptativa. En este contexto, en este capítulo, estudiamos la interacción de *B. parapertussis* con macrófagos humanos con el fin de evaluar su capacidad para limitar la infección de *B. parapertussis*, o por el contrario, si pueden proporcionar un nicho de persistencia para esta bacteria. Para ello utilizamos monocitos humanos primarios diferenciados a macrófago que, según se ha reportado, son un buen modelo de macrófagos alveolares (12, 13), un tipo celular relevante en infecciones pulmonares. Aunque los macrófagos alveolares no son generados a partir de monocitos circulantes (14), los macrófagos diferenciados de monocitos presentan características moleculares y fisiológicas de gran similitud con este tipo celular.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Para la realización de este estudio se emplearon las siguientes cepas. *B. parapertussis* CN2591 (cepa salvaje) y una cepa mutante isogénica defectiva en la expresión del antígeno O denominada CN2591 Δ *wbm* (15, 16). Las bacterias fueron cultivadas en placas de Agar Bordet Gengou (DIFCO Laboratories, USA), suplementada con 15% v/v de sangre desfibrinada de carnero (ABGs), durante 24 hs a 37°C. Al cabo de este tiempo se repicó en una nueva placa ABGs y se cultivó a 37°C durante 20 hs.

3.2.2 Aislamiento de macrófagos

La sangre utilizada para la obtención de macrófagos proviene de donantes voluntarios sanos. Mediante gradiente de centrifugación en Ficoll-Paque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) según ha sido descrito previamente (17), se aislaron las células mononucleares humanas de sangre periférica (PBMC). Estas fueron lavadas y resuspendidas en DMEM conteniendo 10% v/v de SFB La fracción correspondiente a las PBMC se encuentra enriquecida en monocitos y linfocitos. Para el aislamiento de los monocitos, las células fueron colocadas en placas de 6 pocillos de 2 cm de diámetro (5×10^6 células/pocillo) e incubadas durante 2 hs a 37°C en 5% CO₂. Las células no adheridas (linfocitos) fueron removidas mediante tres lavados con DMEM-SFB 10% v/v y los monocitos adheridos fueron cultivados durante 6 días en DMEM-SFB 10% v/v para permitir la maduración a macrófago. A este tiempo los macrófagos diferenciados (18), que serán referidos como macrófagos a lo largo de este capítulo, fueron utilizados para realizar los ensayos de infección.

3.2.3 Anticuerpos y sueros

Los siguientes anticuerpos fueron utilizados en este ensayo: anticuerpos policlonales de conejo anti-Flotilina humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con CY3 y fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC (ambos de Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG

de ratón conjugados con CY3 y Fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con FITC (ambos de Southern Biotechnology) También se empleó la fracción IgG de un pool de sueros de pacientes con elevado título contra *B. parapertussis*, según se determinó por ELISA (19), obtenida como se describe en Rodríguez *et al.* (20), suero anti-*B. parapertussis* de conejo obtenido según se describe en Hellwig *et al.* (21), y suero anti-*B. parapertussis* de ratón obtenidos según se describe en (22).

3.2.4 Tratamiento de macrófagos con drogas desorganizadoras de balsas lipídicas

La desorganización de los dominios lipídicos se llevó a cabo mediante la incubación de los macrófagos con diferentes drogas que extraen o se adhieren al colesterol de membrana. Para ello, previo a la infección, los macrófagos fueron incubados con 1, 3.5 o 10 mg/ml de metil- β -ciclodextrina (Sigma) durante 15 min a 37°C o con 8, 17.5 o 35 μ g/ml de nistatina (Sigma) durante 30 min a 37°C en medio DMEM suplementado con BSA (0.2% p/v). En los ensayos que se utilizó metil- β -ciclodextrina, luego de la incubación con esta droga las células fueron lavadas e incubadas con medio de cultivo suplementado con lovastatina (5 μ g/ml) (Sigma) (DMEM-BSA-Lovastatina) la cual fue mantenida durante todo el ensayo La lovastatina inhibe la síntesis *de novo* de colesterol impidiendo la reposición de colesterol en la membrana plasmática. La viabilidad celular no fue afectada por el tratamiento con estas drogas según se determinó mediante tinción vital con Trypan Blue y recuento en cámara de Neubauer.

3.2.5 Neutralización del pH vacuolar en macrófagos

La neutralización del pH vacuolar se llevó a cabo mediante la incubación de los macrófagos con bafilomicina A1 (BAF), un inhibidor de las ATPasas vacuolares (v-ATPasa). Para ello, 1 hora antes de la infección los macrófagos fueron incubados con una solución de BAF 100 nM. La BAF fue mantenida en el medio durante todo el tiempo del ensayo. En experimentos control se determinó el efecto de la BAF sobre la acidificación vacuolar mediante la incubación de macrófagos tratados y sin tratar con la molécula ácido trófica LysoTracker red DND-99. Luego del tratamiento con BAF no se encontraron vesículas marcadas con LysoTracker según se determinó por microscopia confocal, indicando que la incubación con BAF evita de manera eficiente la acidificación vacuolar.

La BAF no afectó la viabilidad celular ni tampoco la viabilidad de las bacterias según se determinó por tinción vital con Trypan Blue y recuento de UFC, respectivamente.

3.2.6 Cuantificación de la adhesión y fagocitosis

La adhesión y fagocitosis de *B. parapertussis* fue determinada por la marcación de la bacteria con sondas fluorescentes y microscopía de fluorescencia. Para ello, los macrófagos adheridos y diferenciados fueron infectados con una suspensión de *B. parapertussis* opsonizada con IgG o sin opsonizar en DMEM-BSA 0.2% (MDI: 30). El inoculó bacteriano fue cuantificado mediante recuento de UFC en ABGs. Para facilitar la interacción de las bacterias con los macrófagos y sincronizar la infección, las células fueron centrifugadas durante 5 min a 640 x g. Luego de 40 min de incubación a 37°C con 5% CO₂, los macrófagos fueron lavados para eliminar las bacterias no adheridas y fijados con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Luego de la fijación, los macrófagos se lavaron con PBS y se incubaron con NH₄Cl 50 mM durante 10 minutos a temperatura ambiente. El número de bacterias adheridas a la superficie del macrófago y aquellas internalizadas fueron determinadas por doble marcación fluorescente y microscopía de fluorescencia. Para determinar el número de bacterias extracelulares adheridas al macrófago las células fueron incubadas con anticuerpos policlonales de conejo anti-*B. parapertussis* (30 minutos a 4°C), seguido por la incubación con fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados a CY3 (30 minutos a 4°C). Para determinar el número de bacterias intracelulares las células fueron lavadas y permeabilizadas mediante la incubación con una solución de saponina 0.1% y BSA 0.2% (30 minutos a 4°C), seguido de la tinción de las bacterias por inmunofluorescencia indirecta. Para ello las células fueron incubadas con anticuerpos policlonales de conejo anti-*B. parapertussis* en PBS con saponina 0.1% y BSA 0.2% (30 minutos a 4°C), seguido por la incubación con fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados a FITC (30 minutos a 4°C) también en presencia de saponina 0.1% y BSA 0.2%. Luego del lavado con agua destilada para eliminar el exceso de sales, las muestras se montaron sobre cubreobjetos. Las muestras fueron analizadas por microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio DMLB acoplado a una cámara DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Switzerland). El número de bacterias extracelulares

(rojas y verdes) e intracelulares (verdes) se determinó por observación de al menos 100 células de cada condición. Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces por triplicado.

3.2.7 Colocalización con marcadores de tránsito intracelular

Los estudios de colocalización fueron realizados como ha sido descrito anteriormente (18), con algunas modificaciones. Macrófagos incubados con las diferentes cepas bacterianas durante 40 min a 37°C fueron lavados para remover bacterias no adheridas y posteriormente incubados con 100 µg/ml de polimixina B durante 1 h a 37°C para eliminar las bacterias que no fueron fagocitadas. Posteriormente la concentración de antibiótico fue reducida a 5 µg/ml, y se mantuvo durante el resto del ensayo. A las 2 o 48 hs después de la infección algunos macrófagos fueron incubados con LysoTracker DND-99 200nM (Molecular Probes) (5 min a 37°C) previo a su fijación y otros fueron fijados directamente con paraformaldehído 4%. Aquellas células que fueron teñidas con LysoTracker fueron lavadas e incubadas durante 10 min con NH₄Cl 50 mM. Luego de lavar con PBS las células fueron incubadas con PBS suplementado con saponina 0,1% p/v (Sigma) y BSA (Sigma) 0.2% p/v durante 30 min a 25°C e incubadas con anticuerpos policlonales de conejo anti-*B. parapertussis* (30 min a 25°C) en presencia de 0.1% saponina y 0.2% BSA. Luego de tres lavados, los macrófagos fueron incubados con fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC (30 min a 25°C) en presencia de saponina 0.1% y BSA 0.2% . Aquellas células que no fueron teñidas con LysoTracker, luego de la fijación, fueron lavadas e incubadas durante 10 min con NH₄Cl 50 mM. Luego de lavar con PBS las células fueron incubadas con PBS suplementado con saponina 0.1% p/v (Sigma) y BSA (Sigma) 0.2% p/v durante 30 min. Posteriormente las células fueron incubadas con anticuerpos policlonales de conejo anti-flotilina y anticuerpos policlonales de ratón anti-*B. parapertussis* (30 min a 25°C) en presencia de 0.1% saponina y 0.2% BSA. Luego de tres lavados, los macrófagos fueron incubados con fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC y fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con FITC (30 min a 25°C) en presencia de 0.1% saponina y 0.2% BSA. Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos todas las incubaciones fueron realizadas en presencia de

25% v/v de suero humano inactivado por calor. Las muestras fueron analizadas por microscopia confocal (Leica TCS SP5, Germany). El porcentaje de bacterias que colocalizan con un marcador determinado fue calculado mediante la observación de al menos 50 fagosomas por donante.

3.2.8 Sobrevida intracelular: ensayo de protección a polimixina B

Los macrófagos fueron infectados con las distintas cepas de *B. parapertussis* según se describió en los ensayos de adhesión. El inóculo bacteriano fue cuantificado mediante recuento de UFC en ABGs. Luego de 40 min de incubación a 37°C con 5% CO₂, los macrófagos fueron lavados para eliminar las bacterias no adheridas. A este tiempo las células fueron incubadas con sulfato de polimixina B (100 µg/ml) (Sigma) durante 1 h a 37°C, un antibiótico que no penetra en las células eucariotas (23). Posteriormente la concentración de antibiótico fue reducida a 5 µg/ml, la cual se mantuvo durante el resto del ensayo. La polimixina B inactiva las bacterias extracelulares adheridas al macrófago y las bacterias en suspensión que no fueron eliminadas por los lavados. Experimentos control demuestran que en presencia de polimixina B 5 µg/ml *B. parapertussis* no es capaz de replicar o sobrevivir en el medio de cultivo. Paralelamente se determinó el número de UFC en los sobrenadantes de los cultivos celulares a diferentes tiempos posterior a la infección no detectándose bacterias viables en los tiempos ensayados (2 y 48 hs). A diferentes tiempos post-infección (2 y 48 hs) la sobrevida de las bacterias en localización intracelular fue determinada según se detalla a continuación. Luego de lavar para eliminar la polimixina B los macrófagos fueron incubados durante 15 minutos a 37°C con PBS suplementado con EDTA 5mM y lidocaína 4 mg/ml para levantar las células de las placas de cultivo. Cada muestra se dividió en dos alícuotas. Una de ellas se utilizó para determinar el número de macrófagos viables mediante tinción con Trypan Blue y recuento en cámara de Neubauer y la otra fue incubada en agua destilada durante 10 min a 4°C para provocar la lisis osmótica de la célula permitiendo la liberación de las bacterias intracelulares. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en agua destilada con saponina 0,1% p/v y se sembró una dilución adecuada de cada muestra en ABGs para determinar el número de bacterias por recuento de UFC. Paralelamente se determinó el número de bacterias fagocitadas a los 40 minutos para poder calcular el porcentaje de bacterias internalizadas que permanecieron

viables durante 2 y 48 horas después de la fagocitosis. El número de bacterias fagocitadas se determinó por microscopía de fluorescencia según se describió anteriormente.

En experimentos control se evaluó la actividad bactericida de la polimixina B. Para ello, muestras de 5×10^8 bacterias fueron incubadas con 1 ml de polimixina B (100 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 h a 37°C, lavadas y sembradas en ABGs. El tratamiento determinó una disminución del 99,999% en la viabilidad bacteriana, según se determinó por recuento de UFC. Las diferentes cepas bacterianas utilizadas no mostraron diferencias significativas en la sensibilidad a la polimixina B. En determinados experimentos, las bacterias fueron opsonizadas con IgG humana (200 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 min a 37°C previo a la incubación con los macrófagos (MDI: 30).

3.2.9 Determinación de bacterias intracelulares viables por FISH

La determinación de la viabilidad bacteriana mediante esta técnica se basa en la detección de secuencias ARN específicas que están presentes solo en microorganismos viables. Las bacterias contienen un gran número de copias de ARN 16S ribosomal (rARN 16S) por célula que son degradadas rápidamente luego de morir y por lo tanto pueden ser utilizadas para determinar el estado fisiológico en que se encuentra una bacteria. En este estudio utilizamos sondas de ADN complementarias al rARN 16S para la determinación de bacterias intracelulares viables. Para ello, luego de 40 min de infección los macrófagos fueron lavados para eliminar las bacterias no adheridas y fijados con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. La hibridación con sondas de oligonucleótidos fluorescentes se realizó según se describe en (24). Se utilizaron las sondas de ADN BET42a (5'-GCCTTCCCACTTCGTTT-3') y EUB338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') conjugadas a Alexa 488 que reconocen el rRNA 16S de las bacterias pertenecientes a la subclase de beta proteobacterias y eubacterias, respectivamente (25). Como control negativo se utilizó una sonda complementaria a EUB338 conjugada a Alexa 488 denominada non-EUB338. Las sondas BET42a y EUB338 fueron utilizadas juntas para aumentar la sensibilidad de detección. Las sondas se fueron preparadas en buffer de hibridación (0.9 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0.01% SDS y 35% formamida) en una concentración final de 10 nM. Luego de lavar los macrófagos con agua bidestilada y filtrada, las células fueron incubadas con las sondas durante 1.5 hs a 46°C en cámara

humada saturada en el buffer de hibridación. Posteriormente las células fueron lavadas con buffer de lavado (80 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0.01% SDS y 5 mM EDTA, pH 8) durante 30 minutos a 48°C. La marcación de las bacterias totales (vivas y muertas) se realizó mediante tinción de la bacteria con anticuerpos policlonales de conejo anti-*B. parapertussis* (30 min a 4°C), seguido por la incubación con fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados a CY3 (30 min a 4°C). Luego de un lavado con PBS las células fueron lavadas con agua bidestilada filtrada y montadas sobre un portaobjeto para la determinación del número de bacterias viables mediante microscopia confocal (Leica TCS SP5, Germany). En experimentos control con bacterias muertas por incubación con polimixina B se demostró que la marcación con estas sondas no generan señal detectable.

3.2.10 Estudios de adquisición de transferrina humana

Estos estudios fueron realizados según se ha descrito anteriormente (26) con modificaciones menores. Macrófagos infectados fueron deplecionados de transferrina mediante la incubación con DMEM-BSA 1% p/v durante 1 h a 37°C. Posteriormente las células fueron incubadas con 10 µg/ml de transferrina marcada con Alexa-594 (Molecular Probes) durante 10 min a 4°C en medio DMEM con BSA 1% p/v para permitir la adhesión de la transferrina. Las células fueron incubadas a 37°C durante 5 min para que la transferrina sea internalizada y posteriormente lavadas con DMEM-BSA 1% p/v. Finalmente los macrófagos incubados fueron durante 45 min a 37°C y fijados para ser observados por microscopía confocal (Leica TCS SP5, Germany). El porcentaje de bacterias que colocalizan con transferrina fue calculado mediante la observación de al menos 50 fagosomas en cada experimento.

3.2.11 Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación de los valores obtenidos (medias) se utilizó el test de Menor Diferencia Significativa (LSD) con un grado de significación del 95% ($P < 0.05$). Los resultados se muestran como el valor medio y la desviación estándar (DE).

3.3 Resultados

3.3.1 En ausencia de anticuerpos específicos *B. parapertussis* sobrevive a la interacción con macrófagos a través de un mecanismo que involucra al antígeno O

En primer lugar se realizó un ensayo para caracterizar la interacción inicial de *B. parapertussis* con macrófagos humanos evaluando la influencia de anticuerpos opsonizantes en esta interacción. Para ello macrófagos adheridos y diferenciados fueron incubados durante 40 minutos con una suspensión de *B. parapertussis* (MDI: 30) opsonizada con anticuerpos específicos o sin opsonizar. Luego de varios lavados para eliminar las bacterias no adheridas se determinó el número de bacterias asociadas por macrófago. Para ello se empleó la marcación con anticuerpos fluorescentes y microscopía de fluorescencia. En la Figura 1A se observa que la opsonización con anticuerpos específicos aumenta significativamente el número de bacterias capturadas por los macrófagos. Para determinar la proporción de bacterias que fueron fagocitadas en cada condición se determinó el número de bacterias intracelulares y extracelulares mediante doble marcación empleando anticuerpos específicos contra *B. parapertussis* y anticuerpos conjugados con dos fluoróforos diferentes. En la Figura 1B se observa que en ausencia de anticuerpos opsonizantes el 54% de las bacterias asociadas fueron fagocitadas mientras que en presencia de anticuerpos opsonizantes este porcentaje se incrementó hasta un 80%. Estos resultados indican que la opsonización aumenta la adhesión y los niveles de fagocitosis de *B. parapertussis* por los macrófagos.

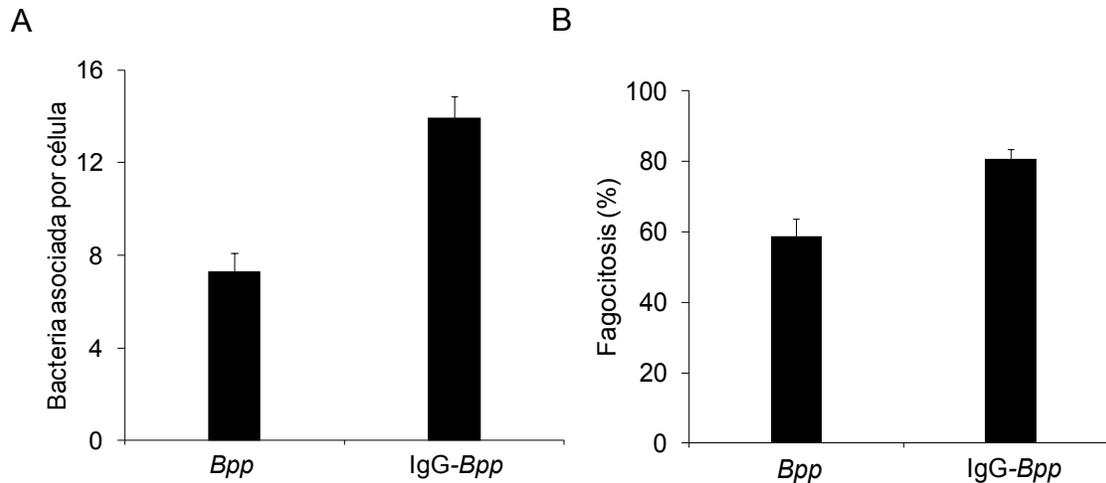


Figura 1. Adhesión y fagocitosis de *B. parapertussis* por macrófagos humanos. (A) Adhesión de *B. parapertussis* a macrófagos humanos. *B. parapertussis* no opsonizada (*Bpp*) u opsonizada con IgG (*IgG-Bpp*) fueron incubadas con macrófagos humanos (MDI: 30) durante 40 min a 37°C, posteriormente las células fueron lavadas y fijadas. El número de bacterias por macrófago fue determinado por inmunofluorescencia indirecta y microscopía de fluorescencia. En la figura se muestran los valores medios \pm DE de al menos tres experimentos independientes expresados como número de bacterias asociadas por macrófago. El número de bacterias no opsonizadas asociadas al macrófago difiere significativamente del número de bacterias opsonizadas con IgG ($P < 0.05$). Al menos 100 macrófagos fueron analizados por cada condición. (B) Fagocitosis de *B. parapertussis* por macrófagos humanos. *B. parapertussis* no opsonizada u opsonizada con IgG fueron incubadas con macrófagos humanos (MDI: 30) durante 40 minutos a 37°C. Luego las células fueron lavadas y fijadas, y el número de bacterias intracelulares y extracelulares fueron determinadas por doble marcación indirecta y microscopía de fluorescencia. Los resultados se muestran como el porcentaje de bacterias internalizadas a los 40 minutos después de la infección, respecto al número de bacterias totales asociadas por macrófago a este mismo tiempo. Al menos 100 macrófagos fueron analizados por cada condición. El número de bacterias intracelulares no opsonizadas difiere significativamente del número de bacterias intracelulares de *B. parapertussis* opsonizada con IgG ($P < 0.05$).

Como la fagocitosis no determina necesariamente la muerte bacteriana estudiamos la capacidad de *B. parapertussis* de sobrevivir luego de ser fagocitada. Para ello macrófagos adheridos y diferenciados fueron incubados con una suspensión de *B. parapertussis* opsonizada con anticuerpos específicos o sin opsonizar. Luego de 40 minutos de incubación los macrófagos fueron lavados extensivamente para eliminar las bacterias no adheridas. A este tiempo post-infección se tomó una muestra para determinar el número de bacterias fagocitadas mediante microscopía de fluorescencia. El resto de las células se

incubaron con polimixina B (100 mg/ml) para inactivar las bacterias extracelulares adheridas al macrófago y las bacterias en suspensión que no habían sido eliminadas por los lavados. A diferentes tiempos post-infección se determinó el número de bacterias intracelulares viables por macrófago mediante recuento de UFC y recuento de células en cámara de Neubauer. El porcentaje de sobrevida se calculó como el número de bacterias que permanecieron viables dentro del macrófago a las 2 y 48 horas posterior a la infección respecto al número de bacterias fagocitadas a los 40 minutos. En la Figura 2 se observa que 48 horas después de la infección, en ausencia de anticuerpos opsonizantes un porcentaje significativo de bacterias permanecen vivas dentro del macrófago. La presencia de anticuerpos específicos disminuyó de manera significativa los niveles de sobrevida de *B. parapertussis* 2 horas post-infección llegando a niveles indetectables a las 48 horas. Estos resultados sugieren que el destino intracelular de la bacteria podría depender de la interacción inicial de la bacteria con receptores de la superficie celular del macrófago.

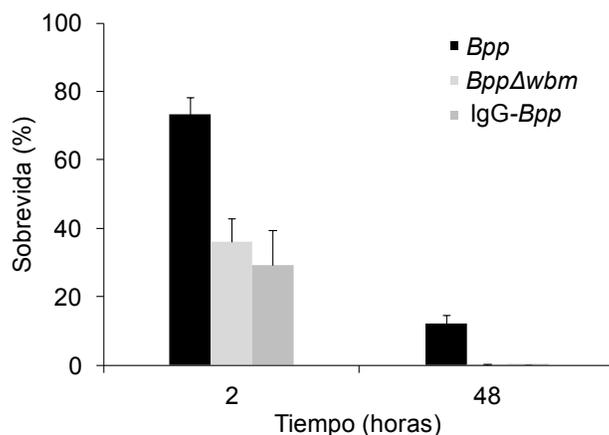


Figura 2. Sobrevida intracelular de *B. parapertussis* en macrófagos humanos. *B. parapertussis* no opsonizada (*Bpp*), *B. parapertussis* opsonizada con IgG (*IgG-Bpp*) o un mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*BppΔwbm*) fueron incubados con macrófagos humanos (MDI: 30) durante 40 min a 37°C, lavados para eliminar las bacterias no adheridas, y tratados con polimixina B para inactivar bacterias extracelulares. El número de UFC fue determinado a diferentes tiempos. Los resultados se expresaron como el porcentaje de bacterias vivas (UFC) por macrófago a un tiempo determinado, respecto al número de bacterias internalizadas a los 40 minutos después de la infección. Los datos representan la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes. El número de bacterias *B. parapertussis* no opsonizadas viables a las 2 horas difiere significativamente del número de bacterias deficientes en la expresión del antígeno O y del número de bacterias opsonizadas viables a las 2 hs post-infección ($P < 0.05$). 48 horas después de la

infección se observa que solo la cepa salvaje permanece viable en localización intracelular en ausencia de anticuerpos opsonizantes.

El antígeno O de otros patógenos está implicado en la evasión de vía degradativa en macrófagos (27-29). Según se observó en el capítulo anterior, el antígeno O de *B. parapertussis* está involucrado en la evasión de los mecanismos bactericidas en neutrófilos. En este estudio se evaluó el rol del antígeno O de *B. parapertussis* en la sobrevivencia intracelular de la bacteria en macrófagos humanos utilizando un mutante deficiente en la expresión del antígeno O. En la Figura 2 se observa que la falta de expresión del antígeno O determina una rápida disminución en los niveles de sobrevivencia de *B. parapertussis*. Dos días post-infección no se observaron bacterias viables en localización intracelular, sugiriendo que el antígeno O juega un rol determinante en la evasión de los mecanismos bactericidas del macrófago por *B. parapertussis*.

En el caso de otros patógenos se demostró que las bacterias que permanecen viables dentro de macrófagos, no infectan toda la población sino que se encuentran en un pequeño número de macrófagos en los que suelen replicar en localización intracelular. Estos estudios mostraron la existencia de distintas poblaciones de macrófagos con diferentes grados de permisividad para la sobrevivencia intracelular de las bacterias, un tipo que permite la sobrevivencia y multiplicación bacteriana en localización intracelular y otro tipo que elimina rápidamente a microorganismos patógenos (30, 31). En este estudio se evaluó la distribución de *B. parapertussis* en la población de macrófagos y se determinó la proporción de macrófagos infectados y el número de bacterias intracelulares que estos contienen (carga bacteriana) a tiempos largos post-infección. Para ello 48 horas después de la infección el número de bacterias intracelulares y extracelulares por macrófago se determinó por doble marcación y microscopía de fluorescencia. En la Figura 3 se observa que 48 horas después de la infección aproximadamente un 14.2% de los macrófagos contiene bacterias *B. parapertussis* cepa salvaje en localización intracelular y que una gran proporción de estos macrófagos (80%) contiene más de 10 bacterias intracelulares por célula. Por el contrario, la falta de expresión del antígeno O determina una eficiente eliminación de la bacteria, de tal manera que 48 horas después de la infección el 99.2% de

los macrófagos han eliminado a la cepa deficiente en la expresión del antígeno O de *B. parapertussis* (Fig. 3).

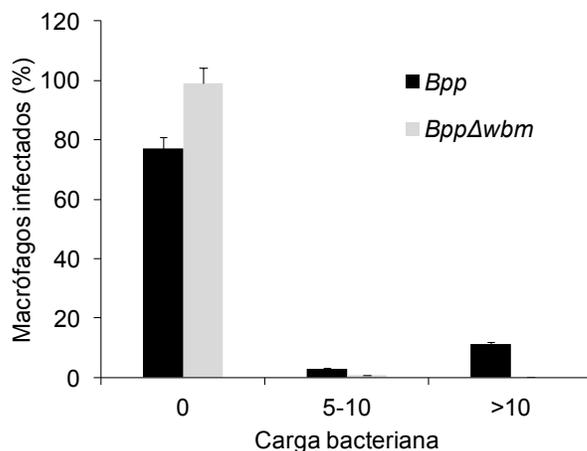


Figura 3. Frecuencia de infección y carga bacteriana en macrófagos humanos infectados con *B. parapertussis*. Macrófagos incubados con *B. parapertussis* (*Bpp*) o con un mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*BppΔwbm*) (MDI: 30) durante 40 min a 37°C, fueron lavados e incubados con polimixina B para inactivar bacterias extracelulares. Cuarenta y ocho horas después de la infección los macrófagos fueron fijados y el número de bacterias intra y extracelulares se determinó por doble marcación y microscopía de fluorescencia. Los resultados representan la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. Al menos 100 macrófagos fueron analizados en cada tiempo determinado. El número de macrófagos conteniendo más de 10 bacterias *B. parapertussis* cepa salvaje a las 48 horas después de la infección difiere significativamente del número de macrófagos conteniendo la cepa deficiente en la expresión del antígeno O a este tiempo ($P < 0.05$).

Para evaluar la localización de las bacterias que se mantienen viables en localización intracelular se realizó una marcación de bacterias vivas mediante FISH utilizando sondas específicas que reconocen solo aquellas bacterias que se encuentran viables. Como control se realizó la marcación de la totalidad de las bacterias intracelulares (vivas y muertas) mediante inmunofluorescencia indirecta. El número de bacterias vivas y totales se determinó por microscopía de fluorescencia. En la Figura 4 se puede ver que 48 horas después de la infección con la cepa salvaje de *B. parapertussis* algunos macrófagos contienen un gran número de bacterias viables en localización intracelular. Aproximadamente el 78% de las bacterias intracelulares se encuentran viables a este tiempo demostrando que una proporción significativa de macrófagos contiene bacterias vivas en

localización intracelular durante tiempos prolongados después de la infección. De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente no se encontraron bacterias viables en macrófagos infectados con la cepa deficiente en antígeno O (Fig. 4) confirmando el rol determinante de este antígeno en la sobrevivencia de *B. parapertussis* en macrófagos humanos.

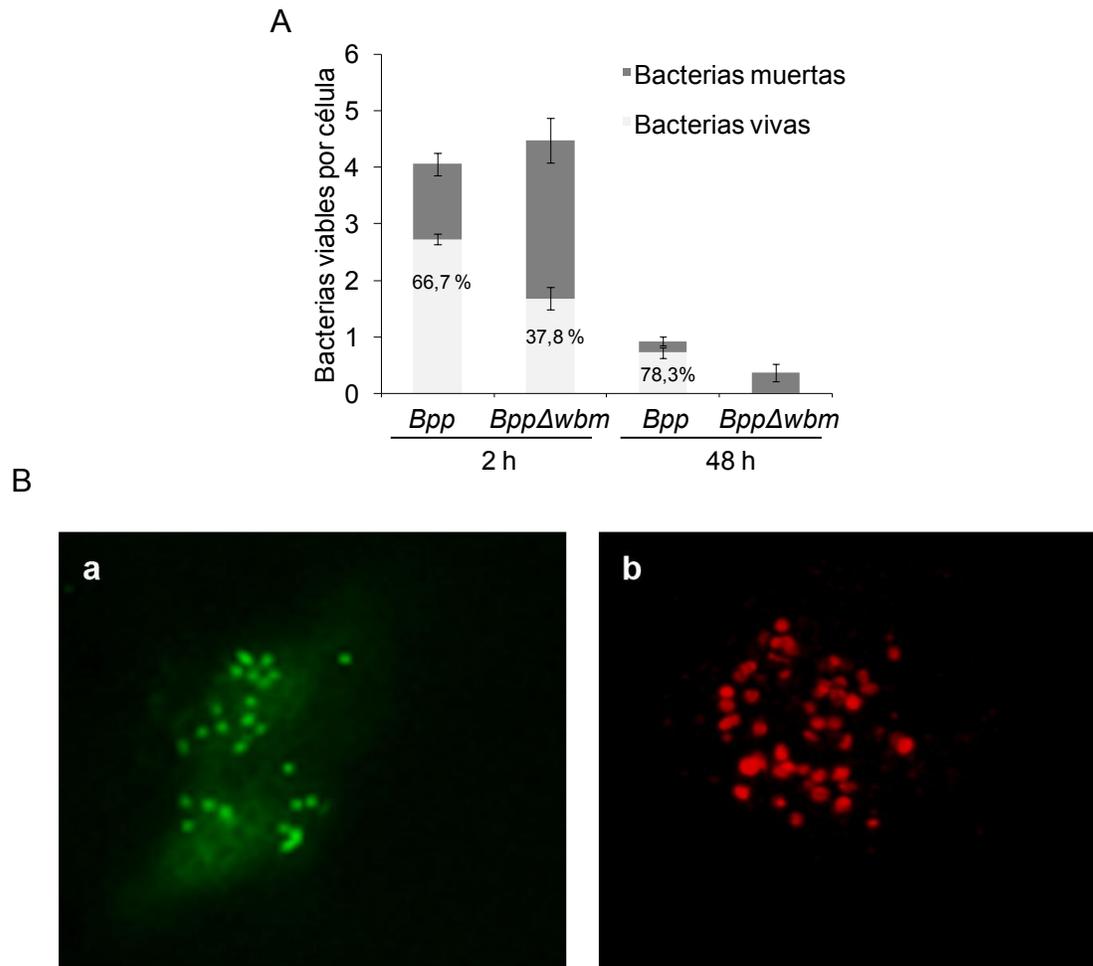


Figura 4. Evaluación de la viabilidad de *B. parapertussis* en localización intracelular mediante FISH. *B. parapertussis* (*Bpp*) o un mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*BppΔwbm*) fueron incubados con macrófagos humanos (MDI: 30) durante 40 min a 37°C, lavados para eliminar las bacterias no adheridas y tratados con polimixina B para inactivar bacterias extracelulares. A las 2 y 48 horas se tomaron muestras, las células fueron fijadas y se determinó el número de bacterias vivas (FISH; verde) o totales (inmunofluorescencia rojo) por macrófago mediante microscopía de fluorescencia. Al menos 100 células fueron analizadas por condición. (A) En la figura se muestran los porcentajes de bacterias viables respecto a las bacterias totales a un tiempo determinado y el número de bacterias vivas y muertas para cada tiempo. Los datos representan la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes. El número de bacterias viables de *B. parapertussis* cepa salvaje a las 2 y 48 post-después de la infección difiere

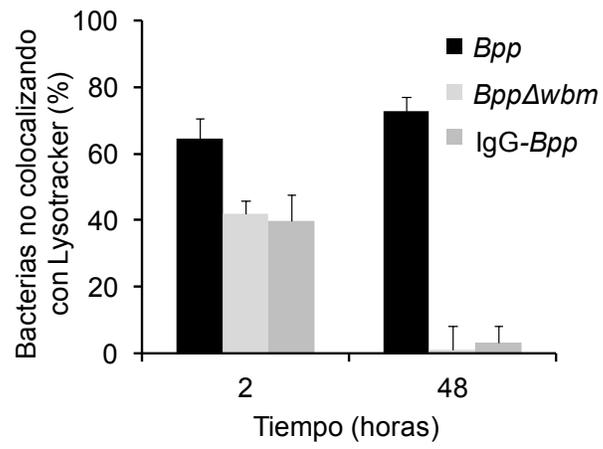
significativamente del número de bacterias viables deficientes en la expresión del antígeno O a cada uno de los tiempos ($P < 0.05$). (B) Imagen representativa de macrófagos 48 horas post-infección, conteniendo *B. parapertussis* cepa salvaje, panel a, viable en localización intracelular: panel b, bacterias totales. Imagen representativa de uno de tres experimentos.

3.3.2 *B. parapertussis* evade la vía fagolisosomal y permanece viable en compartimientos que no se acidifican

Los resultados anteriores sugieren que el antígeno O juega un rol importante en la sobrevivencia intracelular de *B. parapertussis* en macrófagos humanos. Es posible que esto se deba, como se ha observado en otros patógenos (27-29) y en éste mismo en su interacción con neutrófilos, a que el antígeno O dirija el tráfico intracelular de la bacteria por rutas no bactericidas. Con el fin de evaluar esta posibilidad se realizaron estudios de colocalización a diferentes tiempos post-infección con el marcador lisosomal, Lysotracker, que se concentra en compartimientos ácidos, la cepa salvaje de *B. parapertussis* y un mutante deficiente en la expresión del antígeno O. Como puede observarse en la Figura 5, en ausencia de anticuerpos opsonizantes aproximadamente el 65% de la cepa salvaje de *B. parapertussis* se encuentra en compartimientos que no muestran signos de acidificación 2 horas después de la infección. Por el contrario, en el caso de la cepa deficiente en la expresión del antígeno O, un porcentaje significativamente mayor de bacterias se encuentran en compartimientos ácidos a este tiempo post-infección. Dos días después de la infección la diferencia en el tránsito intracelular de estas dos cepas queda en evidencia por el porcentaje de colocalización con Lysotracker. Mientras que la cepa deficiente en la expresión del antígeno O mostró una disminución drástica del número de bacterias intracelulares y un 100% de colocalización con el marcador de compartimientos ácidos, aproximadamente un 73% de las bacterias cepa salvaje se encontró en compartimientos que no muestran signos de acidificación (Fig. 5). Estos resultados sugieren que en ausencia de anticuerpos opsonizantes *B. parapertussis* inhibe la fusión fagolisosomal en un mecanismo que depende del antígeno O. Esta ruta intracelular no bactericida puede ser modificada si la bacteria es opsonizada con anticuerpos específicos y la interacción con el macrófago ocurre a través de los receptores Fc γ . La Figura 5 muestra que en presencia de anticuerpos opsonizantes *B. parapertussis* es transportada principalmente a compartimientos ácidos y 48 horas después de la infección el número de bacterias intracelulares visibles ha

disminuido y la totalidad de las bacterias se encuentran en compartimientos que han sido acidificados. Estos resultados indican que los mecanismos mediados por el antígeno O que llevan a la evasión de la fusión del fagosoma con lisosomas son suprimidos por la presencia de anticuerpos opsonizantes.

A



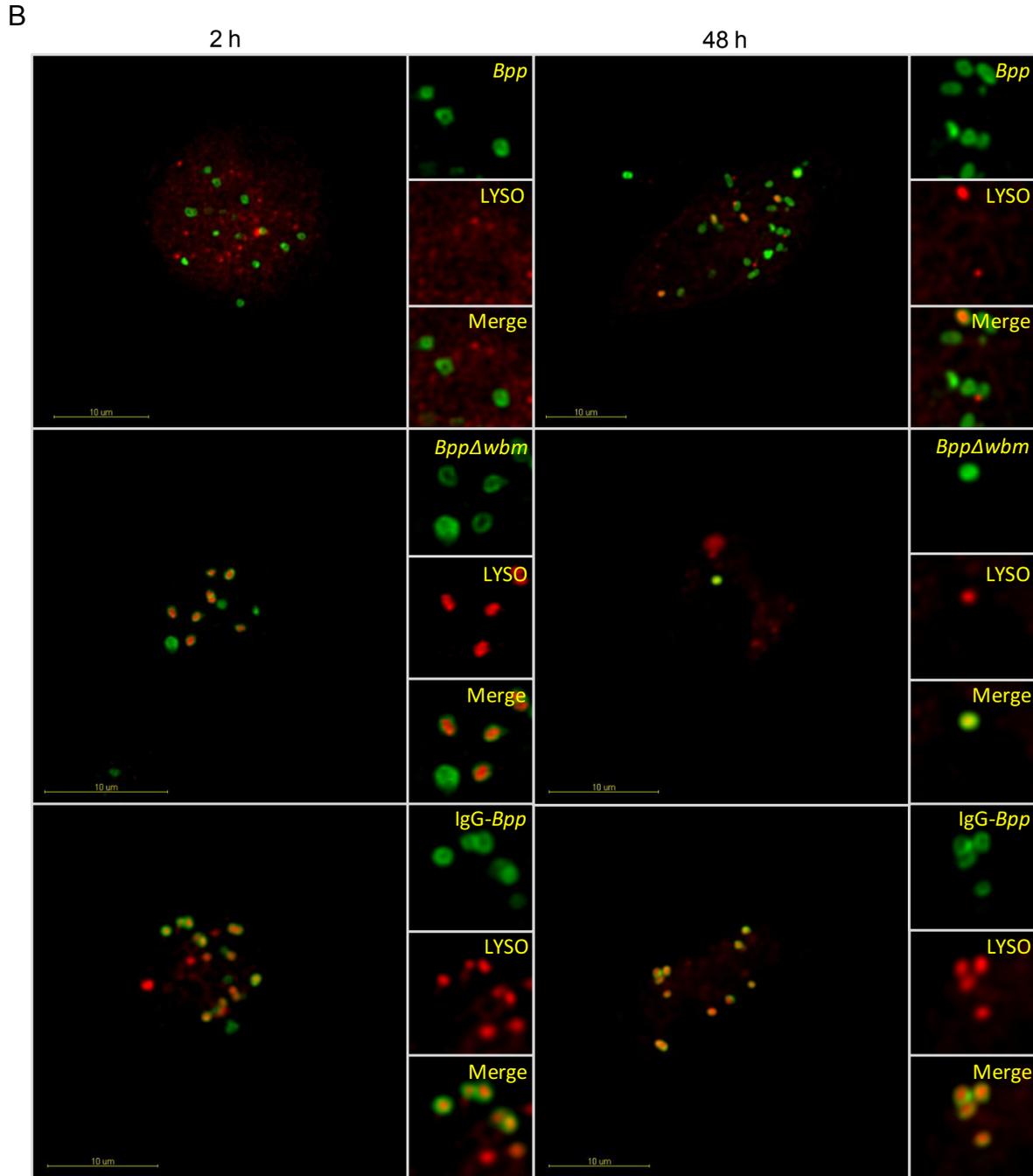


Figura 5. Colocalización de *B. parapertussis* con Lysotracker. *B. parapertussis* no opsonizada (*Bpp*), *B. parapertussis* opsonizada con IgG (IgG-*Bpp*), o un mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*BppΔwbm*) fueron incubados con macrófagos humanos (MDI: 30) durante 40 min a 37°C, lavados extensivamente y tratados con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares. A las 2 y 48 horas posterior a la infección los macrófagos fueron incubados con Lysotracker (LYSO) durante 5 min y fijados. Luego de la tinción indirecta de las bacterias intracelulares las muestras fueron analizadas por microscopía confocal. Al menos 50 fagosomas fueron analizados por cada condición. (A) Porcentaje de bacterias que no colocalizan con el marcador Lysotracker. Los datos

representan la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes. El número de bacterias *B. parapertussis* cepa salvaje que no colocalizan con Lysotracker a las 2 y 48 horas post-infección difiere significativamente del número de bacterias deficientes en la expresión del antígeno O y opsonizadas, que no colocalizan con este marcador a cada uno de estos tiempos ($P < 0.05$). (B) Imágenes representativas de macrófagos a las 2 y 48 horas post-infección obtenidas por microscopia confocal.

Estos resultados conjuntamente con lo observado en la Figura 4 sugieren que la viabilidad de *B. parapertussis* en localización intracelular depende en gran medida de evadir el tráfico a lisosomas. Entre los mecanismos bactericidas de los lisosomas se encuentran diversas enzimas lisosomales, péptidos con actividad bacteriostática/bactericida y la acidificación de estos compartimientos que funciona como disparador principal de los mecanismos bactericidas del lisosoma y promueve la fusión fagolisosomal. Para evaluar la importancia de la acidificación e indirectamente la fusión fagolisosomal en la actividad bactericida de los macrófagos contra *B. parapertussis* se utilizó el inhibidor específico de ATPasas vacuolares bafilomicina A1 (BAF) que bloquea el bombeo de protones hacia el interior de los compartimientos que tienen ATPasa en su membrana y evita la acidificación en su interior. Los macrófagos fueron incubados con BAF previo a la infección. La droga se mantuvo durante todo el tiempo que duró el experimento para evitar posibles fluctuaciones de pH en los compartimientos lisosomales. El número de bacterias intracelulares viables fue determinado a las 2 y 48 horas posteriores a la infección por FISH y microscopía de fluorescencia según ha sido detallado anteriormente. En experimentos control se observó que la bafilomicina A1 no afecta la viabilidad de *B. parapertussis* ni la de los macrófagos (datos no mostrados). La inhibición de la acidificación vacuolar inducida por BAF se controló por observaciones microscópicas donde se pudo comprobar que no hubo acumulación del marcador acidotrófico Lysotracker en compartimientos intracelulares en macrófagos tratados con esta droga (Fig. 6). Como se muestra en la Figura 6A el número de bacterias viables en macrófagos tratados con BAF aumentó tanto a tiempos cortos como a tiempos largos post-infección. Mientras que a las 2 horas se produjo un aumento de 3.1 veces en el número de bacterias intracelulares viables, a las 48 horas se observó un aumento de 6.8 veces con respecto a los macrófagos sin tratar. Estos resultados indican que la acidificación del fagosoma es un mecanismo bactericida importante contra *B. parapertussis*

y confirman la importancia de la inhibición de la fusión del fagosoma con compartimientos ácidos en la sobrevivencia de esta bacteria en localización intracelular.

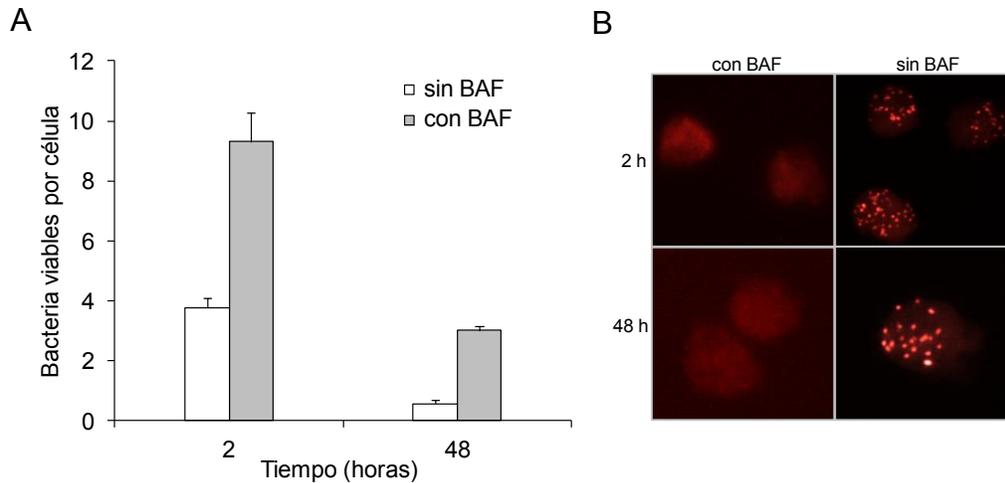


Figura 6. Efecto de la inhibición de la acidez vacuolar en la sobrevivencia intracelular de *B. parapertussis*. (A) Macrófagos tratados o sin tratar con bafilomicina A1 (BAF) (100 nM) durante 30 minutos, fueron infectados con *B. parapertussis* cepa salvaje (MDI: 30) durante 40 min a 37°C. Luego de tres lavados, los macrófagos fueron incubados con medio suplementado con polimixina B para inactivar bacterias extracelulares. La BAF se mantuvo en el sistema durante todo el ensayo. A las 2 o 48 horas posterior a la infección, los macrófagos fueron fijados y el número de bacterias viables por macrófago fue determinado por FISH para la marcación de bacterias viables seguido del análisis por microscopía confocal. En la figura se muestran los valores medios \pm DE de al menos tres experimentos independientes expresados como número de bacterias viables por macrófago. Al menos 100 células fueron analizadas por condición. El número de bacterias viables a las 2 y 48 horas post-infección en macrófagos tratados con BAF aumentó significativamente respecto al número de bacterias viables a las 2 y 48 horas en macrófagos sin tratar ($P < 0.05$). (B) Microscopía de fluorescencia de macrófagos sin tratar o tratados con BAF e incubados con LysoTracker. En la figura se muestran imágenes representativas.

Para confirmar que las bacterias que evaden la fusión del fagosoma con lisosomas son aquellas que permanecen viables en localización intracelular, se evaluó la localización intracelular de las bacterias vivas utilizando FISH para la marcación de bacterias viables y el marcador de compartimientos ácidos LysoTracker. En la Figura 7 se puede observar que 48 horas post-infección las bacterias intracelulares viables no se encuentran en compartimientos ácidos.

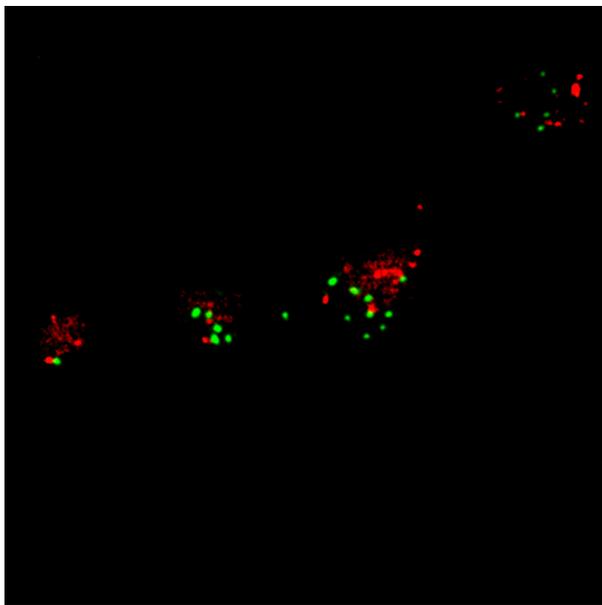


Figura 7. Localización intracelular de bacterias *B. parapertussis* viables. *B. parapertussis* no opsonizada fue incubada con macrófagos humanos (MDI: 30) durante 40 min a 37°C. Luego de varios lavados los macrófagos fueron tratados con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares. A las 48 horas los macrófagos fueron incubados con Lysotracker (rojo), y las bacterias viables (verde) fueron marcadas por FISH con sondas específicas. Al menos 50 fagosomas por muestra fueron analizados mediante microscopía confocal. Las bacterias viables no colocalizan con el marcador acidotrófico Lysotracker, según se observa por la falta de superposición de los marcadores fluorescentes. Se muestra una imagen representativa de uno de tres experimentos independientes.

3.3.3 El antígeno O de *B. parapertussis* dirige la entrada a la célula por balsas lipídicas y las retiene en su fagosoma

En estudios anteriores observamos que la interacción de *B. parapertussis* con balsas lipídicas de la membrana plasmática de los neutrófilos favorece el tránsito intracelular no degradativo y la sobrevivencia de la bacteria en localización intracelular. Asimismo observamos que el antígeno O está involucrado en esta interacción. En este contexto, y en vista de los resultados obtenidos, estudiamos si algo similar ocurre en la interacción con macrófagos. Para ello, previo a la infección los macrófagos fueron tratados con metil- β -ciclodextrina, un compuesto que extrae colesterol de la membrana plasmática desorganizando las balsas lipídicas, y lovastatina, un inhibidor de la síntesis *de novo* de colesterol. La lovastatina se mantuvo durante todo el ensayo para evitar la reposición de colesterol por síntesis *de novo*. Luego de 40 minutos de infección las células fueron lavadas

para eliminar bacterias no adheridas y el número de bacterias intracelulares y extracelulares fue determinado por doble marcación y microscopia confocal. Dado que la extracción de colesterol de la membrana plasmática altera su fluidez pudiendo modificar la permeabilidad de la misma, se realizó un experimento control para descartar posibles perturbaciones en la función fagocítica de los macrófagos tratados con metil- β -ciclodextrina. Para ello se determinaron los niveles de fagocitosis de *B. parapertussis* opsonizada con anticuerpos específicos en macrófagos tratados y sin tratar. En la Figura 8 se observa que el tratamiento con metil- β -ciclodextrina no afecta la fagocitosis de *B. parapertussis* mediada por FcR, confirmando que los dominios ricos en colesterol no están involucrados en la fagocitosis de *B. parapertussis* cuando esta es opsonizada y que la fagocitosis a través de sitios diferentes de las balsas lipídicas no fue alterado por el tratamiento con esta droga. Sin embargo en ausencia de anticuerpos la desorganización de los dominios ricos en colesterol determinó una disminución significativa en los niveles de fagocitosis de la cepa salvaje de *B. parapertussis* pero no de la cepa defectiva en la expresión del antígeno O. Este resultado sugiere que el antígeno O está implicado en la interacción de la bacteria con receptores específicos de membrana ubicados en los dominios ricos en colesterol que median la fagocitosis de la cepa salvaje de *B. parapertussis*. Resultados similares se obtuvieron con nistatina (Fig. 8), que a diferencia de la metil- β -ciclodextrina se une al colesterol de la membrana plasmática sin extraerlo y por lo tanto no altera la integridad de la membrana. Este resultado confirma que las balsas lipídicas son los sitios de interacción de la cepa salvaje. Cabe destacar que ninguna de estas drogas tiene efectos citotóxicos sobre los macrófagos según se pudo observar por marcación con yoduro de propidio y citometría de flujo.

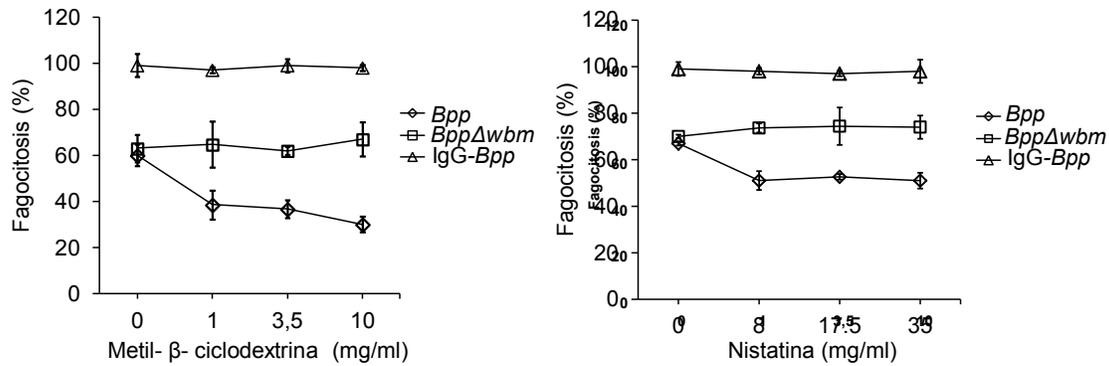


Figura 8. Efecto de drogas desorganizadoras de dominios lipídicos en la fagocitosis de *B. parapertussis* por macrófagos humanos. Macrófagos sin tratar, o tratados con metil-β-ciclodextrina o nistatina, fueron infectados con *B. parapertussis* no opsonizada (*Bpp*), *B. parapertussis* opsonizada con IgG (*IgG-Bpp*), o *B. parapertussis* mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*BppΔwbm*) (MDI: 30) durante 40 min a 37°C. Luego de varios lavados, los macrófagos fueron fijados y el número de bacterias intracelulares y extracelulares se determinó por doble marcación y microscopía de fluorescencia. Al menos 100 células fueron analizadas por cada condición. Los resultados se muestran como el porcentaje de bacterias internalizadas a los 40 minutos post-infección, respecto al número de bacterias asociadas por macrófago a este mismo tiempo. El número de bacterias *B. parapertussis* cepa salvaje no opsonizadas fagocitadas en macrófagos tratados con metil-β-ciclodextrina o nistatina difiere significativamente del número de bacterias intracelulares en macrófagos no tratados ($P < 0.05$). La depleción de colesterol o su bloqueo no afectan significativamente los niveles de fagocitosis de la cepa mutante o de la cepa opsonizada con IgG ($P < 0.05$).

Para confirmar la interacción de *B. parapertussis* con las balsas lipídicas y el rol del antígeno O en esta interacción se llevó a cabo un estudio que permitió determinar la distribución de balsas lipídicas en los macrófagos durante la fagocitosis de una cepa salvaje de *B. parapertussis* o una cepa mutante deficiente en la expresión del antígeno O. Para ello se utilizaron anticuerpos anti-flotilina humana como marcador de balsas lipídicas, marca fluorescente sobre las bacterias y microscopía confocal. Se evaluó la colocalización de la bacteria y la flotilina a distintos tiempos post-infección. Como se observa en la Figura 9A, dos horas después de la infección aproximadamente un 70% de las bacterias cepa salvaje se encuentran colocalizando con zonas ricas en flotilina. Cuarenta y ocho horas después este porcentaje no muestra cambios significativos indicando que *B. parapertussis* recluta balsas lipídicas durante la fagocitosis y las retiene en el fagosoma durante el tránsito intracelular. Mientras que la infección de macrófagos con la cepa salvaje de *B. parapertussis* indujo la

relocalización de balsas lipídicas rodeando las bacterias internalizadas (Fig. 9B), en los macrófagos infectados con la cepa mutante defectiva en la expresión del antígeno O los depósitos celulares de flotilina permanecieron distribuidos de una forma aleatoria entre la superficie celular y los depósitos intracelulares, en una disposición similar a la encontrada en macrófagos no infectados (Fig. 9B). Estos resultados confirman que el antígeno O media la interacción de *B. parapertussis* con balsas lipídicas, y que *B. parapertussis* ingresa al macrófago a través de estos dominios en ausencia de anticuerpos y los retiene en su fagosoma, lo cual podría ser importante en el destino intracelular de la bacteria. Estos resultados también demuestran que el antígeno O tiene un rol clave en el reclutamiento de balsas lipídicas en el fagosoma.

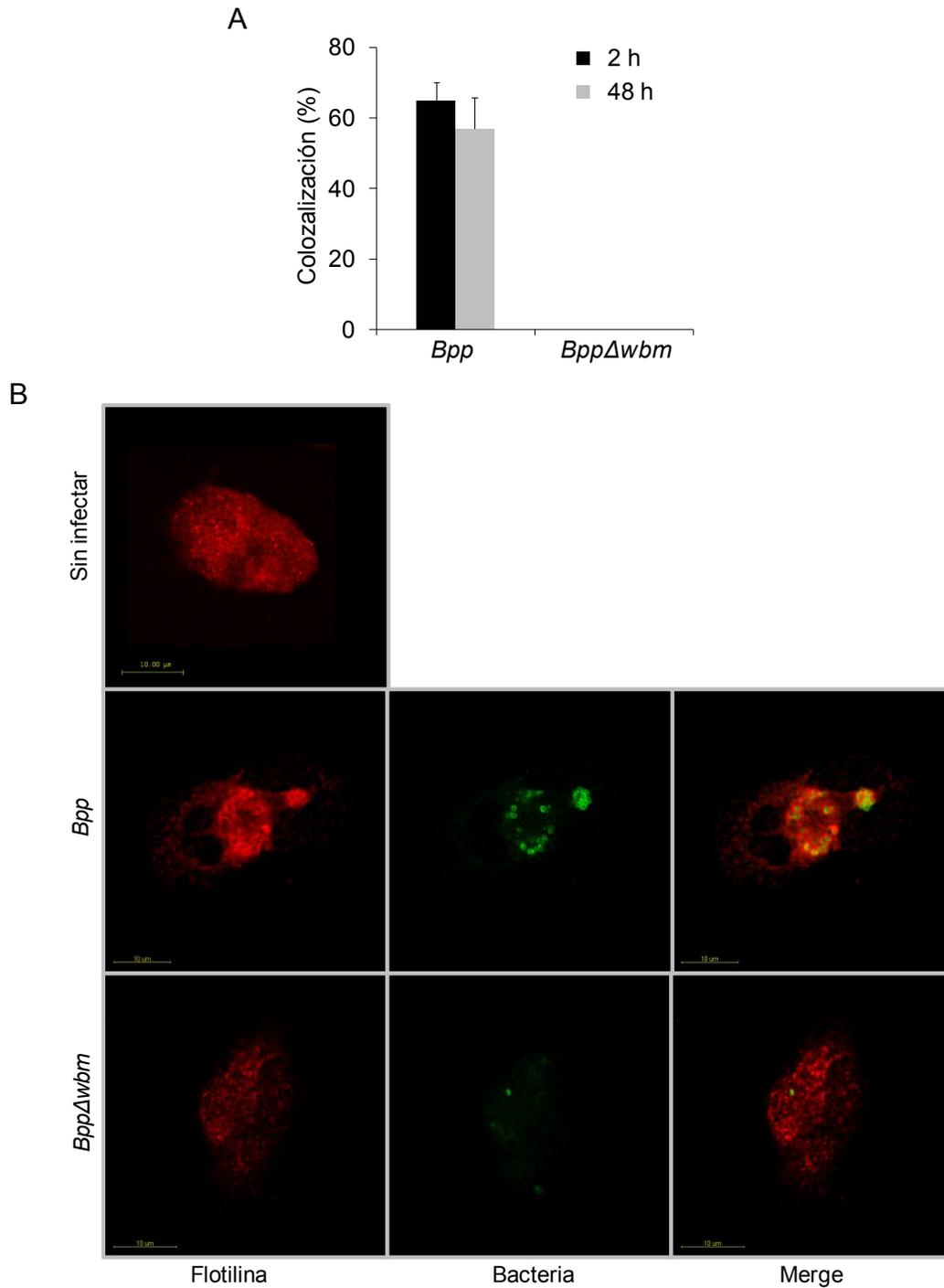


Figura 9. Colocalización de *B. parapertussis* con componentes de las balsas lipídicas. Macrófagos incubados con *B. parapertussis* no opsonizada (*Bpp*) o con un mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*BppΔwbm*) (MDI: 30) durante 40 min a 37°C fueron lavados e incubados con polimixina B para inactivar bacterias extracelulares. A las 2 o 48 horas post-infección los macrófagos fueron fijados y permeabilizados previo a la tinción con anticuerpos específicos contra flotilina (rojo) y contra *B. parapertussis* (verde).

Al menos 50 fagosomas fueron analizados por muestra mediante microscopia confocal. (A) En la figura se muestran los valores medios \pm DE de al menos tres experimentos independientes expresados como porcentaje de colocalización de la bacteria con el marcador de balsas lipídicas flotilina. El número de bacterias de *B. parapertussis* cepa salvaje difiere significativamente del número de bacterias de la cepa mutante deficiente en la expresión del antígeno O colocalizando con flotilina tanto a las 2 como a las 48 horas post-infección ($P < 0.05$). El porcentaje de colocalización de *B. parapertussis* cepa salvaje no muestra diferencias significativas entre los tiempos ensayados ($P < 0.05$). (B) En la figura se muestran imágenes representativas de microscopía confocal de macrófagos infectados 48 horas post-infección. La colocalización se evidencia por la acumulación del marcador para flotilina (rojo) alrededor de la bacteria (verde). En la figura se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes.

3.3.4 *B. parapertussis* permanece en compartimientos con acceso a nutrientes extracelulares

Estos resultados sugieren que los macrófagos podrían constituir un nicho de persistencia de *B. parapertussis*. Para que esto sea posible *B. parapertussis* debe tener acceso a nutrientes esenciales dentro del fagosoma. Este es un requisito para la supervivencia intracelular por largos períodos de tiempo. Para evaluar si efectivamente ésta bacteria tiene acceso a nutrientes transportados desde el exterior de la célula, 48 horas después de la infección con *B. parapertussis* los macrófagos fueron tratados con un pulso de transferrina conjugada a Alexa 594. El complejo hierro-transferrina es internalizado por los macrófagos por endocitosis a través de la unión a receptores de transferrina localizados en la membrana plasmática. Luego de ser endocitado, el complejo hierro-transferrina-receptor se fusiona con los endosomas tempranos. El cambio de pH ligeramente alcalino al pH levemente ácido del endosoma provoca un cambio en la estabilidad del complejo que ocasiona la disociación espontánea de los átomos de hierro y su liberación dentro del endosoma. La transferrina sin hierro es reciclada junto con su receptor nuevamente a la membrana plasmática evitando el contacto con compartimientos lisosomales. Los estudios de colocalización con transferrina, por lo tanto, permiten determinar si la bacteria tiene acceso a nutrientes a través de endosomas de reciclaje y aportan evidencia respecto a la naturaleza del fagosoma en los cuales habita. La Figura 10 muestra que la cepa deficiente en la expresión del antígeno O no colocaliza con la transferrina marcada. A este tiempo post-infección la cepa mutante de *B. parapertussis* ha sido eliminada casi por completo y un

número muy pequeño de estas bacterias se puede encontrar dentro de algún macrófago, pero ninguna de ellas se encontró colocalizando con transferrina. Por otro lado, en la Figura 10 se puede observar que 48 horas después de la infección la cepa salvaje de *B. parapertussis* colocaliza con transferrina exógena, sugiriendo que la bacteria permanece en fagosomas con características de endosomas tempranos y tiene acceso a nutrientes esenciales en localización intracelular.

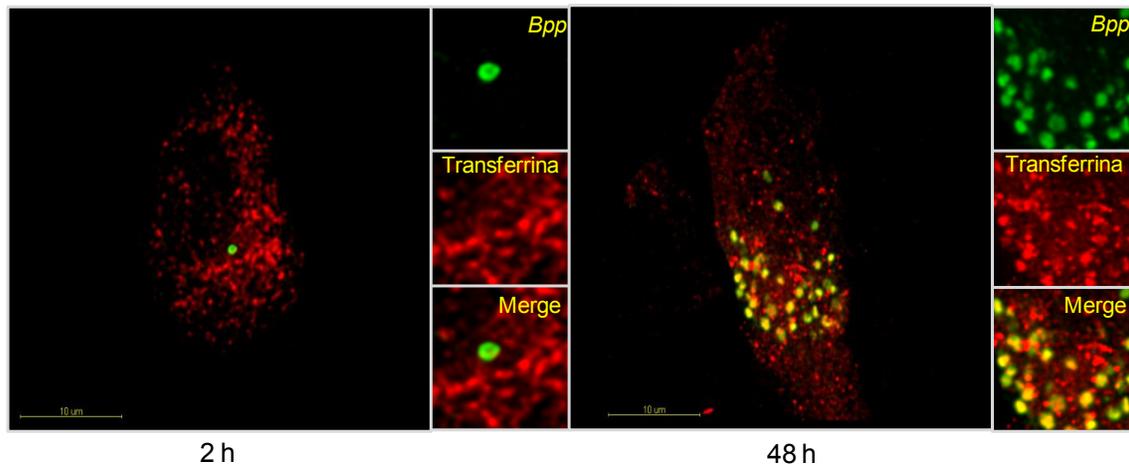


Figura 10. Colocalización de *B. parapertussis* con transferrina. Macrófagos infectados con *B. parapertussis* durante 40 min a 37°C fueron lavados e incubados con polimixina B. A las 2 y a las 48 hs post-infección los macrófagos fueron incubados con transferrina conjugada a Alexa-594. Luego de 45 minutos de incubación para permitir la internalización y tráfico de la transferrina, las células fueron fijadas y analizadas por microscopia confocal. En la figura se observan bacterias asociadas a transferrina a las 2 y 48 horas después de la infección. Se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes.

3.3.5 El establecimiento de infecciones intracelulares por *B. parapertussis* no tiene consecuencias en la viabilidad del macrófago

Dado que nuestros resultados sugieren que *B. parapertussis* podría establecer un nicho de persistencia en este tipo celular, decidimos evaluar si en la infección con esta bacteria los macrófagos permanecen viables. Para ello, luego de la infección de los macrófagos con las diferentes cepas bacterianas se determinó el porcentaje de macrófagos viables mediante la tinción con yoduro de propidio, un agente intercalante que penetra en

las células que presentan la membrana dañada y se une al ADN, y citometría de flujo. Como puede observarse en la Figura 11 la infección de macrófagos con *B. parapertussis* no determina una disminución significativa en la viabilidad del macrófago en los tiempos ensayados.

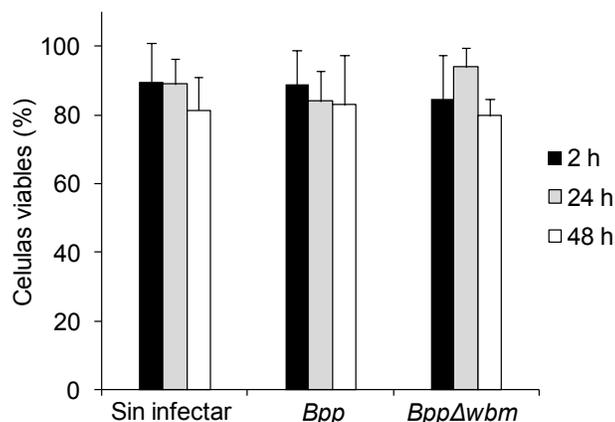


Figura 11. Determinación de la citotoxicidad de *B. parapertussis* sobre macrófagos humanos. Macrófagos humanos sin infectar o infectados con *B. parapertussis* (*Bpp*) o con una cepa mutante deficiente en la expresión del antígeno O (*BppΔwbm*) fueron incubados a 37°C durante 40 minutos, lavados e incubados con polimixina B. A las 2, 24 y 48 horas posteriores a la infección se determinó la viabilidad celular mediante incubación con yoduro de propidio y citometría de flujo. Los datos representan la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes. Aproximadamente un 90% de los macrófagos permanecieron viables, no encontrándose diferencias significativas en los porcentajes de viabilidad a los diferentes tiempos analizados, en las diferentes condiciones de ensayo ($P < 0.05$).

3.4 Discusión

Muchos patógenos de difícil erradicación entre los que se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* y *Streptococcus* Grupo A inicialmente considerados extracelulares presentan estadios intracelulares en su ciclo infeccioso que según ha sido demostrado cumplen un rol clave en el desarrollo de la enfermedad, la evasión del sistema inmune, y la persistencia del patógeno en el hospedador (32-35). Algunos de estos patógenos persisten dentro de células del hospedador y duplican en localización intracelular estableciendo nichos de persistencia intracelular, mientras que otros, como *C. jejuni*, aunque no duplican en localización intracelular, requieren de estadios intracelulares necesarios para el establecimiento de infecciones persistentes.

B. parapertussis y *B. pertussis* han sido consideradas bacterias extracelulares desde su descubrimiento. Estas bacterias son patógenos estrictamente humanos que han persistido a décadas de vacunación. Estudios recientes de nuestro grupo demostraron que *B. pertussis* es capaz de sobrevivir e incluso duplicar en localización intracelular y por lo tanto hoy es considerada una bacteria intracelular facultativa (18). Algunos resultados publicados hace unos años parecen sugerir que *B. parapertussis* tendría nichos de persistencia no identificados dentro del hospedador (36). Existe evidencia clínica que parece apoyar esta hipótesis (37-41)

A pesar de que las vacunas actuales contra la tos convulsa están formuladas con antígenos de *B. pertussis* comunes a ambas especies, varios estudios demuestran que estas no inducen protección cruzada contra *B. parapertussis* (42-46). El antígeno O ubicado en la porción distal de la molécula de lipopolisacárido de *B. parapertussis* interfiere con el reconocimiento de los anticuerpos inducidos por vacunación contra antígenos comunes a ambas cepas (22, 44). El antígeno O además de evitar la opsonización de *B. parapertussis* por anticuerpos vacunales (44) determina la interacción no bactericida con neutrófilos humanos (capítulo anterior) (47). *B. parapertussis* sobrevive a la interacción innata con neutrófilos al evitar diferentes mecanismos bactericidas de esta célula que eventualmente permiten la supervivencia bacteriana en localización intracelular (47). Los neutrófilos constituyen la primera línea de defensa frente a las infecciones bacterianas. Aquellas bacterias que escapan al control de los neutrófilos se enfrentan a otros tipos celulares que integran la inmunidad celular innata como lo son los macrófagos. Estas células, aunque

menos agresivas que los neutrófilos, presentan mecanismos bactericidas diferentes a los de los neutrófilos cumpliendo un rol primordial en la respuesta innata contra patógenos y participando en la modulación de la respuesta adaptativa. Sin embargo, muchos patógenos han desarrollado diversos mecanismos para evadir la actividad bactericida de los macrófagos y establecer infecciones intracelulares persistentes (48-50) lo cual les provee un nicho protegido que los aleja de los mecanismos bactericidas del sistema inmune del hospedador, les permite propagar la infección hacia otras áreas o células dentro del mismo hospedador o a otros individuos, o repoblar el medio extracelular cuando las condiciones del entorno sean favorables para su desarrollo. Además el establecimiento de infecciones intracelulares en macrófagos puede influir en la respuesta inmune del hospedador (11).

En este capítulo investigamos el resultado de la interacción de *B. parapertussis* con macrófagos humanos y su posible relación con el establecimiento de nichos de persistencia que permitan el desarrollo de infecciones asintomáticas. En particular estudiamos la sobrevivencia intracelular a diferentes tiempos post-infección, el tráfico intracelular de la bacteria, y la importancia de la presencia de anticuerpos opsonizantes en esta interacción. Nuestros resultados demuestran que en ausencia de anticuerpos opsonizantes *B. parapertussis* sobrevive al encuentro con macrófagos y persiste en localización intracelular por varios días después de la infección. Este resultado es de particular importancia dado que la mayoría de la población carece de anticuerpos contra este patógeno y por lo tanto solo aquellas personas que fueron previamente infectadas con esta bacteria se encuentran protegidas contra este tipo de infecciones.

A diferencia de lo que ocurre con los neutrófilos, observamos que los macrófagos eliminan una gran proporción de bacterias poco tiempo después de la fagocitosis, pero un número significativo de bacterias permanece viable en localización intracelular. Para determinar la localización intracelular de las bacterias vivas utilizamos una sonda fluorescente específica que detecta solo bacterias viables. Esta metodología permitió determinar la distribución de bacterias vivas en la población de macrófagos y las características de los compartimientos en los cuales permanecían durante la vida intracelular. Como se mencionó más arriba, 2 días después de la infección una elevada proporción de macrófagos ha eliminado las bacterias intracelulares pero un 14.2% de los macrófagos infectados contiene un gran número de bacterias que permanecen viables en

localización intracelular y se encuentran en compartimientos que no presentan características de maduración fagolisosomal. Dado que el medio extracelular está suplementado con polimixina B y por lo tanto es bactericida, el gran número de bacterias vivas en estos macrófagos no puede explicarse por la captura de bacterias extracelulares vivas. Estos resultados son compatibles entonces con la replicación intracelular en una subpoblación de macrófagos. Esta situación puede ser explicada si asumimos que durante la diferenciación a macrófagos o como consecuencia de la interacción con *B. parapertussis* podría inducirse la aparición de diferentes fenotipos (51, 52), algunos más permisivos para el establecimiento de infecciones y otros no tanto (52). La sobrevivencia intracelular y la eventual replicación dentro de la célula dependerá de la capacidad de evadir la vía degradativa y de obtener nutrientes esenciales desde dentro de la célula. En este estudio observamos que 48 horas después de la infección *B. parapertussis* adquiere transferrina exógena dentro del fagosoma lo cual sugiere que esta bacteria permanece en compartimientos con características de endosoma temprano y con acceso a nutrientes esenciales a través de la vía de reciclaje de la célula hospedadora.

Como ocurre en el caso de otros patógenos que expresan antígeno O, en este estudio ha quedado demostrado que el antígeno O de *B. parapertussis* cumple un rol determinante en la sobrevivencia intracelular de ésta bacteria en macrófagos humanos. La falta de expresión del antígeno O determina la eliminación de la bacteria dentro de las 2 horas post-fagocitosis. Estudios previos demuestran que el antígeno O de diferentes patógenos está involucrado en la evasión de vía degradativa. La interacción del antígeno O con las balsas lipídicas y el reclutamiento de las mismas en el fagosoma determina que éste no entre en la vía degradativa (27, 53). En el capítulo anterior demostramos que *B. parapertussis* interacciona con las balsas lipídicas de los neutrófilos a través del antígeno O favoreciendo la sobrevivencia de la bacteria en este tipo celular. En este capítulo observamos que algo similar ocurre durante la interacción con macrófagos. La cepa salvaje de *B. parapertussis*, pero no la defectiva en el antígeno O, ingresa al macrófago a través de las balsas lipídicas. La ausencia del antígeno O determina que *B. parapertussis* ingrese al macrófago por una vía en la que no participan las balsas lipídicas y los fagosomas formados se fusionen rápidamente con los lisosomas de la célula hospedadora. La interacción de la cepa salvaje con la célula hospedadora a través de las balsas lipídicas con intervención del antígeno O se

confirmó empleando agentes disruptores de balsas lipídicas como la metil- β -ciclodextrina y drogas que inhiben la interacción con el colesterol de la membrana como es la nistatina. La fagocitosis de la cepa salvaje, pero no la de la cepa deficiente en la expresión del antígeno O, disminuyó de manera significativa luego del tratamiento de los macrófagos con estas drogas. Los estudios de colocalización mostraron que a los 2 días post-infección los fagosomas conteniendo la cepa salvaje de *B. parapertussis* estaban aún enriquecidos en balsas lipídicas. El porcentaje de bacterias asociadas a balsas lipídicas 48 horas después de la infección es similar al porcentaje de bacterias vivas que se encuentran en compartimientos que no se fusionaron con lisosomas a ese mismo tiempo post-infección, sugiriendo una asociación entre la sobrevivencia intracelular y el reclutamiento de balsas lipídicas en el fagosoma. La naturaleza molecular de la interacción entre el antígeno O y las balsas lipídicas aún está en estudio. Los resultados hasta aquí presentados sugieren que el colesterol podría estar involucrado en esta interacción dado que la nistatina, una droga que interfiere con la unión al colesterol, disminuye la asociación de *B. parapertussis* a los macrófagos. Sin embargo, no podemos descartar que el antígeno O interactúe con otras moléculas que se encuentran incluidas dentro de las balsas lipídicas. Por ejemplo, la molécula GM1 que participa en esta interacción en el caso de otros patógenos (27, 54), o el receptor CR3 que interactúa con la principal adhesina del género *Bordetella*, FHA, no pueden ser excluidos.

Los resultados presentados en este capítulo sugieren que *B. parapertussis* se comporta como un microorganismo intracelular facultativo, capaz de permanecer viable en localización intracelular, lo cual podría explicar las características tan particulares de la epidemiología de este patógeno estrictamente humano, sin reservorio conocido por fuera del hombre y que ha persistido por décadas en circulación. Estos resultados sugieren además que los macrófagos podrían ser un nicho, temporal o prolongado, de persistencia dentro del hospedador contribuyendo a la patogenicidad de esta bacteria y a la epidemiología de la enfermedad. En cualquier caso según los resultados mostrados en este capítulo y el capítulo anterior queda claro que las principales líneas de defensa de la inmunidad innata no contribuyen significativamente en el control de este patógeno. El antígeno O tiene un papel determinante en esta situación. Esta molécula articula una defensa que logra evadir las funciones bactericidas de la célula inmune permitiéndole a la

bacteria permanecer viable en localización intracelular. Esto parece estar relacionado con el reclutamiento de balsas lipídicas en el fagosoma que permite la evasión de la vía degradativa. La presencia de anticuerpos opsonizantes es crítica para la inducción de actividad celular bactericida en neutrófilos y macrófagos contra esta bacteria, así como para evitar el eventual establecimiento de infecciones intracelulares y nichos de persistencia. Dado que las vacunas actuales no inducen anticuerpos que reconozcan a *B. parapertussis*, el control de la tos convulsa dependerá de la formulación de una nueva generación de vacunas contra esta enfermedad que genere una respuesta inmune efectiva también contra *B. parapertussis*.

3.5 Referencias

1. Gatfield J, and Pieters J. 2000. Essential role for cholesterol in entry of *Mycobacteria* into macrophages. *Science*. 288:1647-1650.
2. Peyron P, Bordier C, N'Diaye EN, and Maridonneau-Parini I. 2000. Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J Immunol*. 165:5186-5191.
3. Naroeni A, and Porte F. 2002. Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun*. 70:1640-1644.
4. Ferrari G, Langen H, Naito M, and Pieters J. 1999. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of *Mycobacteria*. *Cell*. 97:435-447.
5. Kim S, Watarai M, Makino S, and Shirahata T. 2002. Membrane sorting during swimming internalization of *Brucella* is required for phagosome trafficking decisions. *Microb Pathog*. 33:225-237.
6. Watarai M, Derre I, Kirby J, Gowney JD, Dietrich WF, and Isberg RR. 2001. *Legionella pneumophila* is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus. *J Exp Med*. 194:1081-1096.
7. Watarai M, Makino S, Michikawa M, Yanagisawa K, Murakami S, and Shirahata T. 2002. Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to *Brucella abortus* infection of mice. *Infect Immun*. 70:4818-4825.
8. Jacobs RF, Locksley RM, Wilson CB, Haas JE, and Klebanoff SJ. 1984. Interaction of primate alveolar macrophages and *Legionella pneumophila*. *J Clin Invest*. 73:1515-1523.
9. Cianciotto NP. 2001. Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol*. 291:331-343.
10. Brockmeier SL, and Register KB. 2000. Effect of temperature modulation and bvg mutation of *Bordetella bronchiseptica* on adhesion, intracellular survival and cytotoxicity for swine alveolar macrophages. *Vet Microbiol*. 73:1-12.
11. Rosenberger CM, and Finlay BB. 2003. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:385-396.
12. Gantner F, Kupferschmidt R, Schudt C, Wendel A, and Hatzelmann A. 1997. In vitro differentiation of human monocytes to macrophages: change of PDE profile and its relationship to suppression of tumour necrosis factor-alpha release by PDE inhibitors. *Br J Pharmacol*. 121:221-231.
13. Wewers MD, Rennard SI, Hance AJ, Bitterman PB, and Crystal RG. 1984. Normal human alveolar macrophages obtained by bronchoalveolar lavage have a limited capacity to release interleukin-1. *J Clin Invest*. 74:2208-2218.
14. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, Greter M, Mortha A, Boyer SW, Forsberg EC, Tanaka M, van

- Rooijen N, Garcia-Sastre A, Stanley ER, Ginhoux F, Frenette PS, and Merad M. 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 38:792-804.
15. Allen A, and Maskell D. 1996. The identification, cloning and mutagenesis of a genetic locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol*. 19:37-52.
 16. Preston A, Allen AG, Cadisch J, Thomas R, Stevens K, Churcher CM, Badcock KL, Parkhill J, Barrell B, and Maskell DJ. 1999. Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in bordetellae. *Infect Immun*. 67:3763-3767.
 17. Boyum A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 97:77-89.
 18. Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovics ML, Harvill ET, and Rodriguez ME. 2010. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun*. 78:907-913.
 19. Wolfe DN, Goebel EM, Bjornstad ON, Restif O, and Harvill ET. 2007. The O antigen enables *Bordetella parapertussis* to avoid *Bordetella pertussis*-induced immunity. *Infect Immun*. 75:4972-4979.
 20. Rodriguez ME, Van der Pol WL, and Van de Winkel JG. 2001. Flow cytometry-based phagocytosis assay for sensitive detection of opsonic activity of pneumococcal capsular polysaccharide antibodies in human sera. *J Immunol Methods*. 252:33-44.
 21. Hellwig SM, van Oirschot HF, Hazenbos WL, van Spruiel AB, Mooi FR, and van De Winkel JG. 2001. Targeting to Fcγ receptors, but not CR3 (CD11b/CD18), increases clearance of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis*. 183:871-879.
 22. Zhang X, Goebel EM, Rodriguez ME, Preston A, and Harvill ET. 2009. The O antigen is a critical antigen for the development of a protective immune response to *Bordetella parapertussis*. *Infect Immun*. 77:5050-5058.
 23. Lee CK, Roberts AL, Finn TM, Knapp S, and Mekalanos JJ. 1990. A new assay for invasion of HeLa 229 cells by *Bordetella pertussis*: effects of inhibitors, phenotypic modulation, and genetic alterations. *Infect Immun*. 58:2516-2522.
 24. Neef A, Zaglauer A, Meier H, Amann R, Lemmer H, and Schleifer KH. 1996. Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of *Paracoccus spp.* in methanol-fed biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 62:4329-4339.
 25. Manz W, Szewzyk U, Ericsson P, Amann R, Schleifer KH, and Stenstrom TA. 1993. In situ identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*. 59:2293-2298.

26. Sturgill-Koszycki S, Schaible UE, and Russell DG. 1996. *Mycobacterium*-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *EMBO J.* 15:6960-6968.
27. Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S, and Liautard JP. 2003. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun.* 71:1481-1490.
28. Case ED, Chong A, Wehrly TD, Hansen B, Child R, Hwang S, Virgin HW, and Celli J. 2014. The *Francisella* O-antigen mediates survival in the macrophage cytosol via autophagy avoidance. *Cell Microbiol.* 16:862-877.
29. Arjcharoen S, Wikraiphath C, Pudla M, Limposuwan K, Woods DE, Sirisinha S, and Utaisinchaoen P. 2007. Fate of a *Burkholderia pseudomallei* lipopolysaccharide mutant in the mouse macrophage cell line RAW 264.7: possible role for the O-antigenic polysaccharide moiety of lipopolysaccharide in internalization and intracellular survival. *Infect Immun.* 75:4298-4304.
30. Roop RM, 2nd, and Caswell CC. 2013. Bacterial persistence: finding the "sweet spot". *Cell Host Microbe.* 14:119-120.
31. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, and Locati M. 2008. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 13:453-461.
32. Das D, and Bishayi B. 2009. Staphylococcal catalase protects intracellularly survived bacteria by destroying H₂O₂ produced by the murine peritoneal macrophages. *Microb Pathog.* 47:57-67.
33. Dubois A, and Boren T. 2007. *Helicobacter pylori* is invasive and it may be a facultative intracellular organism. *Cell Microbiol* 9:1108-1116.
34. Thulin P, Johansson L, Low DE, Gan BS, Kotb M, McGeer A, and Norrby-Teglund A. 2006. Viable group A streptococci in macrophages during acute soft tissue infection. *PLoS Med* 3:e53.
35. Watson RO, and Galan JE. 2008. *Campylobacter jejuni* survives within epithelial cells by avoiding delivery to lysosomes. *PLoS Pathog.* 4:e14.
36. Ewanowich CA, Sherburne RK, Man SF, and Pepler MS. 1989. *Bordetella parapertussis* invasion of HeLa 229 cells and human respiratory epithelial cells in primary culture. *Infect Immun.* 57:1240-1247.
37. Wallihan R, Selvarangan R, Marcon M, Koranyi K, Spicer K, and Jackson MA. 2013. *Bordetella parapertussis* bacteremia: two case reports. *Pediatr Infect Dis J.* 32:796-798.
38. Zuelzer WW, and Wheeler WE. 1946. Parapertussis pneumonia. *J Pediatr.* 29:493-497.
39. Correa-Londono A, and Ellner PD. Case report. *Clinical Microbiology Newsletter* 2:4.
40. Goebel EM, Wolfe DN, Elder K, Stibitz S, and Harvill ET. 2008. O antigen protects *Bordetella parapertussis* from complement. *Infect Immun.* 76:1774-1780.

41. Wolfe DN, Kirimanjeswara GS, and Harvill ET. 2005. Clearance of *Bordetella parapertussis* from the lower respiratory tract requires humoral and cellular immunity. *Infect Immun.* 73:6508-6513.
42. David S, van Furth R, and Mooi FR. 2004. Efficacies of whole cell and acellular pertussis vaccines against *Bordetella parapertussis* in a mouse model. *Vaccine* 22:1892-1898.
43. Liese JG, Renner C, Stojanov S, and Belohradsky BH. 2003. Clinical and epidemiological picture of *B pertussis* and *B parapertussis* infections after introduction of acellular pertussis vaccines. *Arch Dis Child.* 88:684-687.
44. Zhang X, Rodriguez ME, and Harvill ET. 2009. O antigen allows *B. parapertussis* to evade *B. pertussis* vaccine-induced immunity by blocking binding and functions of cross-reactive antibodies. *PLoS One.* 4:e6989.
45. He Q, Viljanen MK, Arvilommi H, Aittanen B, and Mertsola J. 1998. Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population. *JAMA.* 280:635-637.
46. Long GH, Karanikas AT, Harvill ET, Read AF, and Hudson PJ. 2010. Acellular pertussis vaccination facilitates *Bordetella parapertussis* infection in a rodent model of bordetellosis. *Proc Biol Sci.* 277:2017-2025.
47. Gorgojo J, Lamberti Y, Valdez H, Harvill ET, and Rodriguez ME. 2012. *Bordetella parapertussis* survives the innate interaction with human neutrophils by impairing bactericidal trafficking inside the cell through a lipid raft-dependent mechanism mediated by the lipopolysaccharide O antigen. *Infect Immun.* 80:4309-4316.
48. Dermine J-F, and Desjardins M. 1999. Survival of intracellular pathogens within macrophages. *Protoplasma.* 210:11-24.
49. Thi EP, Lambert U, and Reiner NE. 2012. Sleeping with the enemy: how intracellular pathogens cope with a macrophage lifestyle. *PLoS Pathog.* 8:e1002551.
50. Moulder JW. 1985. Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol Rev.* 49:298-337.
51. Rey-Giraud F, Hafner M, and Ries CH. 2012. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One* 7:e42656.
52. Benoit M, Desnues B, and Mege JL. 2008. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 181:3733-3739.
53. Norkin LC. 2001. Caveolae in the uptake and targeting of infectious agents and secreted toxins. *Adv Drug Deliv Rev.* 49:301-315.
54. Brennan MJ, Hannah JH, and Leininger E. 1991. Adhesion of *Bordetella pertussis* to sulfatides and to the GalNAc beta 4Gal sequence found in glycosphingolipids. *J Biol Chem* 266:18827-18831.

CAPITULO 4

Bordetella parapertussis sobrevive en células del epitelio respiratorio.

4. *Bordetella parapertussis* sobrevive en células del epitelio respiratorio.

4.1 Introducción

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que *B. parapertussis* tiene la capacidad de sobrevivir por períodos de tiempo prolongados en localización intracelular en células del sistema inmune, cuya función principal es la eliminación de patógenos. Aunque muchos patógenos establecen infecciones persistentes en este tipo de células, un tipo celular ampliamente relacionado con la persistencia de patógenos dentro del hospedador son las células del epitelio respiratorio. Si bien las células epiteliales funcionan como una barrera anatómica para los patógenos y cumplen funciones inmunes orientadas al control de infecciones mediante la generación de respuestas inflamatorias e inmunomodulatorias (1-4), no son células especializadas en la eliminación de patógenos y por lo tanto la sobrevivencia bacteriana se ve favorecida en el entorno intracelular. Diferentes patógenos entre los que se encuentran *B. pertussis* (5, 6), *Mycoplasma pneumoniae* (7), *Burkholderia cepacia* (8), *Haemophilus influenzae* (9), *Mycobacterium tuberculosis* (10), *Francisella tularensis* (11) y *Bacillus anthracis* (12) que ingresan al organismo a través de las vías aéreas se adhieren e invaden células del epitelio respiratorio y sobreviven en localización intracelular por períodos variables. La mayoría de estos microorganismos establecen nichos replicativos dentro de la célula epitelial. Otros, aunque no replican en localización intracelular, dependen de períodos intracelulares para establecer infecciones persistentes. Existe evidencia que hace suponer que el epitelio respiratorio podría constituir un reservorio para *Bordetella* (13). A pesar de la relevancia que tendría la existencia de un estadio intracelular en este tipo de células en la patogénesis de esta bacteria, pocos estudios han abordado esta temática y en particular es muy poco lo que se conoce de la interacción de *B. parapertussis* con células del epitelio respiratorio.

En este capítulo investigamos esta interacción y para ello elegimos una línea celular derivada del epitelio bronquial superficial de un humano sano (16HBE14o-), establecida mediante transfección con el genoma del SV40 defectuoso en el origen de replicación (14).

Estas células tienen la particularidad de que han retenido ciertas características de las células primarias diferenciadas que le dieron origen, entre las que se destacan el crecimiento polarizado, el establecimiento de uniones estrechas entre células y la direccionalidad del flujo iónico (14). El crecimiento polarizado determina la existencia de una membrana basolateral y una membrana apical, cada una con un determinado arreglo de receptores en su superficie. Los patógenos interactúan de manera diferente con la membrana apical y la basolateral lo que determina diferentes capacidades de invasión (15, 16) y por lo tanto, el crecimiento polarizado es un aspecto a considerar en el estudio de la interacción de patógenos con células del epitelio respiratorio. El cultivo de otras líneas celulares que se han empleado en los pocos estudios previos relacionados con ésta y otras especies del género *Bordetella* no muestran un crecimiento de este tipo, por ejemplo A549 (17), NCI-H292 (17), HeLa (18). La importancia de la polarización en estudios de este tipo radica fundamentalmente en las posibilidades de extrapolar los resultados obtenidos *in vitro* a la situación *in vivo*.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

En este estudio se utilizó la cepa salvaje de *B. parapertussis* CN2591 y la cepa mutante defectiva en la expresión del antígeno O denominado CN2591 Δ *wbm* (isogénica de *B. parapertussis* CN2591) (19, 20), la cepa salvaje de *B. pertussis* Tohama I, un mutante defectiva en la expresión de la CyaA (21) y un mutante defectiva en la expresión de la PTx (Bp357) (22) ambos derivados de Tohama I. Las bacterias fueron cultivadas en placas de Agar Bordet Gengou (DIFCO Laboratories, USA), suplementada con 15 % v/v de sangre desfibrinada de carnero (ABGs), durante 24 hs a 37°C. Al cabo de este tiempo se repicó en una nueva placa ABGs y se cultivó a 37°C durante 20 hs. En determinados ensayos la cepa salvaje de *B. parapertussis* se cultivó en ABGs con el agregado de 50 mM MgSO₄ para modular su crecimiento hacia una fase avirulenta (23, 24).

4.2.2. Células y condiciones de cultivo

Los ensayos de infección se llevaron a cabo utilizando la línea celular 16HBE14o- derivada de células epiteliales bronquiales normales inmortalizadas por transfección con el genoma del virus SV40 defectivo en el origen de replicación (Cedidas gentilmente por el Dr Dieter Gruenert, Universidad de San Francisco, California a través del Dr. Pablo Baldi, IDEHU, UBA) (14). Las células 16HBE14o- fueron cultivadas en botellas tratadas con fibronectina/colágeno/seroalbumina bovina (BSA) en medio MEM (minimal essential medium) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (SFB) a 37°C, 5% de CO₂ y 100% de humedad. Cuando el cultivo alcanzó un 80% de confluencia, las células fueron removidas con tripsina (0.25% v/v)-EDTA (0.1% p/v) (5 min a 37°C) y cultivadas en placas de 24 pocillos previamente tratadas con fibronectina/colágeno/BSA en una concentración de 2×10^5 células por pocillo. En determinados experimentos se colocó en cada pocillo un cubreobjetos circular de vidrio de 12 mm de diámetro tratado con fibronectina/colágeno/BSA. El estado del cultivo se monitoreó por observación microscópica periódica y recuento de células viables mediante tinción con Trypan Blue en pocillos elegidos al azar.

En determinados estudios se utilizaron neutrófilos aislados de sangre humana heparinizada utilizando gradientes de centrifugación Ficoll-Histopaque (Sigma, St. Louis, MO, USA), según se describió en el punto 2.2.2. Previo a la realización de los ensayos funcionales, los neutrófilos fueron lavados dos veces con DMEM suplementado con 0.2% p/v de BSA (Sigma), resuspendidos y utilizados inmediatamente. En determinados experimentos los neutrófilos fueron incubados con el medio sobrenadante de células 16HBE14o- sin infectar o infectadas con las diferentes cepas bacterianas.

4.2.3 Anticuerpos y sueros

Los siguientes anticuerpos fueron utilizados en este ensayo: fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con CY3 y fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC (ambos de Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). También se empleó la fracción IgG de un pool de sueros humanos de pacientes con elevado título contra *B. parapertussis*, según se determinó por ELISA (25), obtenida como se describe en Rodríguez *et al.* (26), suero de conejo anti-*B. parapertussis* obtenido según se describe en Hellwig *et al.* (27), y suero de ratón anti-*B. parapertussis* obtenidos según se describe en Zhang *et al.* (28). Estos sueros presentan elevado título contra *B. parapertussis*, según se determinó por ELISA (25).

4.2.4. Ensayos de adhesión e invasión

La adhesión e invasión de las células 16HBE14o- por *B. parapertussis* se evaluó por microscopía de fluorescencia. Para ello, aproximadamente 2×10^5 células fueron colocadas en cada pocillo en placas de 24 pocillos e incubadas durante 24 horas previo a la infección a 37°C y con 5% CO₂ en medio MEM suplementado con SFB 10 % v/v. Las bacterias fueron incubadas con las células a una multiplicidad de infección (MDI) de 100, 10 o 1 durante 4 o 24 horas. El inóculo bacteriano fue controlado mediante recuento de UFC en ABGs. Luego de lavar para remover las bacterias no adheridas, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% (10 min a 4°C), lavadas con PBS e incubadas con NH₄CL 50 mM (10 minutos a 25°C). El número de bacterias adheridas a la superficie de la célula y aquellas internalizadas fueron discriminadas por doble marcación fluorescente y microscopía de fluorescencia. Para determinar el número de bacterias adheridas, las células

fueron incubadas con anticuerpos policlonales de conejo anti-*B. parapertussis* (30 min a 4°C), seguido por la incubación con fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con CY3 (30 min a 4°C). Para determinar el número de bacterias intracelulares las células fueron lavadas y permeabilizadas mediante la incubación con una solución de saponina 0.1% (Sigma) y BSA (Sigma) 0.2% (30 minutos a temperatura ambiente), seguido de la tinción de las bacterias por inmunofluorescencia indirecta. Para ello las células fueron incubadas con anticuerpos policlonales de conejo anti-*B. parapertussis* (30 min a 25°C), seguido por la incubación con fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC (30 min a 25°C) todo en presencia de saponina 0.1% y BSA 0.2%. Luego del lavado con agua destilada para eliminar el exceso de sales, las muestras se montaron sobre cubreobjetos y fueron analizadas por microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio DMLB acoplado a una cámara DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Switzerland). El número de bacterias extracelulares (rojas y verdes) e intracelulares (verdes) se determinó por observación de al menos 100 células en cada condición. Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado.

4.2.5 Sobrevida intracelular: ensayo de protección con polimixina B

Células 16HBE14o- fueron infectadas con *B. parapertussis* (MDI: 10) según se describió en los ensayos de adhesión. El inóculo bacteriano fue controlado mediante recuento de UFC en ABGs. Luego de 4 horas de incubación a 37°C con 5% CO₂, las células fueron lavadas para eliminar las bacterias no adheridas e incubadas con polimixina B (100 µg/ml) (Sigma) durante 1 h a 37°C, un antibiótico que no penetra en las células eucariotas (29). Posteriormente la concentración de antibiótico fue reducida a 5 µg/ml, la cual se mantuvo durante el resto del ensayo. La polimixina B inactiva las bacterias extracelulares adheridas a la célula y las bacterias en suspensión que no fueron eliminadas por los lavados. Experimentos control demuestran que en presencia de polimixina B 5 µg/ml *B. parapertussis* no es capaz de replicar o sobrevivir en el medio de cultivo. Según se determinó por recuento de UFC, a esta concentración de antibiótico no se detectan bacterias viables en los sobrenadantes de los cultivos celulares a los diferentes tiempos post-infección evaluados (6, 24, 48 y 72 horas). A diferentes tiempos post-infección las células

fueron lavadas con PBS para eliminar el antibiótico y la sobrevivida intracelular de *B. parapertussis* se determinó como se describe a continuación. Las células fueron levantadas por tratamiento con tripsina (0.25% v/v)-EDTA (0.1% p/v) (5 minutos a 37°C) y cada muestra se dividió en dos alícuotas. Una de ellas se utilizó para determinar el número de células viables mediante tinción con Trypan Blue y recuento en cámara de Neubauer y la otra fue incubada en agua destilada durante 10 min a 4°C para provocar la lisis osmótica de la célula permitiendo la liberación de las bacterias intracelulares. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en agua destilada con saponina 0.1% p/v, y finalmente fueron sembradas en placas conteniendo ABGs para determinar el número de bacterias por recuento de UFC. Los resultados se expresaron con el número de bacterias viables por célula a un determinado tiempo respecto al número de células intracelulares viables a las 6 horas post-infección. En determinados ensayos luego del tratamiento con polimixina B 100 µg/ml, las células fueron incubadas con medio libre de antibiótico. A diferentes tiempos post-infección (6, 24, 48 y 72 horas), las células fueron lavadas, incubadas con polimixina B 100 µg/ml (1 hora a 37°C) para eliminar posibles bacterias extracelulares, y el número de bacterias vivas en localización intracelular se determinó como se describió anteriormente.

En experimentos control se evaluó la actividad bactericida de la polimixina B. Para ello, muestras de 5×10^8 bacterias fueron incubadas con 1 ml de polimixina B (100 µg/ml) durante 1 h a 37°C, lavadas y sembradas en ABGs. El tratamiento produjo una disminución del 99,999% en la viabilidad bacteriana, según se determinó por recuento de UFC. Las diferentes bacterias utilizadas no mostraron diferencias significativas en la sensibilidad a la polimixina B.

4.2.6 Repoblación del medio extracelular

Células 16HBE14o- fueron infectadas con *B. parapertussis* (MDI: 10) según se describió en los ensayos de adhesión. En determinados experimentos las células fueron tratadas con citocalasina D 200 ng/ml (Sigma) 1 hora previo a la infección para inhibir la internalización de las bacterias (30). Luego de 4 horas de infección a 37°C con 5% CO₂, las células fueron lavadas para eliminar las bacterias no adheridas e incubadas con polimixina B (100 µg/ml) (Sigma) durante 1 h a 37°C. Posteriormente las células fueron incubadas en medio fresco sin suplementar o suplementado con polimixina B 5 µg/ml, la cual se

mantuvo durante el resto del ensayo. Como se describió anteriormente, a esta concentración de antibiótico la bacteria no es capaz de replicar o sobrevivir en el medio de cultivo. A diferentes tiempos post-infección el número de bacterias extracelulares presentes en el sobrenadante de las células infectadas se determinó por recuento de UFC. Para ello se realizaron diluciones seriadas del sobrenadante de las células infectadas y se sembraron en placas de ABG.

4.2.7 Determinación de citoquinas en el sobrenadante de células 16HBE14o-

Células 16HBE14o- cultivadas como se describió anteriormente, fueron infectadas con *B. parapertussis* (MDI: 10) durante 4 horas a 37°C. Luego de lavar para eliminar las bacterias extracelulares, las células fueron incubadas en medio suplementado con polimixina B (100 µg/ml) (Sigma) durante 1 h a 37°C y posteriormente la concentración de antibiótico fue reducida a 5 µg/ml, la cual se mantuvo durante el resto del ensayo. A las 24 horas post-infección el sobrenadante de los cultivos se centrifugó a 13000 x g durante 7 minutos, y luego se filtró utilizando filtros de baja adhesión con poro de 0.2 µm de diámetro para eliminar las bacterias remanentes. Los medios sobrenadantes se separaron en alícuotas y se guardaron a -70°C hasta su utilización. La determinación de los niveles de IL-8 en el medio sobrenadante se realizó utilizando un ELISA sándwich para la detección de IL-8 de acuerdo a las especificaciones del productor (CLB, Amsterdam, The Netherlands). Estos mismos sobrenadantes fueron utilizados en los ensayos de formación de NETs según se detalla más adelante. .

4.2.8 Evaluación de la citotoxicidad de *B. parapertussis*

La viabilidad celular de células 16HBE14o- fue evaluada como se detalla a continuación. Células 16HBE14o- fueron infectadas con las respectivas bacterias a una MDI de 10, durante 4 horas a 37°C. Luego las células fueron incubadas en medio suplementado con polimixina B (100 µg/ml) (Sigma) durante 1 h a 37°C para eliminar bacterias extracelulares. Posteriormente las células fueron incubadas en medio fresco sin suplementar o suplementado con polimixina B 5 µg/ml, condición que se mantuvo durante el resto del ensayo. A diferentes tiempos post-infección (6, 24, 48, 72 horas), las células fueron despegadas del soporte por tratamiento con tripsina (0.25% v/v)-EDTA (0.1% p/v)

(5 min a 37°C) y el número de células vivas o muertas fue determinado mediante la incubación de las células con SYTO 9 (6 µM) y Ioduro de propidio (12 µM), y analizadas por microscopía de fluorescencia. Ambos compuestos funcionan como agentes intercalantes de ADN. Estos compuestos difieren en los espectros de excitación-emisión y en la penetrabilidad de la membrana. El SYTO 9 es una molécula que penetra tanto en células con la membrana intacta como aquellas con la membrana dañada, y por lo tanto tiñe la totalidad de las células, y su espectro de emisión se encuentra dentro del verde. El ioduro de propidio, que no penetra en células con la membrana intacta, tiñe solo aquellas células en las cuales la membrana plasmática se encuentra dañada y emite dentro del rojo. El solapamiento entre los espectros de emisión de SYTO 9 y el de excitación del ioduro de propidio determinan que aquellas células con la membrana dañada en la cual han ingresado ambos compuestos, solo se emita en el rojo. Por lo tanto la utilización de estos compuestos en conjunto permiten diferenciar células vivas (verdes) de muertas (rojas).

4.2.9 Inducción de la formación de NETs en neutrófilos

Neutrófilos humanos recién aislados fueron resuspendidos con el medio sobrenadante de células 16HBE14o- infectadas con las diferentes cepas bacterianas obtenidos según se detalló anteriormente (punto 4.2.7). Los neutrófilos (1×10^6 células/ml) fueron incubados en placas de 24 pocillos conteniendo cubreobjetos de 12 mm, a 37°C y con 5% CO₂. A las 4 horas, post-incubación las células fueron fijadas por tratamiento con paraformaldehído y la formación de NETs se determinó mediante la marcación del ADN con ioduro de propidio y microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio DMLB acoplado a una cámara DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Switzerland). El número de neutrófilos que formaron NETs se determinó por observación de al menos 100 células en cada condición. Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces por duplicado. En determinados experimentos, los neutrófilos fueron infectados durante 30 minutos con las diferentes cepas bacterianas, previo al tratamiento con los diferentes medios sobrenadantes.

4.2.10 Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación de los valores obtenidos (medias) se utilizó el test de Menor Diferencia Significativa (LSD) con un grado de significación del 95% ($P < 0.05$). Los resultados se muestran como el valor medio y la desviación estándar (DE).

4.3 Resultados

4.3.1 *B. parapertussis* invade células 16HBE14o- y sobrevive en localización intracelular

Monocapas de la línea celular 16HBE14o- fueron infectadas con *B. parapertussis* con una multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula durante 24 horas. Esta condición se seleccionó teniendo en cuenta estudios previos en los que se emplearon células de línea A549. Sin embargo, se observó que en estas condiciones de ensayo sólo un pequeño porcentaje de células 16HBE14o- permanecen viables a las 24 horas post-infección, según se determinó por tinción con Trypan Blue (Fig. 1A). Con motivo de reducir los efectos citotóxicos sobre las células epiteliales la infección se llevó a cabo utilizando multiplicidades de infección menores (MDI: 10 o 1). A pesar del menor número de bacterias en el medio, 24 horas post-infección las células comenzaron a mostrar signos de muerte celular que se evidenciaron por la disminución del tamaño celular y cambios en la morfología de la célula (Fig. 1A). Los ensayos de viabilidad con Trypan Blue mostraron que, aunque en menor grado, luego de 24 horas de infección un gran porcentaje de las células habían perdido viabilidad en ambos casos (MDI: 1, ~55.0% de muerte; MDI: 10, ~62.7% de muerte). Durante las 24 horas de incubación hay un aumento muy significativo en el número de bacterias extracelulares (Fig. 1B), que seguramente determine la acumulación de grandes cantidades de toxinas en el entorno de la célula epitelial causando un efecto citotóxico sobre estas. Si se tiene en cuenta que el inóculo necesario para infectar un humano se ha calculado en aproximadamente 1000 bacterias, durante la colonización inicial es poco probable que haya tal crecimiento bacteriano en una zona reducida y por lo tanto la concentración local de toxinas que esto conlleva (31). Para emplear condiciones de cultivo más relevantes decidimos emplear solo 4 horas de infección (en este tiempo solo ocurre una duplicación bacteriana), luego remover las bacterias por lavados e inactivarlas con antibióticos antes de continuar los ensayos. En estas condiciones la viabilidad de las células epiteliales no se vio afectada (datos no mostrados). Los niveles de adhesión y la capacidad de *B. parapertussis* de invadir las células 16HBE14o- se estudiaron entonces en estas condiciones. Para ello luego de 4 horas de infección las células fueron lavadas para eliminar las bacterias que no se encontraban adheridas, fijadas por tratamiento con paraformaldehído, y el número de bacterias adheridas e internalizadas se determinó

mediante doble marcación fluorescente y microscopía de fluorescencia. A las 4 horas post-infección, utilizando una MDI de 100, el número de bacterias adheridas fue de aproximadamente 10.8 bacterias por célula y el número de bacterias internalizadas fue de 0.9 bacterias por célula (Fig. 1C). Según puede verse en la Figura 1C, a las 4 horas post-infección utilizando una MDI de 10 el número de bacterias asociadas e intracelulares no muestran diferencias significativas con los valores obtenidos con una MDI de 100, mientras que a una MDI de 1 tanto el número de bacterias asociadas como intracelulares disminuyó de manera drástica. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió utilizar en los ensayos siguientes una MDI de 10 y 4 horas de infección seguido por un tratamiento con antibióticos, dado que en estas condiciones la tasa de invasión es alta y los efectos citotóxicos sobre la célula epitelial no han tenido lugar.

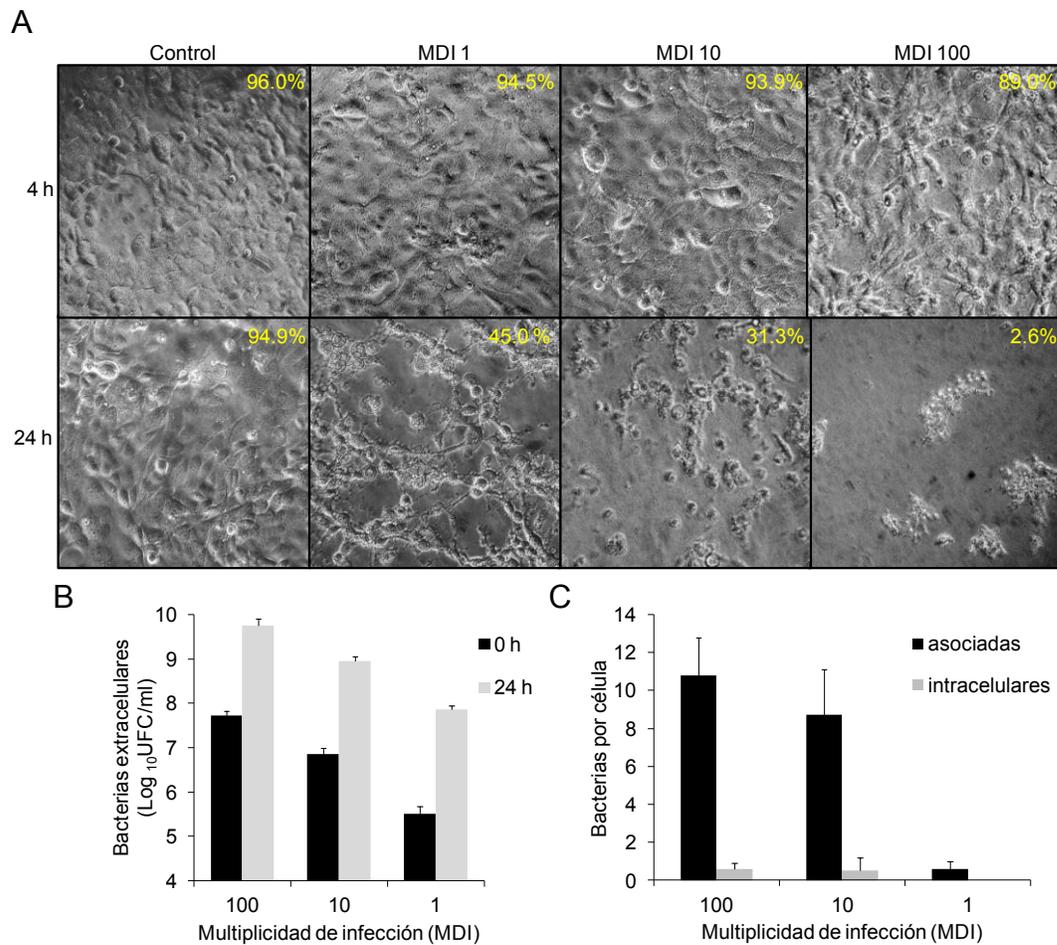


Figura 1. Adhesión e invasión de células 16HBE14o- . Células 16HBE14o- fueron infectadas con *B. parapertussis* (MDI: 100, 10 o 1) e incubadas a 37°C y 5% CO₂. A

diferentes tiempos post-infección (4 o 24 hs) las monocapas fueron observadas por microscopía óptica e incubadas con tripsina para determinar el porcentaje de células viables por tinción con Trypan Blue (A) En la figura se muestran imágenes representativas de uno de tres experimentos independientes. El porcentaje de células viables se indica en amarillo. (B) En paralelo se determinó el número de bacterias extracelulares vivas a los diferentes tiempos post-infección mediante recuento de UFC en el sobrenadante de las células infectadas a cada una de las MDI evaluadas. En la figura se muestran los valores medios \pm DE de al menos tres experimentos independientes expresados como el número de UFC por mililitro a cada tiempo post-infección para cada MDI evaluada. El número de bacterias extracelulares a las 4 horas post-infección difiere significativamente del número encontrado a las 24 horas post-infección para cada una de las MDI evaluadas ($P < 0.05$). (C) Células 16HBE14o- infectadas con *B. parapertussis* a una MDI: 100, 10, o 1 fueron incubadas durante 4 horas a 37°C. Luego de lavar las células para eliminar las bacterias no adheridas, las células fueron fijadas con tratamiento con paraformaldehído y el número de bacterias asociadas e intracelulares se determinó mediante doble tinción y microscopía de fluorescencia. Los resultados se expresaron como el número de bacterias asociadas o intracelulares por célula a los diferentes tiempos post-infección para cada MDI evaluada. Los datos representan la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes. El número de bacterias asociadas e intracelulares por célula a una MDI de 100 no muestra diferencias significativas con el número de bacterias asociadas e intracelulares encontrados a una MDI de 10 ($P < 0.05$). El número de bacterias asociadas e intracelulares encontrados a una MDI de 1 difiere significativamente de los valores encontrados a las MDI mayores ($P < 0.05$).

Se investigó entonces la viabilidad de las bacterias en localización intracelular. Para ello luego de 4 horas de infección las células fueron lavadas para remover aquellas bacterias que no estaban adheridas, y tratadas con polimixina B (100 $\mu\text{g/ml}$) para eliminar las bacterias remanentes, y luego de una hora se agregó medio con 5 $\mu\text{g/ml}$ para mantener las condiciones bactericidas en el espacio extracelular. A diferentes tiempos post-infección se determinó el número de bacterias intracelulares viables mediante lisis osmótica y recuento de UFC. En la Figura 2 se puede ver que los niveles de sobrevivencia intracelular de *B. parapertussis* disminuyen de manera significativa en el tiempo. Sin embargo 3 días después de la infección aún hay bacterias viables en localización intracelular.

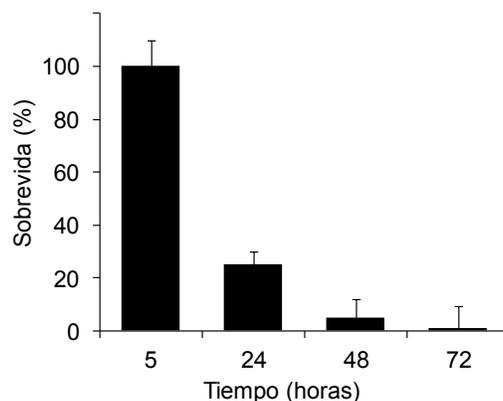


Figura 2. Sobrevida intracelular de *B. parapertussis* en células 16HBE14o-. Células 16HBE14o- fueron infectadas con *B. parapertussis* (MDI: 10) durante 4 horas a 37°C. Luego las células fueron lavadas para eliminar las bacterias no adheridas y tratadas con polimixina B para inactivar bacterias extracelulares. El número de bacterias viables por célula fue determinado a diferentes tiempos post-infección (6, 24, 48 y 72 hs) mediante recuento de UFC y recuento de células en cámara de Neubauer. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de bacterias vivas por célula a los diferentes tiempos post-infección, respecto al número de bacterias intracelulares viables a las 6 horas post-infección. Los datos representan la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes. El número de bacterias viables disminuye de manera significativa en el tiempo ($P < 0.05$).

4.3.2 Repoblación del medio extracelular

Con el fin de confirmar si las bacterias intracelulares viables tienen la capacidad, al igual que otros patógenos (6, 32), de salir de la célula hospedadora y repoblar el medio extracelular, se realizó el siguiente ensayo. Monocapas de células 16HBE14o- fueron infectadas con *B. parapertussis* durante 4 horas. Luego de lavar para remover bacterias extracelulares las células se incubaron con medio suplementado con polimixina B 100 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 hora para matar las bacterias extracelulares remanentes. Posteriormente las células se incubaron en medio fresco sin suplementar o suplementado con polimixina B 5 $\mu\text{g/ml}$ y a diferentes tiempos post-infección (6, 24 y 48 horas) se determinó el número de bacterias en sobrenadante mediante recuento de UFC. En experimentos control se confirmó que el tratamiento con polimixina B 100 $\mu\text{g/ml}$ determina la eliminación del 99,999% de las bacterias *B. parapertussis* presentes en el medio de cultivo y que en presencia de polimixina B 5 $\mu\text{g/ml}$ *B. parapertussis* no es capaz de replicar o sobrevivir en el medio de cultivo. Según puede observarse en la Figura 3, a diferencia de lo que ocurre en presencia

de polimixina B 5 $\mu\text{g/ml}$, en ausencia del antibiótico el número de bacterias aumenta significativamente en el medio extracelular. Dado que las células fueron inicialmente tratadas con una dosis letal de polimixina B (100 $\mu\text{g/ml}$), la diferencia observada entre las células sin tratar o tratadas con polimixina B 5 $\mu\text{g/ml}$ podría explicarse por el egreso de bacterias que permanecieron viables en localización intracelular y su posterior replicación en el medio extracelular. Para confirmar que el crecimiento bacteriano observado provenía de bacterias que se encontraban en localización intracelular y no de bacterias extracelulares que no habían sido inactivadas por el tratamiento con antibiótico, las células se infectaron en presencia de citocalasina D, que evita la polimerización de actina e inhibe los mecanismos de ingreso a la célula. En estos ensayos las células fueron preincubadas con citocalasina D durante 1 hora previo a la infección y luego fueron infectadas. La citocalasina D se mantuvo durante todo el ensayo. Luego de 4 horas de infección, las células fueron incubadas con polimixina B 100 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 hora, lavadas, e incubadas en medio libre de antibióticos hasta la finalización del ensayo. A diferentes tiempos post-infección se determinó el número de bacterias extracelulares en el sobrenadante de células infectadas mediante recuento de UFC. En la Figura 3 se puede observar que en presencia de citocalasina D no hay crecimiento bacteriano en el medio extracelular, confirmando que la repoblación del medio extracelular ocurre por la salida de *B. parapertussis* desde el interior de la célula hospedadora en un estado viable y su replicación en el medio extracelular.

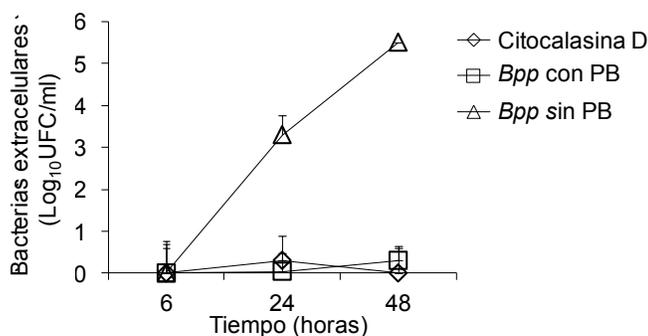


Figura 3. Estudio de la capacidad de *B. parapertussis* de repoblar el medio extracelular. Células 16HBE14o- sin tratar o tratadas con citocalasina D fueron infectadas con *B. parapertussis* (MDI: 10) durante 4 horas a 37°C y 5% CO₂, lavadas para eliminar las bacterias no adheridas y tratados con polimixina B 100 $\mu\text{g/ml}$ para inactivar bacterias extracelulares. Posteriormente las células fueron incubadas en medio sin suplementar o suplementado con polimixina B 5 $\mu\text{g/ml}$ hasta la finalización del ensayo. En las muestras que fueron tratadas con citocalasina D, la droga se mantuvo durante todo el ensayo para

evitar la reversibilidad del proceso. El número de bacterias extracelulares fue determinado a diferentes tiempos post-infección (6, 24 y 48 horas) por recuento de UFC. Los resultados se expresaron como UFC/ml de medio extracelular. Los datos representan la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes. El número de bacterias extracelulares viables en ausencia de polimixina B 5 μ g/ml difiere significativamente del número de bacterias extracelulares viables en las muestras tratadas con antibiótico o con citocalasina D ($P < 0.05$).

4.3.3 Efecto de la repoblación del medio extracelular sobre la reinfección de las células epiteliales

Se estudió el efecto de la repoblación del medio extracelular sobre la eventual reinfección de las células epiteliales. Para ello las células se incubaron con *B. parapertussis* durante 4 horas y luego de este tiempo las bacterias extracelulares fueron removidas por lavado y posterior incubación con polimixina B (100 μ g/ml) durante 1 hora a 37°C. Finalizada la incubación el antibiótico fue removido y reemplazado por medio de cultivo solo o con el agregado de 5 μ g/ml de polimixina B. A diferentes tiempos post-infección (6, 24 y 48 horas) las células fueron levantadas por tratamiento con tripsina, y luego de fijarlas con tratamiento con paraformaldehído, se determinó el número de bacterias asociadas por célula y el número de células infectadas mediante la marcación indirecta de las bacterias y microscopía de fluorescencia. A cada tiempo y en cada condición ensayada se verificó la existencia o no de repoblación del medio extracelular por recuento de UFC según se describió anteriormente (datos no mostrados). Tanto el número de bacterias asociadas a las células como el número de células infectadas aumentó de manera significativa durante el crecimiento bacteriano en el medio extracelular. En ausencia de antibióticos las bacterias crecen rápidamente y un gran número de bacterias aparecen asociadas a las células (Fig. 4A). La presencia de antibiótico determinó una disminución significativa en el número de bacterias asociadas a las células en el tiempo (Fig. 4A y 4B). Por otro lado el número de células infectadas aumentó de un 63 \pm 10% a las 5 horas post-infección a un 100 \pm 8% a las 24 y 48 horas post-infección, mientras que en las células tratadas con antibióticos este valor disminuyó gradualmente (6h, 59 \pm 7%; 24h, 40 \pm 11%, 48h; 33 \pm 9%). El número de bacterias intracelulares viables en cada condición (con antibiótico o sin antibiótico), se determinó mediante recuento de UFC en ABGs. Para ello las células que no tuvieron el tratamiento con antibiótico (polimixina 5 μ g/ml) se incubaron con polimixina B 100 μ g/ml durante 1

hora antes del recuento en placa. Una alícuota de cada muestra se empleó para determinar el número de células por recuento en cámara de Neubauer. En la Fig. 4C se observa que en presencia de antibióticos en el medio extracelular el número de bacterias intracelulares viables disminuye de manera significativa en el tiempo, mientras que en ausencia de antibióticos permanece constante, indicando que bacterias presentes en el medio extracelular han re infectando las células epiteliales.

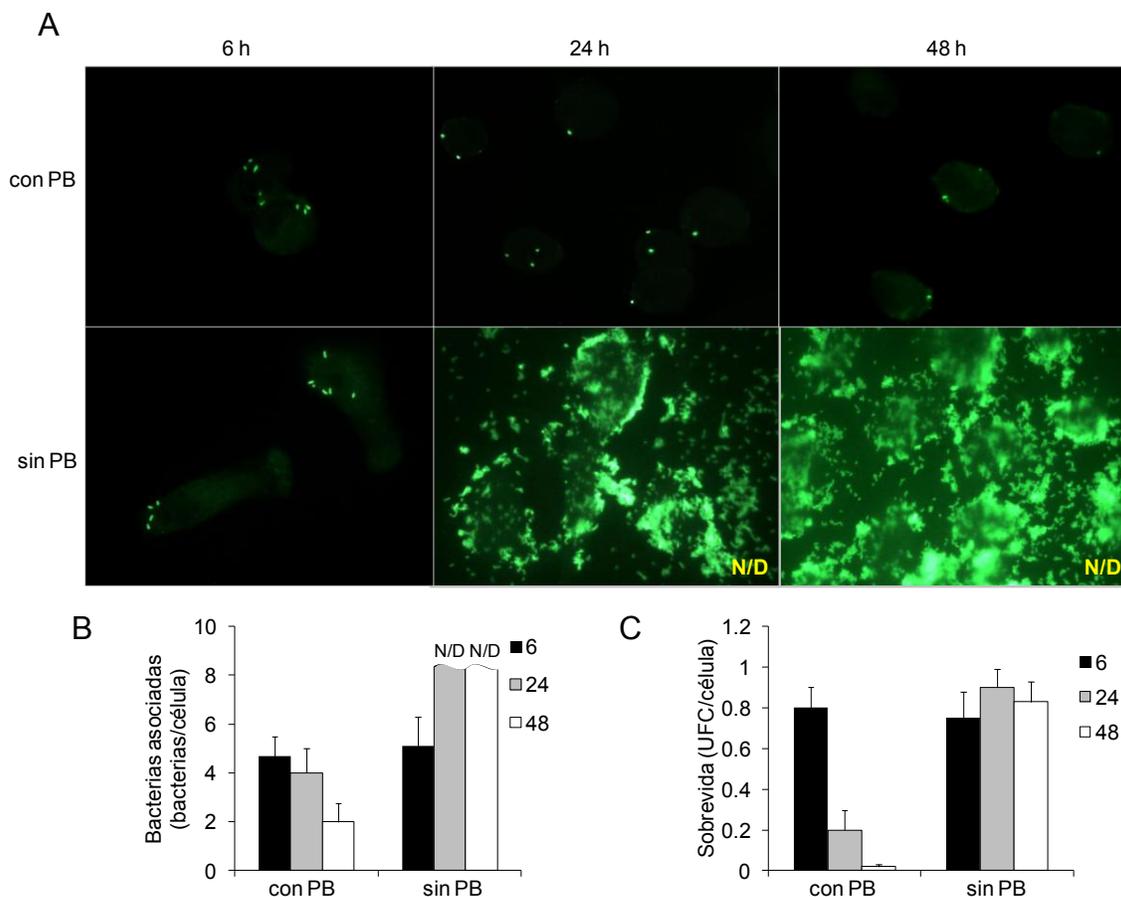


Fig. 4 Repoblación del medio extracelular e interacción con células 16HBE14o-. Células 16HBE14o- fueron infectadas con *B. parapertussis* (MDI: 10) durante 4 horas a 37°C, lavadas para eliminar las bacterias no adheridas y tratadas con polimixina B 100 µg/ml para inactivar bacterias extracelulares. Posteriormente las células fueron incubadas en medio sin suplementar o suplementado con polimixina B 5 µg/ml hasta la finalización del ensayo. El número de bacterias asociadas por célula fue determinado a diferentes tiempos post-infección (6, 24 y 48 horas) por marcación de bacterias por inmunofluorescencia indirecta y microscopía de fluorescencia. (A) Paneles representativos de las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia en cada condición. (B) Número de bacterias por célula a los diferentes tiempos post-infección. (C) El número de bacterias viables que se encuentran en localización intracelular fue determinado mediante recuento

de UFC y recuento de células a diferentes tiempos post-infección. Los resultados se expresan en unidades formadoras de colonia por célula para cada tiempo. Los datos representan la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes. El número de UFC por célula en ausencia de polimixina B 5 $\mu\text{g/ml}$ no mostró modificaciones significativas a ninguno de los tiempos ensayados. El número de UFC por célula en presencia de polimixina B 5 $\mu\text{g/ml}$ disminuyó significativamente en el tiempo ($P < 0.05$). (N/D: no determinado)

4.3.4 La citotoxicidad de *B. parapertussis* es dependiente de factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS

Así como se observó reinfección de las células epiteliales también se observó aumento de la citotoxicidad, muy probablemente por efecto de la acumulación local de bacterias vivas, tal como se observara en los experimentos descritos en el punto 4.3.1. En un intento por evaluar el origen de la actividad citotóxica se estudió la cinética de muerte y los posibles factores bacterianos implicados en la disminución de la viabilidad de las células epiteliales. Para ello luego de 4 horas de infección, las células fueron tratadas con polimixina B 100 $\mu\text{g/ml}$ para eliminar bacterias extracelulares y luego incubadas en medio libre de antibióticos o con medio suplementado con polimixina B 5 $\mu\text{g/ml}$. A diferentes tiempos post-infección (6, 24, 48 y 72 horas) las células fueron lavadas y despegadas de su anclaje por tratamiento con tripsina. La viabilidad de las células fue determinada mediante microscopía de fluorescencia y la tinción con diferentes agentes intercalantes de DNA utilizados para discriminar células vivas (SYTO 9; verde) de células muertas (ioduro de propidio; rojo). Según se pudo observar durante las primeras 24 horas el crecimiento bacteriano (ocurrido en el medio sin antibiótico) no tuvo efectos citotóxicos sobre las células epiteliales y el porcentaje de células viables en la muestra infectada con *B. parapertussis* no mostró diferencias significativas con el de células sin infectar (datos no mostrados). Luego de 48 horas el número de células epiteliales viables comienza a disminuir conforme aumenta la repoblación del medio extracelular, y a las 72 horas post-infección el número de células viables se ha reducido significativamente. Como era de esperar, y coincidentemente con las condiciones bactericidas del medio, en aquellas muestras en las que se mantuvo el antibiótico en el medio extracelular la viabilidad celular no se modificó en el tiempo y 72 horas post-infección el porcentaje de células viables no mostró diferencias significativas con los valores encontrados a las 6 horas post-infección

(datos no mostrados). Con objeto de determinar si la citotoxicidad sobre las células epiteliales se debe a la presencia de alguno de los factores de virulencia regulado por el sistema BvgAS expresado por *B. parapertussis*, se evaluaron los efectos citotóxicos sobre las células epiteliales de una cepa de *B. parapertussis* modulada a avirulenta mediante el crecimiento en medio suplementado con MgSO₄. Según se puede observar en la Figura 5, la infección con una cepa avirulenta de *B. parapertussis* no induce una muerte celular significativa sobre las células epiteliales a ninguno de los tiempos ensayados, indicando que la citotoxicidad es causada por alguno de los factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS. De las toxinas expresadas por *B. parapertussis* reguladas por el BvgAS es muy probable que la CyaA, que es una toxina muy potente con reconocida actividad citotóxica sea la responsable de este efecto, sobre todo teniendo en cuenta que la excreción de la misma se ve facilitada por la presencia de la elevada concentración de Ca⁺² en el medio de cultivo. En un primer intento por evaluar la eventual importancia de ésta toxina en la muerte celular estudiamos los efectos citotóxicos de una cepa salvaje de *B. pertussis* y de una cepa isogénica deficiente en CyaA. En la Figura 5 se observa que *B. pertussis* también es citotóxica y origina una tasa de muerte celular aún mayor que *B. parapertussis*. Esta citotoxicidad se revierte en la cepa deficiente en CyaA en la cual no se observa actividad citotóxica aún 72 horas post-infección. *B. pertussis* tiene otra toxina muy potente que *B. parapertussis* no expresa que es la PTx, implicada en diferentes procesos de intoxicación de las células hospedadoras. Para descartar la eventual contribución de esta toxina en el efecto observado con *B. pertussis* se empleó una cepa de *B. pertussis* deficiente en la expresión de esta toxina y se evaluó su actividad citotóxica. Según se puede observar en la Figura 5, la infección con la cepa de *B. pertussis* deficiente en la expresión de PTx induce niveles de muerte similares al observado por la cepa salvaje, indicando que este factor de virulencia no está involucrado en los efectos citotóxicos. Este resultado sugiere que CyaA está involucrada en la citotoxicidad de las células epiteliales. Al momento de la redacción de este manuscrito estamos construyendo un mutante de *B. parapertussis* deficiente en CyaA para confirmar el rol de esta toxina en la patogénesis de esta especie.

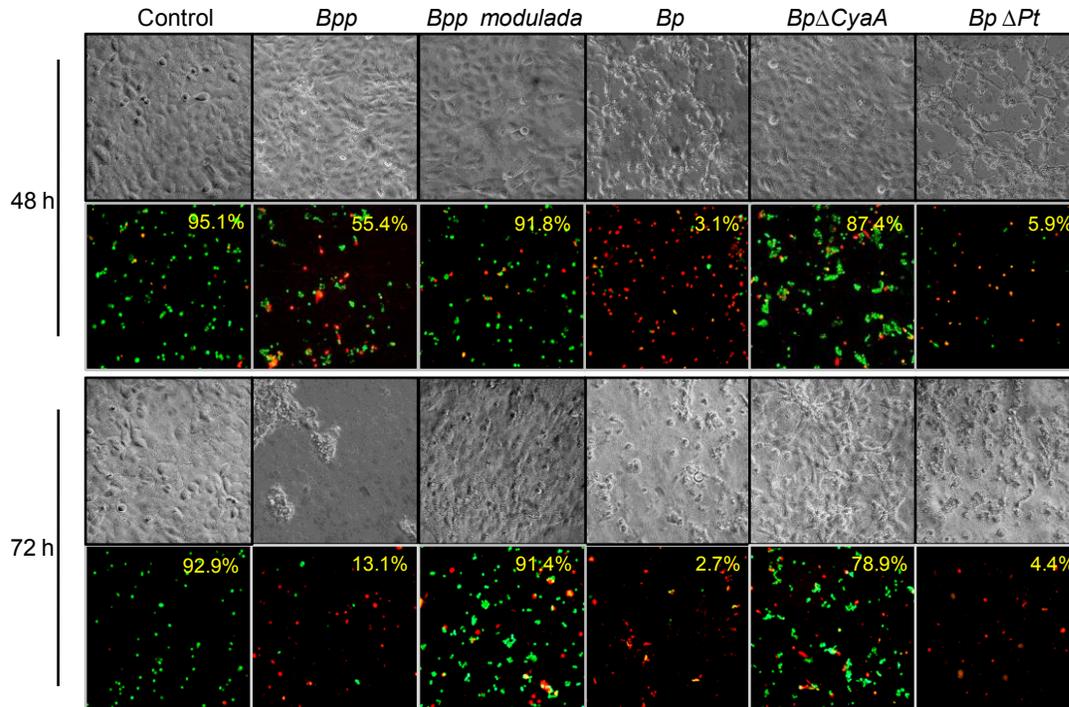


Fig. 5 Efecto citotóxico de *B. parapertussis* sobre las células 16HBE14o-. Células 16HBE14o- sin infectar o infectadas con *B. parapertussis* en fase virulenta (*Bpp*), *B. parapertussis* en fase avirulenta (*Bpp modulada*), *B. pertussis* cepa salvaje (*Bp*), *B. pertussis* deficiente en la expresión de CyaA (*Bp*Δ*CyaA*) o *B. pertussis* deficiente en la expresión de PTx (*Bp*Δ*Pt*) (MDI: 10) fueron incubadas durante 4 horas a 37°C, lavadas para eliminar las bacterias no adheridas y tratadas con polimixina B 100 μg/ml para inactivar bacterias extracelulares. Posteriormente las células fueron incubadas en medio sin suplementar con antibiótico hasta la finalización del ensayo. El número de células vivas y muertas fue determinado a diferentes tiempos post-infección (48 y 72 horas) por marcación con SYTO 9 (verde) para las células vivas y yoduro de propidio (rojo) para las células muertas. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células viables a los diferentes tiempos post-infección. Los datos representan la media ± DE de al menos tres experimentos independientes. Se muestran imágenes representativas de uno de tres experimentos independientes.

4.3.5 La infección de células epiteliales con *B. parapertussis* no induce la liberación de IL-8 al medio extracelular

La infección del epitelio respiratorio generalmente induce una respuesta proinflamatoria en las células epiteliales que, eventualmente, contribuye a controlar la infección. Una de las principales citoquinas proinflamatoria liberadas por las células epiteliales en respuesta a la interacción con patógenos es la IL-8. Para estudiar si *B.*

parapertussis induce la liberación de esta citoquina durante la infección de células epiteliales, células 16HBE14o- fueron infectadas durante 4 horas con *B. parapertussis*, lavadas para eliminar las bacterias no adheridas e incubadas en presencia de polimixina B (100 µg/ml) y luego incubadas en medio suplementado con polimixina B 5 µg/ml hasta la finalización del ensayo. A las 24 horas post-infección, los medios sobrenadantes fueron procesados para eliminar las células y bacterias que pudiera contener y los niveles de IL-8 fueron determinados mediante ELISA. Dado que estudios recientes de nuestro grupo determinaron que en el caso de *B. pertussis* la expresión de IL-8 por células epiteliales es inhibida por CyaA (datos aun no publicados), se incluyó como control positivo de la liberación de IL-8 el sobrenadante de células 16HBE14o- infectadas con un mutante de *B. pertussis* deficiente en la expresión de CyaA y la cepa salvaje isogénica como control negativo. En la Figura 6 se puede observar que la infección de éstas células con *B. parapertussis* no induce niveles de producción de IL-8 diferentes significativamente al control sin infectar. Por el contrario se observa que los niveles de liberación de IL-8 inducidos por infección con *B. pertussis* deficiente en la expresión de CyaA fueron significativamente superiores, confirmando que en las condiciones ensayadas el modelo utilizado tiene la capacidad de liberar esta citoquina (Fig. 6).

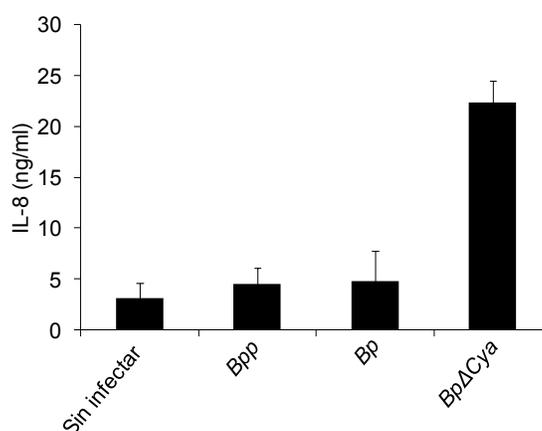


Fig. 6 Producción de IL-8 en células 16HBE14o- por interacción con *B. parapertussis*. Células 16HBE14o- sin infectar o infectadas con una cepa salvaje de *B. parapertussis* (*Bpp*), *B. pertussis* cepa salvaje (*Bp*), o *B. pertussis* deficiente en la expresión de CyaA (*BpΔCya*) (MDI: 10), fueron incubadas durante 4 horas a 37°C, lavadas para eliminar las bacterias no adheridas y tratadas con polimixina B 100 µg/ml para inactivar las bacterias extracelulares. Posteriormente las células fueron incubadas en medio suplementado con polimixina B 5 µg/ml hasta la finalización del ensayo. A las 24 horas post-infección se

determinaron los niveles de IL-8 en los sobrenadantes de las células sin infectar o infectadas, mediante ELISA. Los resultados fueron expresados como concentración de IL-8 (ng/ml) por mililitro de medio sobrenadante. Los datos presentados representan la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes. Los niveles de liberación de IL-8 en sobrenadantes de células infectadas con *B. parapertussis* no muestran diferencias significativas con los niveles encontrados en células sin infectar ($P < 0,05$). El nivel de liberación de IL-8 por células infectadas con la cepa deficiente en la expresión de CyaA difiere significativamente de los niveles encontrados en células infectadas con la cepa salvaje de *B. parapertussis* o con la cepa salvaje de *B. pertussis* ($P < 0,05$).

4.3.6 La infección de células 16HBE14o- con *B. parapertussis* no induce la liberación de citoquinas que determinen la activación de los neutrófilos.

Una de las consecuencias inmediatas de la liberación de citoquinas en el sitio de infección es el reclutamiento y la activación de neutrófilos, lo cual es mediado principalmente por la IL-8 (33, 34), aunque existen otras citoquinas proinflamatorias que se pueden inducir como consecuencia de la interacción de patógenos con las células epiteliales, como son la IL-6 o TNF- α (4, 35), que también pueden intervenir en este proceso. Estudios previos demuestran que en respuesta a estas citoquinas los neutrófilos inician el proceso de NETosis que determina la formación de NETs (36-38). Nuestros resultados muestran que hay bajos niveles de IL-8 en sobrenadantes de células infectadas con *B. parapertussis*. Sin embargo como respuesta a la interacción con patógenos las células pueden liberar otras citoquinas inflamatorias que no se han buscado en este trabajo y podrían influir en las células inmunes. Para evaluar si eventuales factores liberados por las células epiteliales en respuesta a la infección con *B. parapertussis* son capaces de inducir la formación de NETs, neutrófilos humanos fueron incubados con el medio sobrenadante de células 16HBE14o- sin infectar o infectadas con *B. parapertussis* durante 24 horas, y la formación de NETs se evaluó a las 4 horas post-incubación, mediante la tinción con yoduro de propidio y microscopía de fluorescencia según fue detallado anteriormente. Los sobrenadantes ensayados en este apartado se obtuvieron según se describe en el punto 4.3:4. Como control positivo, se determinó en paralelo la inducción de NETs en neutrófilos incubados con el medio sobrenadante de células 16HBE14o- infectadas con una cepa de *B. pertussis* deficiente en CyaA. Según nuestros resultados (aún no publicados) esta cepa induce niveles de IL-8 en el medio sobrenadante que se

encuentran dentro de los valores considerados activadores del proceso de NETosis (>10 ng/ml) (36). Como control negativo se utilizó una cepa salvaje de *B. pertussis*. En la Figura 7 se puede observar que *B. parapertussis* no genera una respuesta en células epiteliales capaz de inducir la formación de NETs en neutrófilos. Algo similar ocurre con la cepa salvaje de *B. pertussis*, mientras que el medio de células epiteliales infectados con la cepa de *B. pertussis* deficiente en CyaA indujo una significativa producción de NETs.

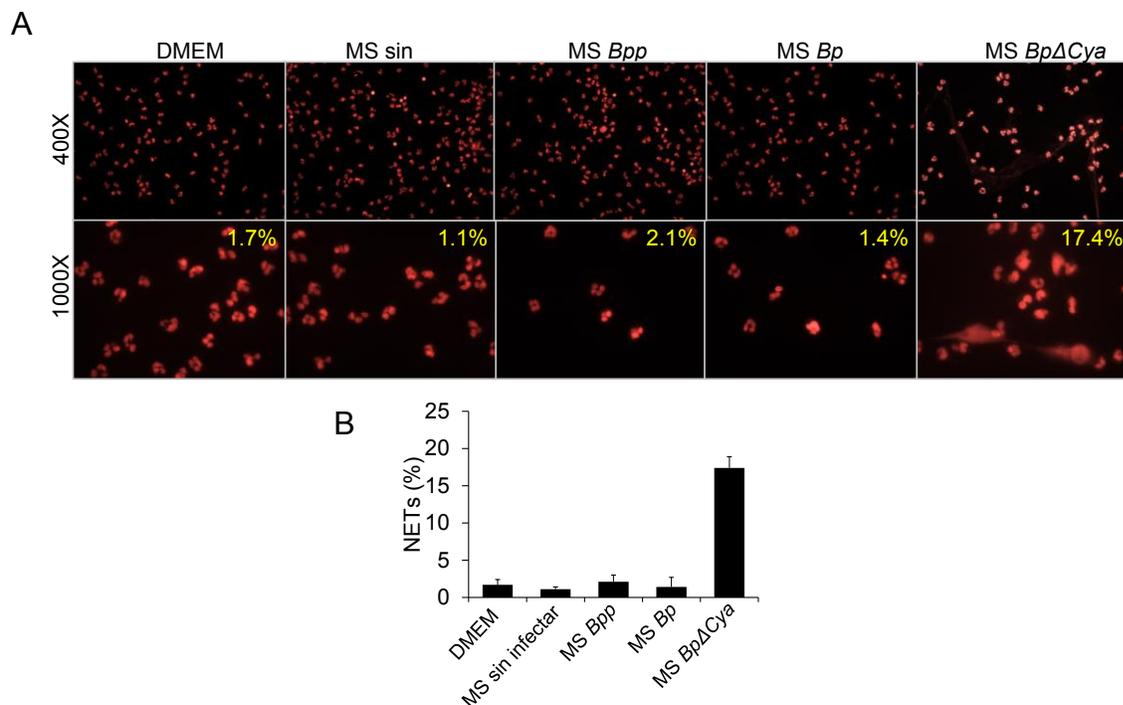


Fig. 7 Producción de citoquinas inductoras de NETs en células epiteliales mediada por *B. parapertussis* (A) Neutrófilos humanos fueron incubados con el medio sobrenadante de células 16HBE14o- obtenido luego de 24 horas de infección con una cepa salvaje de *B. parapertussis* (MS *Bpp*), una cepa salvaje de *B. pertussis* (MS *Bp*), una cepa de *B. pertussis* deficiente en la expresión de CyaA (MS *Bp*ΔCya) (MDI: 10) o sin infectar (MS sin infectar). Como blanco se utilizó medio DMEM + 10% SFB. A las 4 horas post-incubación las células fueron fijadas y el número de NETs formadas se determinó mediante tinción con ioduro de propidio (rojo) y microscopia de fluorescencia. Los resultados se expresaron como el porcentaje de neutrófilos que desarrollaron NETs respecto al total de neutrófilos, a cada tiempo post-infección. Los datos presentados representan la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes utilizando neutrófilos de diferentes donantes. La formación de NETs inducida por el medio sobrenadante de células infectadas con la salvaje de *B. parapertussis* no muestra diferencias significativas con los niveles de formación de NETs observados en neutrófilos incubados con medio sobrenadante de células sin infectar ($P > 0.05$). La inducción de NETs en neutrófilos incubados con el medio sobrenadante de células infectadas con la cepa deficiente en la expresión de CyaA difiere significativamente

de los niveles de formación de NETs observado en neutrófilos incubados con cualquiera de los medios sobrenadantes ensayados ($P < 0,05$). Se muestran imágenes representativas de uno de tres experimentos independientes.

4.3.7 *B. parapertussis* inhibe la formación de NETs inducida por citoquinas liberadas por células del epitelio respiratorio.

Si bien nuestros resultados sugieren que las células epiteliales no generan una respuesta inflamatoria ante la infección con *B. parapertussis*, otros tipos celulares pueden contribuir a la aparición de una respuesta inflamatoria durante el proceso infeccioso. (39, 40). Con el fin de estudiar si *B. parapertussis* es capaz de interferir con la NETosis inducida por la respuesta inflamatoria del epitelio, empleamos el medio sobrenadante de células 16HBE14o- infectadas con la cepa de *B. pertussis* deficiente en la expresión de CyaA, que como vimos anteriormente induce una respuesta inflamatoria que genera NETosis en neutrófilos. Para ello, neutrófilos infectados con *B. parapertussis* durante 30 minutos se incubaron con el medio sobrenadante de células 16HBE14o- infectadas con la cepa de *B. pertussis* deficiente en la expresión de CyaA obtenido según se describe en el punto 4.3.4. Luego de 4 horas los neutrófilos fueron fijados por tratamiento con paraformaldehído, y el número de neutrófilos en los que se indujo NETosis se determinó por tinción con ioduro de propidio y microscopía de fluorescencia. Como control se evaluó en paralelo la formación de NETs en neutrófilos infectados con una cepa salvaje de *B. pertussis* (control negativo) o con *B. pertussis* deficiente en la expresión de CyaA (control positivo) durante 30 minutos, y posteriormente incubados en medio sobrenadante de células infectadas con la cepa de *B. pertussis* deficiente en la expresión de CyaA. Cabe aclarar que *B. pertussis*, a través de CyaA, inhibe la formación de NETs en neutrófilos que han sido expuestos a concentraciones de IL-8 similares a las utilizadas en este ensayo (41). En la Figura 8 se observa que la cepa salvaje de *B. parapertussis* inhibe la formación de NETs inducida por el medio sobrenadante de células infectadas con la cepa de *B. pertussis* deficiente en la expresión de CyaA. Estos resultados demuestran que *B. parapertussis* inhibe la producción de NETs inducida por citoquinas proinflamatorias liberadas por el epitelio.

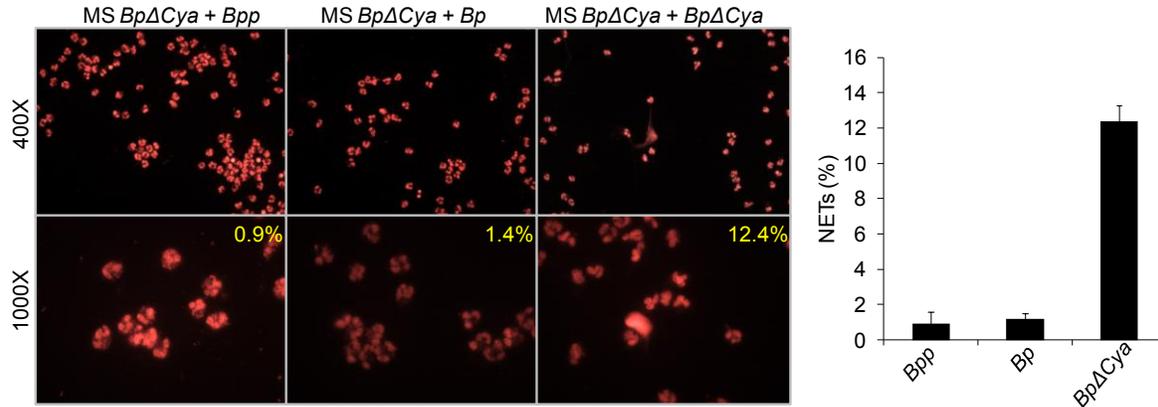


Fig. 8 Efecto de la infección por *B. parapertussis* sobre la formación de NETs inducida por citoquinas proinflamatorias liberadas por células del epitelio respiratorio. Neutrófilos infectados con una cepa salvaje de *B. parapertussis* (*Bpp*), una cepa salvaje de *B. pertussis* (*Bp*) o *B. pertussis* deficiente en la expresión de CyaA (*BpΔCya*) (MDI: 300) fueron incubados durante 30 min a 37°C. Luego los neutrófilos fueron incubados con el medio sobrenadante de células 16HBE14o- infectadas con *BpΔCya* obtenido luego de 24 horas de infección (MS *BpΔCya*). El número de neutrófilos en los que se indujo NETosis se determinó mediante tinción con ioduro de propidio (rojo) y microscopia de fluorescencia. Los resultados se expresaron como el porcentaje de neutrófilos que desarrollaron NETs a las 4 horas posterior a la incubación con el medio respecto al total de neutrófilos. Los datos presentados representan la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes utilizando neutrófilos de diferentes donantes. Se muestran imágenes representativas de uno de tres experimentos independientes. La formación de NETs en neutrófilos infectados con la salvaje de *B. parapertussis* o con la cepa salvaje de *B. pertussis* difiere significativamente de los niveles de formación de NETs observados en neutrófilos infectados con la cepa deficiente en la expresión de CyaA ($P < 0,05$). Se muestran imágenes representativas de uno de tres experimentos independientes.

4.4 Discusión

La capacidad de *B. parapertussis* de colonizar el tracto respiratorio y desarrollar la enfermedad requiere de la adhesión de la bacteria al epitelio respiratorio como paso previo a la colonización. Estudios previos demuestran que los anticuerpos generados por vacunación con la vacuna acelular contra la tos convulsa no interfieren en la adhesión de *B. parapertussis* a células epiteliales (42) y por lo tanto, en el individuo vacunado tanto como en el no inmune el epitelio respiratorio es susceptible a la colonización por *B. parapertussis*. Diferentes patógenos que colonizan las vías respiratorias no solo se adhieren sino que además invaden y sobreviven dentro de células del epitelio respiratorio estableciendo nichos de persistencia. Estudios previos y evidencias clínicas han sugerido que el epitelio respiratorio podría ser un reservorio de bacterias del género *Bordetella* (13). En este estudio evaluamos esta posibilidad empleando sistemas *in vitro* con células epiteliales bronquiales derivadas de pacientes sanos, que han retenido parte de las características de las células que le dieron origen, lo cual favorece la confiabilidad de los resultados.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que *B. parapertussis* es capaz de adherirse e invadir células epiteliales humanas y sobrevivir en localización intracelular. El nivel de sobrevida observado es bajo lo cual sugiere que este entorno intracelular no es tan favorable como, por ejemplo, el que encuentra en macrófagos humanos (ver capítulo 3). Este bajo nivel de sobrevida intracelular puede deberse a múltiples factores, entre ellos la falta de acceso a nutrientes. De cualquier manera el nivel de bacterias vivas dentro de la célula es un balance entre la entrada a la célula hospedadora, la replicación en localización intracelular (si es que existe), la muerte bacteriana, y el egreso de la bacteria al medio extracelular. En este contexto, encontrar bacterias vivas dentro de la célula, con un medio extracelular bactericida por la presencia de antibióticos indica que la bacteria es capaz de sobrevivir en localización intracelular. Este es un resultado muy auspicioso porque significa que *B. parapertussis* puede “escondarse” en el epitelio intracelular como hacen otros patógenos persistentes (8, 43), y mantenerse viable por períodos variables dentro del hospedador tal vez de forma asintomática. Para confirmar la viabilidad de las bacterias intracelulares y su eventual capacidad de reiniciar una infección extracelular diseñamos un experimento que permitió demostrar que desde la localización intracelular *B. parapertussis*

puede pasar al medio extracelular y repoblar el espacio extracelular en muy pocas horas. Esto no ocurre si hay antibióticos en el espacio extracelular, dado que las bacterias son inactivadas ni bien egresan, y tampoco ocurre cuando se inhibe la entrada de la bacteria a las células epiteliales por tratamiento con citocalasina D, lo cual confirma que la repoblación del medio extracelular ocurre a partir de bacterias intracelulares viables. Nuestros resultados demuestran además que estas bacterias que han repoblado el espacio extracelular son capaces de reinfectar las células epiteliales, ingresar y sobrevivir dentro de ellas, aumentando así el número de células infectadas y los niveles de bacterias intracelulares viables dentro de las células epiteliales. Cabe suponer que un fenómeno de estas características podría ocurrir *in vivo* en donde un cierto número de bacterias intracelulares viables aseguran la persistencia dentro del hospedador. Para que esto ocurra es muy importante que la interacción con la célula epitelial no dispare una respuesta proinflamatoria. El epitelio respiratorio no solo constituye una barrera anatómica para los patógenos, en respuesta a estos las células epiteliales desencadenan una respuesta inflamatoria orientada al control de la infección a través de la activación y el reclutamiento de células inmunes y la producción de citoquinas y quimioquinas (1-4, 35). Nuestros resultados demuestran que la interacción de *B. parapertussis* con células 16HBE14o- no induce una expresión significativa de IL-8, una de los efectores más importantes de la repuesta proinflamatoria. Según pudimos determinar esta inhibición de la respuesta proinflamatoria podría estar vinculada a algún factor de virulencia. Resultados preliminares permiten suponer que es el factor de virulencia CyaA el que está involucrado en los efectos inhibitorios observados.

Nuestros resultados demuestran que los niveles de IL-8 generados por células 16HBE14o- en respuesta a la infección con *B. parapertussis* no inducen niveles significativos de formación de NETs. Además de IL-8 las células epiteliales responden a la interacción con patógenos liberando otras citoquinas importantes, entre las que se encuentran la IL-6 y TNF- α , ambas también relacionadas con la activación y el reclutamiento de neutrófilos (4, 35, 44). Dado que la incubación de neutrófilos con el medio sobrenadante de células 16HBE14o- infectadas con *B. parapertussis* no indujo la formación de NETs, concluimos que *B. parapertussis* no induce la liberación de ninguna de

estas citoquinas proinflamatorias o al menos no en los niveles necesarios para inducir el proceso de NETosis.

Si bien nuestros resultados demuestran que no hay inducción de respuesta proinflamatoria en células epiteliales en respuesta a la interacción con *B. parapertussis* estudios previos en modelo murino demuestran que la infección con *B. parapertussis* determina la inducción de TNF- α y de la quimiocina derivada de queratinocitos (KC), un análogo de la IL-8 en ratones, en las vías respiratorias del hospedador. Nuestros resultados demuestran que la infección de neutrófilos con *B. parapertussis* inhibe la formación de NETs en respuesta a la incubación con el medio sobrenadante de células 16HBE14o-infectadas con *B. pertussis* deficiente en la expresión de CyaA que demostró inducir una significativa generación de NETosis en neutrófilos sin infectar, posiblemente mediada por IL-8 u otras citoquinas. Este resultado indica que aún en un entorno proinflamatorio causado por ella misma o algún otro factor presente en el sitio de infección, *B. parapertussis* inhibe la formación de NETs propiciando su propia persistencia.

Los resultados presentados en este capítulo muestran la habilidad de *B. parapertussis* para sobrevivir dentro del tracto respiratorio, posiblemente mediante la alternancia entre estadios intracelulares y extracelulares, inhibiendo la respuesta inflamatoria de las células epiteliales, lo cual en última instancia evita el reclutamiento y activación de las principales células bactericidas del sistema inmune, e incluso inhibiendo la actividad extracelular bactericida de neutrófilos aún en entornos proinflamatorios. La suma de estos resultados indica que efectivamente el epitelio respiratorio podría ser un reservorio de este patógeno.

4.5 Referencias

1. Koyama S, Sato E, Nomura H, Kubo K, Miura M, Yamashita T, Nagai S, and Izumi T. 2000. The potential of various lipopolysaccharides to release IL-8 and G-CSF. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 278:L658-666.
2. Mayer AK, Muehmer M, Mages J, Gueinzius K, Hess C, Heeg K, Bals R, Lang R, and Dalpke AH. 2007. Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells. *J Immunol.* 178:3134-3142.
3. Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, and Schleimer RP. 2004. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 31:358-364.
4. Khair OA, Davies RJ, and Devalia JL. 1996. Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells. *Eur Respir J.* 9:1913-1922.
5. Higgs R, Higgins SC, Ross PJ, and Mills KH. 2012. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunol.* 5:485-500.
6. Lamberti Y, Gorgojo J, Massillo C, and Rodriguez ME. 2013. *Bordetella pertussis* entry into respiratory epithelial cells and intracellular survival. *Pathog Dis.* 69:194-204.
7. Yavlovich A, Tarshis M, and Rottem S. 2004. Internalization and intracellular survival of *Mycoplasma pneumoniae* by non-phagocytic cells. *FEMS Microbiol Lett.* 233:241-246.
8. Martin DW, and Mohr CD. 2000. Invasion and intracellular survival of *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun.* 68:24-29.
9. Morey P, Cano V, Marti-Llitas P, Lopez-Gomez A, Regueiro V, Saus C, Bengoechea JA, and Garmendia J. 2011. Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells. *Microbiology.* 157:234-250.
10. Bermudez LE, and Goodman J. 1996. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun.* 64:1400-1406.
11. Hall JD, Craven RR, Fuller JR, Pickles RJ, and Kawula TH. 2007. *Francisella tularensis* replicates within alveolar type II epithelial cells in vitro and in vivo following inhalation. *Infect Immun.* 75:1034-1039.
12. Russell BH, Vasan R, Keene DR, Koehler TM, and Xu Y. 2008. Potential dissemination of *Bacillus anthracis* utilizing human lung epithelial cells. *Cell Microbiol.* 10:945-957.
13. Mattoo S, and Cherry JD. 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev.* 18:326-382.
14. Cozens AL, Yezzi MJ, Kunzelmann K, Ohri T, Chin L, Eng K, Finkbeiner WE, Widdicombe JH, and Gruenert DC. 1994. CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 10:38-47.

15. Bucior I, Mostov K, and Engel JN. 2010. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated damage requires distinct receptors at the apical and basolateral surfaces of the polarized epithelium. *Infect Immun.* 78:939-953.
16. Fleiszig SM, Evans DJ, Do N, Vallas V, Shin S, and Mostov KE. 1997. Epithelial cell polarity affects susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* invasion and cytotoxicity. *Infect Immun.* 65:2861-2867.
17. Winton HL, Wan H, Cannell MB, Gruenert DC, Thompson PJ, Garrod DR, Stewart GA, and Robinson C. 1998. Cell lines of pulmonary and non-pulmonary origin as tools to study the effects of house dust mite proteinases on the regulation of epithelial permeability. *Clin Exp Allergy.* 28:1273-1285.
18. Cunniffe C, Ryan F, Lambkin H, and Brankin B. 2012. Expression of tight and adherens junction proteins in cervical neoplasia. *Br J Biomed Sci.* 69:147-153.
19. Allen A, and Maskell D. 1996. The identification, cloning and mutagenesis of a genetic locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 19:37-52.
20. Preston A, Allen AG, Cadisch J, Thomas R, Stevens K, Churcher CM, Badcock KL, Parkhill J, Barrell B, and Maskell DJ. 1999. Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in bordetellae. *Infect Immun.* 67:3763-3767.
21. Weiss AA, Melton AR, Walker KE, Andraos-Selim C, and Meidl JJ. 1989. Use of the promoter fusion transposon Tn5 lac to identify mutations in *Bordetella pertussis* vir-regulated genes. *Infect Immun.* 57:2674-2682.
22. Weiss AA, Hewlett EL, Myers GA, and Falkow S. 1983. Tn5-induced mutations affecting virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 42:33-41.
23. Deora R, Bootsma HJ, Miller JF, and Cotter PA. 2001. Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol Microbiol.* 40:669-683.
24. Heininger U, Cotter PA, Fescemyer HW, Martinez de Tejada G, Yuk MH, Miller JF, and Harvill ET. 2002. Comparative phenotypic analysis of the *Bordetella parapertussis* isolate chosen for genomic sequencing. *Infect Immun.* 70:3777-3784.
25. Wolfe DN, Goebel EM, Bjornstad ON, Restif O, and Harvill ET. 2007. The O antigen enables *Bordetella parapertussis* to avoid *Bordetella pertussis*-induced immunity. *Infect Immun.* 75:4972-4979.
26. Rodriguez ME, Hellwig SM, Hozbor DF, Leusen J, van der Pol WL, and van de Winkel JG. 2001. Fc receptor-mediated immunity against *Bordetella pertussis*. *J Immunol.* 167:6545-6551.
27. Hellwig SM, van Oirschot HF, Hazenbos WL, van Spriel AB, Mooi FR, and van De Winkel JG. 2001. Targeting to Fcγ receptors, but not CR3 (CD11b/CD18), increases clearance of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis.* 183:871-879.
28. Zhang X, Goebel EM, Rodriguez ME, Preston A, and Harvill ET. 2009. The O antigen is a critical antigen for the development of a protective immune response to *Bordetella parapertussis*. *Infect Immun.* 77:5050-5058.

29. Lee CK, Roberts AL, Finn TM, Knapp S, and Mekalanos JJ. 1990. A new assay for invasion of HeLa 229 cells by *Bordetella pertussis*: effects of inhibitors, phenotypic modulation, and genetic alterations. *Infect Immun.* 58:2516-2522.
30. Van den Herik-Oudijk IE, Capel PJ, van der Bruggen T, and Van de Winkel JG. 1995. Identification of signaling motifs within human Fc gamma RIIa and Fc gamma RIIb isoforms. *Blood.* 85:2202-2211.
31. Eby JC, Gray MC, Warfel JM, Paddock CD, Jones TF, Day SR, Bowden J, Poulter MD, Donato GM, Merkel TJ, and Hewlett EL. 2013. Quantification of the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* in vitro and during respiratory infection. *Infect Immun.* 81:1390-1398.
32. Hybiske K, and Stephens RS. 2007. Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:11430-11435.
33. Detmers PA, Lo SK, Olsen-Egbert E, Walz A, Baggiolini M, and Cohn ZA. 1990. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med.* 171:1155-1162.
34. Petersen F, Van Damme J, Flad HD, and Brandt E. 1991. Neutrophil-activating polypeptides IL-8 and NAP-2 induce identical signal transduction pathways in the regulation of lysosomal enzyme release. *Lymphokine Cytokine Res.* 10:35-41.
35. Khair OA, Devalia JL, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Tarraf H, and Davies RJ. 1994. Effect of *Haemophilus influenzae* endotoxin on the synthesis of IL-6, IL-8, TNF-alpha and expression of ICAM-1 in cultured human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J.* 7:2109-2116.
36. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, and Zychlinsky A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 303:1532-1535.
37. Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, Kothari N, Kohli M, Bogra J, Barthwal MK, and Dikshit M. 2012. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS One.* 7:e48111.
38. Joshi MB, Lad A, Bharath Prasad AS, Balakrishnan A, Ramachandra L, and Satyamoorthy K. 2013. High glucose modulates IL-6 mediated immune homeostasis through impeding neutrophil extracellular trap formation. *FEBS Lett.* 587:2241-2246.
39. Mann PB, Wolfe D, Latz E, Golenbock D, Preston A, and Harvill ET. 2005. Comparative toll-like receptor 4-mediated innate host defense to *Bordetella* infection. *Infect Immun.* 73:8144-8152.
40. Wolfe DN, Buboltz AM, and Harvill ET. 2009. Inefficient Toll-like receptor-4 stimulation enables *Bordetella parapertussis* to avoid host immunity. *PLoS One* 4:e4280.
41. Hewlett EL, Gordon VM, McCaffery JD, Sutherland WM, and Gray MC. 1989. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Identification and purification of the holotoxin molecule. *J Biol Chem.* 264:19379-19384.

42. van den Berg BM, Beekhuizen H, Mooi FR, and van Furth R. 1999. Role of antibodies against *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to human bronchial epithelial cells. *Infect Immun.* 67:1050-1055.
43. Dubois A, and Boren T. 2007. *Helicobacter pylori* is invasive and it may be a facultative intracellular organism. *Cell Microbiol* 9:1108-1116.
44. Devalia JL, Campbell AM, Sapsford RJ, Rusznak C, Quint D, Godard P, Bousquet J, and Davies RJ. 1993. Effect of nitrogen dioxide on synthesis of inflammatory cytokines expressed by human bronchial epithelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 9:271-278.

CAPITULO 5

Discusión General

5. Discusión General

A pesar de las altas tasas de vacunación, la incidencia de la tos convulsa ha ido en aumento en los últimos años (1, 2) lo cual determinó que la Organización Mundial de la Salud la declare una enfermedad reemergente. Se cree que uno de los factores que han contribuido a esta reemergencia es el aumento de la incidencia de *B. parapertussis* en la enfermedad, que coincide con el remplazo de la vacuna celular por la vacuna acelular, ambas contra *B. pertussis* (3-5). La vacuna celular históricamente empleada contra *B. pertussis* consiste en células enteras muertas por calor y confiere algún grado de protección contra *B. parapertussis* fundamentalmente por la inducción de anticuerpos anti-LPS. En cambio, la vacuna acelular introducida en la década del 80, formulada con factores de virulencia purificados expresados por *B. pertussis* comunes a ambas especies, no induce protección alguna contra *B. parapertussis* (4, 6). Esta falta de protección cruzada es debido a la presencia del antígeno O en la molécula de lipopolisacarido de *B. parapertussis*, que ejerce un efecto de apantallamiento impidiendo el reconocimiento de estos antígenos en la superficie de la bacteria (7, 8). Por lo tanto no hay anticuerpos opsonizantes contra *B. parapertussis* en el vacunado y el control de este patógeno dependerá fundamentalmente de la inmunidad innata. Estudios previos en modelos murinos sugieren que la inmunidad innata no es suficiente y que la eliminación de la bacteria requiere mecanismos celulares bactericidas mediados por anticuerpos específicos (9). Aunque el modelo murino es muy discutido por tratarse de un patógeno estrictamente humano, la situación epidemiológica parece sustentar esta conclusión. Desde la introducción de la vacuna acelular el rango etario de incidencia de esta enfermedad infecciosa ha cambiado. Hoy se reconoce que adolescentes y adultos, son reservorio y fuente de contagio de individuos susceptibles, sugiriendo la existencia de portadores sanos y mecanismos de inmunoevasión que lo posibilitan (10, 11). Este cuadro epidemiológico se ha observado en ambas especies causales de la tos convulsa. En lo que se refiere a *B. parapertussis* se ha documentado la existencia de períodos transitorios o prolongados de infección asintomática (10, 11), esto junto a la aparición de casos aislados en poblaciones sanas sin foco de contagio evidente y teniendo en cuenta que se trata de un patógeno cuyo único reservorio es el hombre, sustenta la hipótesis de la existencia de nichos de persistencia dentro del hospedador. La

observación de que es necesaria una respuesta tanto celular como humoral para la eliminación de este patógeno sugiere que *B. parapertussis* podría tener una fase intracelular durante su ciclo infeccioso (9), aunque nada se sabe de la eventual localización de la bacteria durante estos períodos. Para el control de esta enfermedad y el diseño de estrategias preventivas es imprescindible conocer los mecanismos que contribuyen a la persistencia de este patógeno en el hospedador. En este contexto se enmarcó este trabajo de tesis dirigido básicamente al estudio de la interacción innata de *B. parapertussis* con los principales tipos celulares presentes en el sitio de infección, esto es, células epiteliales respiratorias y células inmunes encargadas del control de patógenos. Se estudió la evolución de esta interacción en presencia y ausencia de anticuerpos específicos en relación al eventual establecimiento de nichos de persistencia. Debido a la falta de un modelo animal aceptable todos los estudios se llevaron a cabo *in vitro* con células humanas primarias, cuando fue posible, para maximizar la confiabilidad de los resultados obtenidos.

Los estudios con neutrófilos humanos demostraron que en ausencia de anticuerpos *B. parapertussis* no solo escapa a los mecanismos bactericidas de estas células sino que sobrevive en localización intracelular. La evasión de los mecanismos bactericidas está determinada principalmente por el antígeno O expresado por *B. parapertussis*. La importancia de este factor de virulencia en la patogenicidad de esta bacteria ya ha sido reconocida en estudios previos, en donde se demuestra que el antígeno O es una molécula fundamental en la colonización del huésped por *B. parapertussis* (12, 13). Aunque esta particularidad ha sido asociada principalmente con la evasión de la activación de la cascada de complemento en ausencia de anticuerpos (12, 13), nuestros resultados demuestran que el antígeno O podría contribuir a la colonización mediante la evasión de los mecanismos bactericidas del neutrófilo. El antígeno O dirige la bacteria hacia las balsas lipídicas de la membrana plasmática del neutrófilo sitio por el cual es fagocitada. Al igual que para otros patógenos, la entrada a través de estos sitios determina una ventaja para la bacteria (14) ya que evita la generación de la respuesta oxidativa y la fusión fagolisosomal permitiendo la sobrevivencia de este patógeno en localización intracelular. Un gran porcentaje de bacterias fagocitadas a través de estos dominios (60%) permanecen viables en compartimientos endosomales con acceso a la vía de reciclaje sugiriendo la existencia de intercambio de material con endosomas de esta vía, garantizando el acceso de *B. parapertussis* a nutrientes

en localización intracelular. El antígeno O está involucrado, además, en la inhibición de la apoptosis del neutrófilo lo que podría contribuir a la persistencia de esta bacteria al prolongar la vida de la célula hospedadora que la ha fagocitado. Esto se ha observado también en la interacción de *Anaplasma phagocytophilum* con neutrófilos. Este patógeno establece inclusive un nicho replicativo dentro del neutrófilo y la inhibición de la apoptosis es crítica en este proceso (15). El antígeno O de *B. parapertussis* no solo está implicado en la inhibición de los mecanismos bactericidas que dependen de la fagocitosis de la bacteria, sino también en el desacoplamiento de la degranulación del neutrófilo de la fagocitosis, evitando la liberación de compuestos bactericidas al medio extracelular. La inhibición de la degranulación se ha observado en otros patógenos como *Mycobacterium Kansai*, que en ausencia de opsoninas interacciona con la célula a través de dominios lipídicos impidiendo la degranulación del neutrófilo (16, 17). El desacoplamiento de la degranulación de la fagocitosis, además de evitar que la liberación de componentes bactericidas al medio extracelular mate aquellas bacterias que no han sido atrapadas por el neutrófilo, disminuye la respuesta inflamatoria del hospedador, dado que el daño causado en los tejidos circundantes por efecto de la degranulación estimularía la respuesta inflamatoria. En este trabajo encontramos que *B. parapertussis* inhibe además otra actividad bactericida importante de los neutrófilos, la formación de trampas de ADN o NETs. Si bien la formación de NETs es desencadenada por la activación del neutrófilo en respuesta a estímulos bacterianos (18) no es inducida en la interacción con *B. parapertussis*. Esto impide la inactivación de bacterias que no hayan sido fagocitadas y contribuye a la sobrevivencia de las bacterias fagocitadas dado que ésta necesita de la viabilidad del neutrófilo para su sobrevivencia en localización intracelular, y la formación de NETs conlleva a la muerte de la célula hospedadora. La presencia de *B. parapertussis* también inhibe la formación de NETs en respuesta a estímulos externos (PMA) en un mecanismo dependiente de la viabilidad de la bacteria. Si bien no pudo ser comprobado en este trabajo, esta inhibición podría depender de la toxina adenilato ciclasa, tal como se ha observado en el caso de *B. pertussis* (19). Esto podría tener importancia en el sitio de infección en donde procesos inflamatorios de distinto origen pueden estar teniendo lugar y la liberación de diferentes citoquinas al medio extracelular podría inducir la formación de NETs.

Un aspecto particularmente importante es que nuestros resultados demuestran que la opsonización de la bacteria con anticuerpos específicos revierte la inhibición de la actividad celular bactericida del neutrófilo. La interacción vía receptores Fc no solo determina que la fagocitosis de *B. parapertussis* sea más eficiente sino también, la inducción de una gran parte de los mecanismos bactericidas del neutrófilo como la degranulación, la generación de ROS, la fusión fagolisosomal y la apoptosis del neutrófilo determinando la eficiente eliminación de la bacteria.

En definitiva nuestros resultados demuestran que *B. parapertussis* es capaz de sobrevivir a la interacción innata con neutrófilos, uno de los tipos celulares más agresivo y más importantes en la defensa contra patógenos bacterianos, y destacan la importancia de la presencia de anticuerpos opsonizantes para controlar la infección. En ausencia de este tipo de anticuerpos en el sitio de infección, tal es el caso de gran parte de la población, *B. parapertussis* no solo evade la acción bactericida de los neutrófilos sino que además estas células podrían constituirse en un nicho de persistencia transitorio que protege a la bacteria de otros mecanismos bactericidas del entorno extracelular y tal vez la vehiculice a sitios más propicios para su desarrollo. La utilización de neutrófilos como nichos transitorios ha sido reportado para diferentes patógenos como es *Chlamydia pneumoniae*, que utiliza esta estrategia para propagar la infección hacia otros tipos celulares mientras se protege de los componentes bactericidas extracelulares (20), o *Leishmania major*, que sobrevive en localización intracelular en neutrófilos que luego son fagocitados por macrófagos en donde la bacteria replica intracelularmente e induce la liberación de citoquinas antiinflamatorias que favorecen la persistencia (21, 22).

La capacidad de *B. parapertussis* de sobrevivir a la interacción innata con neutrófilos y permanecer en localización intracelular motivó el estudio de la interacción de *B. parapertussis* con macrófagos humanos el otro tipo celular importante en el sitio de infección. Estas células, constituyen un nicho de persistencia intracelular de varios patógenos de difícil erradicación, (23-26). Su vida media relativamente larga permite el establecimiento de infecciones intracelulares posibilitando la diseminación de la bacteria dentro del hospedador y hacia otros individuos. Debido a la participación activa de los macrófagos en la modulación de la respuesta adaptativa, el establecimiento de infecciones intracelulares permite además que estas bacterias intervengan de algún modo en la

modulación de la respuesta inmune del hospedador (27). Nuestros resultados sugieren que *B. parapertussis* podría establecer este tipo de nichos de persistencia en el hospedador sobreviviendo dentro de macrófagos. Si bien luego de 48 horas de infección una gran proporción de macrófagos ha logrado eliminar a *B. parapertussis*, un porcentaje significativo (14%) de estos contiene un gran número de bacterias viables (>10) en localización intracelular que se encuentran en compartimientos con características de endosoma temprano y con acceso a nutrientes esenciales a través de la vía de reciclaje de la célula hospedadora. El número de bacterias intracelulares observado a este tiempo es superior al número de bacterias que se encontraban en localización intracelular inicialmente, y dado que el medio extracelular está suplementado con antibióticos, el aumento en el número de bacterias intracelulares sugiere la replicación de la bacteria en localización intracelular. Las causas que determinan que a las 48 horas posteriores a la infección solo una fracción de la totalidad de macrófagos contenga bacterias vivas en localización intracelular aún están en estudio. Sin embargo esta situación podría ser consistente con la regulación diferencial de determinados factores de virulencia durante el proceso infeccioso que determine una ventaja de algunas bacterias sobre otras, o con la existencia de diferentes poblaciones de macrófagos que difieran en el grado de permisividad para la sobrevivencia de bacterias intracelulares (28). El establecimiento de infecciones intracelulares en macrófagos con un fenotipo más permisivo se ha observado en patógenos tales como *Brucella spp.* y *Salmonella typhimurium* (29, 30). Las infecciones intracelulares así establecidas pueden determinar la cronicidad de la infección (30-32). En general la polarización de macrófagos ocurre como resultado de la interacción de la célula con factores bacterianos y citoquinas presentes en el medio. Se ha observado que la interacción de *B. parapertussis* con macrófagos induce la liberación de IL-10 al medio extracelular (33), una de las citoquinas antiinflamatorias que dirigen la polarización de macrófagos hacia un perfil más permisivo (34), y probablemente contribuyan a la polarización hacia este fenotipo.

Al igual que en la interacción con neutrófilos el antígeno O de *B. parapertussis* tiene un rol determinante en la sobrevivencia intracelular de ésta bacteria en macrófagos humanos al dirigir a la bacteria hacia los dominios lipídicos en la membrana del macrófago por donde ingresa a la célula. Los dominios lipídicos no solo son utilizados como un sitio

de entrada a la célula. Los estudios con flotilina demuestran que las balsas lipídicas son retenidas o reclutadas en la membrana del fagosoma durante el tránsito intracelular de la bacteria. El reclutamiento de balsas lipídicas en el fagosoma mediada por el antígeno O durante el tráfico intracelular ha sido sugerido como el mecanismo responsable de la evasión de la vía degradativa y la supervivencia bacteriana en localización intracelular (35-39). Nuestros resultados indican que *B. parapertussis* emplea un mecanismo de este tipo para inhibir la fusión fagolisosomal y muestran evidencia de que efectivamente el reclutamiento de balsas lipídicas en el fagosoma interviene en esta inhibición. Empleando microscopía confocal, marcación de balsas lipídicas con anticuerpos anti-flotilina, marcación fluorescente de bacterias vivas, marcación fluorescente de bacterias totales, marcación de lisosomas y marcación con transferrina, pudimos observar que las bacterias intracelulares viables se encuentran fuera de los compartimientos lisosomales, en endosomas con membranas enriquecidas en balsas lipídicas 48 horas después de la infección, dentro de las cuáles tiene acceso a nutrientes.

Estos resultados sugieren que *B. parapertussis* se comporta como un microorganismo intracelular facultativo, capaz de permanecer viable en localización intracelular en macrófagos por períodos de tiempo prolongados. El antígeno O es fundamental en este proceso dado que determina la evasión de las funciones bactericidas de la célula inmune permitiéndole a la bacteria permanecer en localización intracelular y posiblemente desarrollar una infección asintomática. Estos estudios junto a los estudios de la interacción de *B. parapertussis* con neutrófilos reflejan la importancia del antígeno O, para instrumentar la evasión de los mecanismos bactericidas del sistema inmune y permitir la eficiente colonización del huésped. Estudios anteriores habían mostrado la importancia de este antígeno en la colonización del huésped (12, 13) pero las bases moleculares no estaban esclarecidas

En base a estos resultados, podría esperarse que si *B. parapertussis* ingresa en un hospedador no inmune evada la acción bactericida de los neutrófilos, también la acción bactericida de los macrófagos, aunque en menor medida, pero con el resultado de que aquellas bacterias que sobrevivan a la acción bactericida de los macrófagos en localización intracelular permanecerán viables en fagosomas con características de endosomas

replicativos, con acceso a nutrientes, y protegidas del entorno hostil del hospedador, hasta que las condiciones sean favorables para su propagación

En lo que se refiere a la interacción con células del epitelio respiratorio nuestros resultados demuestran que *B. parapertussis* es capaz de adherirse e invadir células epiteliales humanas, sobrevivir en localización intracelular y desde ahí repoblar el medio extracelular. Si bien los resultados no parecen indicar que este tipo celular pudiera ser un nicho replicativo no se puede descartar que constituya un nicho de persistencia como se ha demostrado en otros patógenos que, si bien no replican en células epiteliales, el período intracelular en este tipo de células parece crucial para su ciclo infeccioso. Tal es el caso de, por ejemplo, *Helicobacter pylori* y *Streptococcus Grupo B* (24, 40). Se puede especular que de esta manera *B. parapertussis* aumenta su capacidad de infección y la posibilidad de infectar diferentes zonas dentro del hospedador o quedar libre en localización extracelular favoreciendo su propia transmisión hacia otro hospedador. En conjunto los resultados de este trabajo parecen indicar que *B. parapertussis* puede alternar entre estadios intracelulares y extracelulares, que posiblemente contribuyan a la evasión de los sistemas de vigilancia inmune y, en definitiva a la propagación de la bacteria en una población no inmune.

Nuestros resultados también muestran que la infección de células epiteliales con *B. parapertussis* no induce niveles significativos de IL-8, una de las principales citoquinas proinflamatorias (41, 42). La IL-8 está involucrada en el reclutamiento y la activación de neutrófilos. La inhibición de la producción de IL-8 podría contribuir a la permanencia de esta bacteria en el hospedador. Este resultado se suma al retraso en el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección observado en ratones debido a la baja estimulación de TLR-4 por el LPS de *B. parapertussis* durante los primeros días después de la infección (43, 44), que determina el crecimiento de la bacteria y la colonización de las vías respiratorias. Si bien las células epiteliales pueden responder a la interacción con patógenos liberando IL-6 y TNF- α , ambas relacionadas con la activación y el reclutamiento de neutrófilos (45-47), nuestros resultados sugieren que *B. parapertussis* no induce estas citoquinas en la interacción con células epiteliales o al menos no en niveles suficientes como para disparar las funciones bactericidas de las células inmunes. Los ensayos en los que se determinó la inducción de NETs por incubación con los medios sobrenadantes, indican que *B.*

parapertussis no induce la liberación de ninguna citoquina proinflamatoria en niveles que determinen la activación del neutrófilo y lleven a la liberación de NETs.

Si bien nuestros resultados sugieren que las células epiteliales no generan una respuesta inflamatoria ante la infección con *B. parapertussis*, diferentes tipos celulares pueden contribuir a la generación de una respuesta inflamatoria durante el proceso infeccioso (43, 44). Nuestros resultados demuestran que *B. parapertussis* también es capaz de inhibir la formación de NETs en respuesta a citoquinas liberadas por las células del epitelio.

En conclusión los resultados presentados en ésta Tesis Doctoral muestran que en ausencia de anticuerpos específicos *B. parapertussis* es capaz de sobrevivir a la interacción con células inmunes y establecer infecciones intracelulares en más de un tipo celular que podrían constituirse en nichos de persistencia dentro del hospedador. Los resultados indican claramente la necesidad de inducir anticuerpos opsonizantes en el sitio de infección para poder controlar tanto la colonización como el establecimiento de infecciones crónicas. El control de la tos convulsa y la incidencia creciente de esta enfermedad requiere de la formulación de una nueva generación de vacunas que genere protección eficiente no solo contra *B. pertussis* sino también contra *B. parapertussis*.

5.1 Referencias

1. Chiappini E, Stival A, Galli L, and de Martino M. 2013. Pertussis re-emergence in the post-vaccination era. *BMC Infect Dis.* 13:151.
2. Halperin BA, and Halperin SA. 2011. The reemergence of pertussis and infant deaths: is it time to immunize pregnant women? *Future Microbiol.* 6:367-369.
3. Liese JG, Renner C, Stojanov S, and Belohradsky BH. 2003. Clinical and epidemiological picture of *B pertussis* and *B parapertussis* infections after introduction of acellular pertussis vaccines. *Arch Dis Child.* 88:684-687.
4. David S, van Furth R, and Mooi FR. 2004. Efficacies of whole cell and acellular pertussis vaccines against *Bordetella parapertussis* in a mouse model. *Vaccine* 22:1892-1898.
5. CDC. 2002. From the Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis--United States, 1997-2000. *JAMA.* 287:977-979.
6. He Q, Viljanen MK, Arvilommi H, Aittanen B, and Mertsola J. 1998. Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population. *JAMA.* 280:635-637.
7. Wolfe DN, Goebel EM, Bjornstad ON, Restif O, and Harvill ET. 2007. The O antigen enables *Bordetella parapertussis* to avoid *Bordetella pertussis*-induced immunity. *Infect Immun.* 75:4972-4979.
8. Zhang X, Rodriguez ME, and Harvill ET. 2009. O antigen allows *B. parapertussis* to evade *B. pertussis* vaccine-induced immunity by blocking binding and functions of cross-reactive antibodies. *PLoS One.* 4:e6989.
9. Wolfe DN, Kirimanjeswara GS, and Harvill ET. 2005. Clearance of *Bordetella parapertussis* from the lower respiratory tract requires humoral and cellular immunity. *Infect Immun.* 73:6508-6513.
10. Zhang Q, Yin Z, Li Y, Luo H, Shao Z, Gao Y, Xu L, Kan B, Lu S, Zhang Y, Li M, Liu M, Yao P, Zhao Z, and He Q. 2014. Prevalence of asymptomatic *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections among school children in China as determined by pooled real-time PCR: a cross-sectional study. *Scand J Infect Dis.* 46:280-287.
11. He Q, Arvilommi H, Viljanen MK, and Mertsola J. 1999. Outcomes of *Bordetella* infections in vaccinated children: effects of bacterial number in the nasopharynx and patient age. *Clin Diagn Lab Immunol.* 6:534-536.
12. Goebel EM, Wolfe DN, Elder K, Stibitz S, and Harvill ET. 2008. O antigen protects *Bordetella parapertussis* from complement. *Infect Immun.* 76:1774-1780.
13. Burns VC, Pishko EJ, Preston A, Maskell DJ, and Harvill ET. 2003. Role of *Bordetella* O antigen in respiratory tract infection. *Infect Immun.* 71:86-94.
14. Manes S, del Real G, and Martinez AC. 2003. Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol.* 3:557-568.

15. Scaife H, Woldehiwet Z, Hart CA, and Edwards SW. 2003. Anaplasma phagocytophilum reduces neutrophil apoptosis in vivo. *Infect Immun.* 71:1995-2001.
16. Cougoule C, Constant P, Etienne G, Daffe M, and Maridonneau-Parini I. 2002. Lack of fusion of azurophil granules with phagosomes during phagocytosis of Mycobacterium smegmatis by human neutrophils is not actively controlled by the bacterium. *Infect Immun.* 70:1591-1598.
17. Peyron P, Bordier C, N'Diaye EN, and Maridonneau-Parini I. 2000. Nonopsonic phagocytosis of Mycobacterium kansasii by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J Immunol.* 165:5186-5191.
18. Brinkmann V, and Zychlinsky A. 2012. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol.* 198:773-783.
19. Eby JC, Gray MC, and Hewlett EL. 2014. Cyclic AMP-mediated suppression of neutrophil extracellular trap formation and apoptosis by the Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. *Infect Immun.* 82:5256-5269.
20. Rupp J, Pfliegerer L, Jugert C, Moeller S, Klinger M, Dalhoff K, Solbach W, Stenger S, Laskay T, and van Zandbergen G. 2009. Chlamydia pneumoniae hides inside apoptotic neutrophils to silently infect and propagate in macrophages. *PLoS One.* 4:e6020.
21. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, and Laskay T. 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. *J Immunol.* 173:6521-6525.
22. Laskay T, van Zandbergen G, and Solbach W. 2003. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* 11:210-214.
23. Das D, and Bishayi B. 2009. Staphylococcal catalase protects intracellularly survived bacteria by destroying H₂O₂ produced by the murine peritoneal macrophages. *Microb Pathog.* 47:57-67.
24. Dubois A, and Boren T. 2007. Helicobacter pylori is invasive and it may be a facultative intracellular organism. *Cell Microbiol.* 9:1108-1116.
25. Thulin P, Johansson L, Low DE, Gan BS, Kotb M, McGeer A, and Norrby-Teglund A. 2006. Viable group A streptococci in macrophages during acute soft tissue infection. *PLoS Med.* 3:e53.
26. Watson RO, and Galan JE. 2008. Campylobacter jejuni survives within epithelial cells by avoiding delivery to lysosomes. *PLoS Pathog.* 4:e14.
27. Rosenberger CM, and Finlay BB. 2003. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:385-396.
28. Benoit M, Desnues B, and Mege JL. 2008. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol.* 181:3733-3739.
29. Eisele NA, Ruby T, Jacobson A, Manzanillo PS, Cox JS, Lam L, Mukundan L, Chawla A, and Monack DM. 2013. Salmonella require the fatty acid regulator

- PPAR δ for the establishment of a metabolic environment essential for long-term persistence. *Cell Host Microbe*. 14:171-182.
30. Roop RM, 2nd, and Caswell CC. 2013. Bacterial persistence: finding the "sweet spot". *Cell Host Microbe*. 14:119-120.
 31. Monack DM, Bouley DM, and Falkow S. 2004. *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nrampl1+/+ mice and can be reactivated by IFN- γ neutralization. *J Exp Med*. 199:231-241.
 32. Roop RM, 2nd, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC, and Martin DW. 2009. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol*. 198:221-238.
 33. Wolfe DN, Karanikas AT, Hester SE, Kennett MJ, and Harvill ET. 2010. IL-10 induction by *Bordetella parapertussis* limits a protective IFN- γ response. *J Immunol*. 184:1392-1400.
 34. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, and Locati M. 2008. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 13:453-461.
 35. Gatfield J, and Pieters J. 2000. Essential role for cholesterol in entry of *Mycobacteria* into macrophages. *Science*. 288:1647-1650.
 36. Lauer S, VanWye J, Harrison T, McManus H, Samuel BU, Hiller NL, Mohandas N, and Haldar K. 2000. Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *Embo J*. 19:3556-3564.
 37. Kim S, Watarai M, Makino S, and Shirahata T. 2002. Membrane sorting during swimming internalization of *Brucella* is required for phagosome trafficking decisions. *Microb Pathog*. 33:225-237.
 38. Ferrari G, Langen H, Naito M, and Pieters J. 1999. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of *Mycobacteria*. *Cell* 97:435-447.
 39. Norkin LC, Wolfrom SA, and Stuart ES. 2001. Association of caveolin with *Chlamydia trachomatis* inclusions at early and late stages of infection. *Exp Cell Res*. 266:229-238.
 40. Rubens CE, Smith S, Hulse M, Chi EY, and van Belle G. 1992. Respiratory epithelial cell invasion by group B streptococci. *Infect Immun*. 60:5157-5163.
 41. Detmers PA, Lo SK, Olsen-Egbert E, Walz A, Baggiolini M, and Cohn ZA. 1990. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med*. 171:1155-1162.
 42. Petersen F, Van Damme J, Flad HD, and Brandt E. 1991. Neutrophil-activating polypeptides IL-8 and NAP-2 induce identical signal transduction pathways in the regulation of lysosomal enzyme release. *Lymphokine Cytokine Res*. 10:35-41.
 43. Mann PB, Wolfe D, Latz E, Golenbock D, Preston A, and Harvill ET. 2005. Comparative toll-like receptor 4-mediated innate host defense to *Bordetella* infection. *Infect Immun*. 73:8144-8152.

44. Wolfe DN, Buboltz AM, and Harvill ET. 2009. Inefficient Toll-like receptor-4 stimulation enables *Bordetella parapertussis* to avoid host immunity. *PLoS One* 4:e4280.
45. Devalia JL, Campbell AM, Sapsford RJ, Rusznak C, Quint D, Godard P, Bousquet J, and Davies RJ. 1993. Effect of nitrogen dioxide on synthesis of inflammatory cytokines expressed by human bronchial epithelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 9:271-278.
46. Khair OA, Davies RJ, and Devalia JL. 1996. Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells. *Eur Respir J.* 9:1913-1922.
47. Khair OA, Devalia JL, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Tarraf H, and Davies RJ. 1994. Effect of *Haemophilus influenzae* endotoxin on the synthesis of IL-6, IL-8, TNF-alpha and expression of ICAM-1 in cultured human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J.* 7:2109-2116.