



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

“Caracterización del fenotipo intracelular de *Bordetella pertussis*. Análisis proteómico e identificación de factores bacterianos involucrados en la persistencia dentro del hospedador”

Tesista: Lic. Juan Hilario Cafiero

Directora: Dra. María Eugenia Rodríguez

Codirectora: Dra. Yanina Andrea Lamberti

Año: 2018

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-CONICET-CCT LA PLATA), FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARÍA EUGENIA RODRÍGUEZ Y LA CO-DIRECCIÓN DE LA DRA. YANINA ANDREA LAMBERTI.

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

Cafiero, J. H., Lamberti, Y. A., Surmann, K., Vecerek, B., Rodriguez, M. E. (2018). “A *Bordetella pertussis* MgtC homolog plays a role in the intracellular survival”. PloS one, 13(8), e0203204.

Lamberti, Y., Cafiero, J. H., Surmann, K., Valdez, H., Holubova, J., Vecerek, B., Sebo, P., Schmidt, F., Völker, U., Rodriguez, M. E. (2016). “Proteome analysis of *Bordetella pertussis* isolated from human macrophages”. Journal of Proteomics, 136, 55-67.

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 (UNLP) Y, EN PARTICULAR, A LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y AL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN FERMETACIONES INDUSTRIALES (CINDEFI) POR HABER HECHO POSIBLE LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.

Agradecimientos

El desarrollo de esta Tesis fue posible gracias a la enorme ayuda tanto profesional como personal de un gran número de personas. Estoy profundamente agradecido con cada una de ellas.

A la Dra. María Eugenia Rodríguez, por haberme guiado en este camino. Gracias por la oportunidad, por tu confianza y dedicación permanente.

A la Dra. Yanina Lamberti, por tu fundamental ayuda en esta etapa, tanto a nivel experimental como emocional.

A mis compañeros y amigos del laboratorio. Gracias por la ayuda y los momentos compartidos. A Julio, por su excelente asistencia técnica que facilitó enormemente el desarrollo experimental de esta Tesis.

Al Dr. Peter Sebo y su grupo, por darme la posibilidad de realizar parte del trabajo experimental en su laboratorio.

Al Dr. Uwe Völker y su grupo, por posibilitar la realización del estudio proteómico.

A mis amigos.

A mi familia. A mis padres, gracias por todo, por ser mi ejemplo de honestidad y perseverancia. A mis hermanos y sobrinos. Los nombraría, pero son un montón.

A Gastón, por ser mi compañero en este viaje.

Lista de Abreviaturas

ABG	Agar Bordet-Gengou sangre
ADNc	ADN complementario
ANOVA	Análisis de varianza
BAF	Bafilomicina A1
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
Bvg ⁱ	Fase intermedia
cAMP	AMP cíclico
CDC	<i>Centers for Disease control and Prevention</i>
c-di-GMP	Diguanilato cíclico
CR3	Receptor de complemento 3
Cy3	Cianina 3
CyaA	Toxina adenilato ciclasa
DC	Célula dendrítica
DE	Desviación estándar
DNT	Toxina dermonecrótica
DO ₆₅₀	Densidad óptica a 650 nm
DTP	Vacuna triple bacteriana celular
DTPa	Vacuna triple bacteriana acelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FHA	Hemaglutinina filamentosa
Fim	Fimbria
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Fur	Regulador transcripcional de captura de hierro
GFP	Proteína verde fluorescente
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
Lf	Lactoferrina
LOS	Lipooligosacárido
LPS	Lipopolisacárido

mAc	Anticuerpo monoclonal
MEM	Medio esencial mínimo
MES	Ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico
Nano-LC MS/MS	Nano cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
NE	Norepinefrina
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco abierto de lectura
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PMN	Leucocito polimorfonuclear
Prn	Pertactina
PT	Toxina pertussis
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
R _i b/c	Número inicial de bacterias por célula
RPMI	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SRM	Monitoreo de reacción seleccionada
SS	Medio líquido de cultivo Stainer-Scholte
SST3	Sistema de secreción de tipo tres
TCT	Toxina citotraqueal
Tdap	Vacuna triple bacteriana acelular formulada con cantidades menores de toxoide diftérico y de antígeno pertussis
Tf	Transferrina
TFD	Tasa de falso descubrimiento
Th	<i>T helper</i>
TLR	Receptor de tipo <i>Toll</i>
UFC	Unidad formadora de colonia
<i>Vag</i>	Genes activados en virulencia
<i>Vrg</i>	Genes reprimidos en virulencia

Índice

1. Introducción	3
1.1. El género <i>Bordetella</i>	3
1.2. Tos convulsa	3
1.3. Manifestaciones clínicas	6
1.3.1. Manifestaciones clásicas	6
1.3.2. Manifestaciones atípicas	7
1.3.2 Infecciones con otras especies de <i>Bordetella</i>	7
1.4. Tratamiento	8
1.5. Factores de virulencia	9
1.5.1. Factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS	9
1.5.1.1. Toxina Pertussis (PT)	9
1.5.1.2. Toxina Adenilato Ciclasa (CyaA)	10
1.5.1.3. Hemaglutinina Filamentosa (FHA)	11
1.5.1.4. Fimbrias (Fim)	13
1.5.1.5. Sistema de Secreción de Tipo III (SST3)	14
1.5.1.6. Pertactina (Prn) y otros autotransportadores	15
1.5.1.7. Toxina Dermonecrotica (DNT)	16
1.5.1.8. Cápsula	17
1.5.2. Regulación por el sistema de dos componentes BvgAS	17
1.5.3. Regulación por el sistema de dos componentes RisA/RisK	22
1.5.4. Regulación por el sistema de dos componentes PlrSR	23
1.5.5. Regulación post transcripcional mediada por la chaperona Hfq	24
1.5.6. Factores de virulencia no regulados por el sistema BvgAS	24
1.5.6.1. Citotoxina Traqueal (TCT)	24
1.5.6.2. Lipooligosacárido (LOS)	25
1.5.7. Sistemas de captura de hierro	26
1.5.7.1. Captura de hierro mediada por sideróforos	27
1.5.7.2. Adquisición de grupos hemo	28
1.5.7.3. Receptores de complejos hierro-catecolaminas	28
1.5.7.4. Captura de hierro en estado ferroso	28
1.6. Vacunación	29
1.7. Epidemiología	34
1.8. Patogénesis	37
1.9. Inmunidad	42
1.10. Antecedentes y objetivos de este trabajo	46

1.11. Referencias.....	49
2. Materiales y métodos.....	71
2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	71
2.1.1. Cultivo en limitación de hierro y detección de sideróforos	72
2.1.2. Cultivo en pH ligeramente ácido.....	73
2.1.3. Cultivo en limitación de magnesio.....	73
2.2. Células y condiciones de cultivo	73
2.3. Anticuerpos y sueros.....	74
2.4. Infección de células	74
2.5. Cuantificación de adhesión y fagocitosis o internalización.....	77
2.6. Análisis de colocalización por microscopía confocal.....	78
2.7. Determinación de bacterias intracelulares viables por hibridación fluorescente <i>in situ</i>	78
2.8. Aislamiento de <i>B. pertussis</i> intracelular	79
2.9. Análisis proteómico de bacterias aisladas de macrófagos humanos.....	80
2.10. Análisis de los datos de proteómica global por MS.....	81
2.11. Adquisición de datos de monitoreo de reacción única (SRM)	84
2.12. Análisis de datos de SRM.....	85
2.13. Construcción de cepas mutantes	86
2.14. Construcción de cepas complementadas.....	90
2.15. Extracción de ARN y RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR).....	91
2.16. Inmunoblot.....	92
2.17. Citometría de flujo	92
2.18. Análisis estadístico	93
2.19. Referencias.....	94
3. Estudio del proteoma de <i>Bordetella pertussis</i> durante su adaptación al entorno intracelular en macrófagos humanos.....	99
3.1 Introducción.....	99
3.2. Resultados y discusión.....	105
3.2.1. <i>B. pertussis</i> es capaz de sobrevivir dentro de las células THP-1	105
3.2.2. Adaptación del proteoma de <i>B. pertussis</i> durante su estadio intracelular ...	110
3.2.3. Análisis de proteínas de <i>B. pertussis</i> que muestran regulación diferencial en el ambiente intracelular	117
3.2.3.1. Respuesta a estrés	117
3.2.3.2. Metabolismo	119
3.2.3.3. Virulencia	121
3.2.3.4. Regulación.....	122
3.2.3.5. Metabolismo de hierro y magnesio	124

3.3. Conclusiones	128
3.4. Referencias.....	129
4. Caracterización del rol de los receptores de hierro BfrD y BfrE en la sobrevida intracelular de <i>B. pertussis</i>.....	175
4.1. Introducción	175
4.2. Resultados.....	180
4.2.1. Obtención de una cepa de <i>B. pertussis</i> defectiva en la expresión de los receptores BfrD y BfrE	180
4.2.2. Construcción de una cepa mutante complementada en la expresión de los receptores BfrD y BfrE	181
4.2.3. Caracterización de la cinética de crecimiento <i>in vitro</i> de las cepas mutante $\Delta bfrDE$ y cepa mutante complementada.....	182
4.2.4. Análisis del rol de los receptores BfrD y BfrE en la sobrevida intracelular de <i>B. pertussis</i> en macrófagos humanos	183
4.2.5. Estudio de la importancia de los receptores BfrD y BfrE en la sobrevida intracelular de <i>B. pertussis</i> en células del epitelio respiratorio	186
4.2.6. Caracterización de señales que inducen la expresión de los receptores BfrD y BfrE	188
4.3. Discusión	191
4.4. Conclusiones.....	201
4.5. Referencias.....	202
5. Análisis del rol del transportador de hierro periplásmico IRP1-3 en la infección intracelular de <i>B. pertussis</i>.....	209
5.1. Introducción	209
5.2. Resultados.....	218
5.2.1. El pH ambiental regula la expresión de los transportadores periplásmicos de hierro en <i>B. pertussis</i>	218
5.2.2. Construcción de una cepa de <i>B. pertussis</i> mutante defectiva en la expresión del receptor IRP1-3	220
5.2.3. Cinética de crecimiento <i>in vitro</i> de la cepa mutante $\Delta irp1-3$	222
5.2.4. Caracterización de la sobrevida intracelular de la cepa $\Delta irp1-3$ en macrófagos humanos	223
5.2.5. Estudio del rol de IRP1-3 en la sobrevida intracelular de <i>B. pertussis</i> en macrófagos estimulados con IFN- γ	225
5.2.6. Efecto de la adaptación a la limitación de hierro sobre la sobrevida intracelular de <i>B. pertussis</i> . Rol de IRP1-3	228
5.2.7. Estudio del rol del transportador IRP1-3 en la sobrevida intracelular de <i>B. pertussis</i> en células del epitelio respiratorio	230
5.2.8. Construcción de una cepa de <i>B. pertussis</i> mutante en IRP1-3 y BfrD/BfrE.....	232
5.2.9. Estudio de la sobrevida intracelular de la cepa $\Delta irp1-3 \Delta bfrDE$ en macrófagos humanos	234

5.2.10. Análisis de la sobrevida intracelular de la cepa $\Delta irp1-3 \Delta bfrDE$ en células del epitelio respiratorio.....	236
5.3. Discusión	239
5.4. Conclusiones.....	246
5.5. Referencias.....	247
6. Estudio del factor MgtC y su contribución en la persistencia intracelular de <i>B. pertussis</i>.....	255
6.1 Introducción	255
6.2. Resultados.....	261
6.2.1. Caracterización bioinformática de MgtC y su región genómica.....	261
6.2.2. Estudio de la expresión de MgtC en <i>B. pertussis</i>	262
6.2.3. Obtención de una cepa mutante en la expresión de MgtC.....	264
6.2.4. Obtención de una cepa complementada en la expresión de MgtC.....	265
6.2.5. Caracterización del rol de MgtC en la sobrevida intracelular de <i>B. pertussis</i> en macrófagos humanos.....	266
6.2.6. Estudio de la contribución de MgtC en el crecimiento de <i>B. pertussis</i> en medios moderadamente ácidos.....	269
6.2.7. Análisis del rol que cumple MgtC en el crecimiento de <i>B. pertussis</i> en condiciones de baja disponibilidad de magnesio	272
6.2.8. Estudio del rol de MgtC en la adaptación de <i>B. pertussis</i> al pH moderadamente ácido del fagosoma	276
6.2.9. Análisis de la sobrevida intracelular de la cepa $\Delta mgtC$ en células del epitelio respiratorio.....	279
6.3. Discusión	282
6.4. Conclusiones.....	288
6.5. Referencias.....	289
7. Discusión general.....	297
7.1. Referencias.....	313

Capítulo 1

Introducción general

1. Introducción

1.1. El género *Bordetella*

El género *Bordetella* es parte de la familia *Alcaligenaceae* de las β -proteobacterias [1] y actualmente comprende dieciséis especies diferentes. Las tres primeras especies que se incluyeron fueron *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*, los agentes causales de la tos convulsa en humanos [2, 3], y *Bordetella bronchiseptica*, que produce infecciones en varios mamíferos y ocasionalmente en humanos, principalmente aquellos que están inmunodeprimidos [4]. Estas tres especies se conocen comúnmente como las especies “clásicas” de *Bordetella*. Asimismo, *B. parapertussis* se subdivide en dos subespecies, una de ellas infecta a humanos (Hu) y la otra a ovinos (Ov) [1]. Los estudios genómicos muestran que *B. pertussis* y *B. parapertussis*_{Hu} evolucionaron a partir de *B. bronchiseptica* en dos eventos independientes [5]. La transición de *B. pertussis* y *B. parapertussis*_{Hu} a patógenos estrictamente humanos estuvo acompañada por la pérdida de un gran número de genes, la acumulación de pseudogenes y la expansión de secuencias de inserción [6]. Más recientemente, se identificaron otras especies también aisladas de humanos del género *Bordetella* (*Bordetella holmesii* [7], *Bordetella trematum* [8], *Bordetella petrii* [9], *Bordetella ansorpii* [10], *Bordetella sputigena* [11], *Bordetella bronchialis* [11] y *Bordetella flabilis* [11]), dos especies patógenas de aves (*Bordetella avium* [12] y *Bordetella hinzii* [13]), una especie aislada de ratones (*Bordetella pseudohinzii* [14]) y tres especies aisladas de muestras ambientales (*Bordetella muralis* [15], *Bordetella tumbae* [15] y *Bordetella tumulicola* [15]).

1.2. Tos convulsa

La tos convulsa es una enfermedad respiratoria severa y sumamente contagiosa causada principalmente por el cocobacilo Gram-negativo *B. pertussis* [1]. Esta bacteria es un patógeno estrictamente humano del cual no se conocen reservorios animales o ambientales. Además de *B. pertussis*, de las nueve especies del género *Bordetella* identificadas, sólo tres, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* y *B. holmesii*, han sido asociadas con infecciones respiratorias en humanos y otros mamíferos [16]. Entre ellas, la única que causa tos convulsa, además de *B. pertussis*, es *B. parapertussis*.

Respecto al origen de la tos convulsa, cabe señalar que no se han encontrado registros que describan una enfermedad con la sintomatología clásica de la tos convulsa en textos médicos de la antigua Grecia y Roma [17]. Asimismo, la tos convulsa no parece haber estado presente en las Américas antes de su aparición en Europa; y se considera que la introducción de la misma en esa región muy probablemente haya sido a través de Asia occidental [17]. Resultados de estudios moleculares han confirmado que, si bien *B. pertussis* tiene varios millones de años de existencia, se expandió rápidamente dentro de la población humana en los últimos 500 años [17]. La primera descripción de una enfermedad con sintomatología similar a la tos convulsa se encuentra en un libro coreano de medicina de 1433 [18]. Posteriormente, Bahā' al-Dawlah Rāzī (1455–1509) describió tres epidemias distintas de tos convulsa ocurridas entre 1484 y 1501 en una región de Persia, actualmente Irán [17]. Aproximadamente 70 años después ocurrió la primera epidemia registrada de tos convulsa en Europa. La misma se originó en París, Francia, en 1578 y fue descrita por Guillaume de Baillou (1538–1616), quien la llamó *tussis* Quintín [19]. Existen descripciones de epidemias frecuentes de tos convulsa en Europa en los siglos XVI y XVII, que sugieren una expansión de la enfermedad [20]. Thomas Sydenham en 1679 y Thomas Willis en 1682 llamaron “*pertussis*” (*per*, intensa; *tussis*, tos) a esta enfermedad que afectaba fundamentalmente a lactantes y niños provocando la muerte en muchos casos. En el año 1906 Jules Bordet y Octave Gengou lograron desarrollar un medio de cultivo que permitió aislar el agente causal de la tos convulsa [2] y posteriormente lograron relacionar la sintomatología de la enfermedad con la presencia de *B. pertussis* [21]. El nombre del género *Bordetella* fue propuesto por Moreno-López en 1952 en reconocimiento al trabajo de Jules Bordet [22].

El desarrollo de vacunas empezó inmediatamente después del aislamiento *B. pertussis* debido al impacto epidémico de la enfermedad. Entre 1914 y 1923, Hess, Luttinger y Madsen realizaron los primeros ensayos exitosos de vacunación anti-pertussis [21] y finalmente, durante la década de 1940-1950, se introdujeron las vacunas celulares, compuestas por microorganismos inactivados por métodos físicos o químicos, de uso actual en algunos países, lo cual redujo drásticamente la incidencia de esta enfermedad. Las reacciones adversas producidas por esta vacuna provocaron una disminución en la aceptación de la vacuna, e incluso algunos países suspendieron la vacunación contra *B. pertussis*, lo que determinó nuevos brotes epidémicos. La baja aceptación de la vacuna

celular condujo a finales del siglo pasado al desarrollo de vacunas de segunda generación acelulares compuestas por antígenos purificados.

La introducción de la vacunación masiva a nivel mundial con la vacuna celular determinó una gran disminución en el número de casos de tos convulsa. Sin embargo, se siguieron registrando picos epidémicos cada 2 a 5 años [23], lo que indica que la inmunización controla la enfermedad, su fase tóxica, pero no controla la circulación del microorganismo en la población. Esta situación ha determinado que la tos convulsa continúe siendo una importante causa de muerte infantil a nivel mundial. Con la introducción de la vacuna acelular se registró un aumento progresivo, lento y sostenido de la incidencia de la tos convulsa. En la década del 90 la mayoría de los países con vigilancia activa detectaron un aumento alarmante en la incidencia de la enfermedad [24-32]. A fines de esa década la tos convulsa se había convertido en la cuarta causa de mortalidad infantil por enfermedades inmunoprevenibles, siendo declarada enfermedad reemergente por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Datos de la OMS indican que en 2008 ocurrieron aproximadamente 16 millones de casos de tos convulsa, el 95% de los cuales fueron en países en vías de desarrollo [33]. En ese mismo año la OMS estimó que la vacunación mundial contra la tos convulsa evitó aproximadamente 687.000 muertes [33]. Estudios actuales basados en modelos epidemiológicos estimaron que en 2014 hubo aproximadamente 24 millones de casos y 160.700 muertes por tos convulsa en niños menores de 5 años, principalmente en la región de África [34]. Aunque la mayor incidencia de casos continúa siendo en infantes, datos epidemiológicos indican un cambio en el rango etario, con un aumento en el número de casos de tos convulsa asintomática o leve en adolescentes y adultos [27, 35]. Así, esta población constituye un reservorio importante y una continua fuente de transmisión para lactantes y niños con esquemas de vacunación incompletos, quienes presentan mayor riesgo de mortalidad [36, 37]. Las causas de la reemergencia de la enfermedad a nivel mundial aún no han sido determinadas, sin embargo, se postula que las formulaciones subóptimas de vacunas (tanto en lo que se refiere a tipo de antígenos como adyuvantes) que inducen un tipo de inmunidad no protectora sumado a la corta duración de anticuerpos específicos por vacunación, ha llevado a la continua circulación de la bacteria en poblaciones vacunadas y a la consiguiente inmunoselección de cepas dirigida por vacunación, causando la situación epidemiológica actual. En este contexto, la implementación de mejoras en las

estrategias de control de esta enfermedad depende básicamente de la identificación de los mecanismos de patogénesis y persistencia de *B. pertussis* en el hospedador.

1.3. Manifestaciones clínicas

Los síntomas de tos convulsa pueden variar, dependiendo de la edad del paciente, la inmunización o infección previa y el tratamiento con antibióticos [1].

1.3.1. Manifestaciones clásicas

Una vez que la bacteria llega al hospedador ocurre un período de incubación de 7 a 10 días, antes del comienzo de la enfermedad [1]. La fase sintomática de la enfermedad dura entre 6 y 12 semanas, aunque este tiempo puede prolongarse, y presenta tres estadios clínicos o fases: catarral, paroxística y convaleciente. Inicialmente, en la etapa catarral, se presenta rinorrea, lagrimeo y tos leve. La tasa de contagio es muy elevada durante esta fase y en las dos primeras semanas después de la aparición de la tos. Durante un período de 7 a 14 días, la tos empeora tanto en frecuencia como en grado. La etapa paroxística, que tiene su inicio durante la segunda semana de la enfermedad, se caracteriza por ataques de tos repetidos con múltiples expectoraciones violentas durante una exhalación simple (paroxismo). Al final de un paroxismo, ocurre un esfuerzo inspiratorio intenso durante el cual sobreviene el clásico graznido que dio nombre a esta enfermedad. En conjunción con un paroxismo, puede producirse cianosis, salivación, lagrimeo y vómitos. Curiosamente, entre los paroxismos, los niños afectados se comportan normalmente sin dificultades respiratorias. La enfermedad clásica ocurre con mayor frecuencia en infecciones de niños no vacunados.

Entre las complicaciones comunes de esta enfermedad se incluyen: neumonía, otitis media, convulsiones, y encefalopatías. La neumonía puede ser un evento primario en respuesta a la infección por *B. pertussis* o puede resultar de una infección secundaria con otros patógenos. Las convulsiones y encefalopatía se deben probablemente a la hipoxia cerebral asociada con los paroxismos severos. La etapa paroxística dura de 2 a 8 semanas. La transición a la etapa convaleciente es gradual y se asocia con una disminución inicial en la frecuencia y gravedad de los paroxismos. La etapa convaleciente generalmente dura de 1 a 2 semanas.

La mayoría de las muertes debidas a la infección por pertussis ocurre en infantes, especialmente durante el primer año de vida. La fuente de infección es frecuentemente un miembro del grupo familiar, tanto adolescente como adulto [38]. La infección neonatal es particularmente grave, con hasta un 3% de riesgo de muerte. En neonatos, el síntoma inicial es con frecuencia apnea, y aunque los bebés tosen, su tos es tan débil que a menudo no es detectada. En infantes, la gravedad de la enfermedad y el riesgo de muerte se correlaciona directamente con la manifestación de leucocitosis [39]. La tos convulsa causa leucocitosis aguda con recuentos mayores a 20.000 células/ μ l, particularidad que la caracteriza, pudiendo alcanzar valores mayores a 100.000 células/ μ l [40]. La leucocitosis puede contribuir a la hipertensión pulmonar observada en infantes críticamente enfermos al bloquear los capilares pulmonares y restringir el flujo sanguíneo [39]. A su vez, la hipertensión pulmonar puede conducir a insuficiencia y *shock* cardíaco, observado frecuentemente en casos fatales de tos convulsa [41].

1.3.2. Manifestaciones atípicas

Entre individuos inmunizados, especialmente adolescentes y adultos, los casos asintomáticos son comunes [42-44] y se presentan como una enfermedad respiratoria leve (catarro, lagrimeo, estornudos, conjuntivitis, irritación de la garganta, o tos de más de 21 días de duración) [45, 46], aunque también puede presentarse como una infección con sintomatología clásica. La mayoría de los adultos y adolescentes que tienen tos convulsa han tenido una infección previa por *B. pertussis* y/o han sido vacunados [47, 48]. Las segundas infecciones son generalmente mucho más leves que la primera infección [49]. Se ha observado que entre el 12 y 52 % de los adolescentes y adultos que sufren episodios de tos durante periodos prolongados (más de 21 días sin causa aparente) presentan evidencia serológica de infección con *B. pertussis* [1].

1.3.2 Infecciones con otras especies de *Bordetella*

B. parapertussis en humanos puede causar desde infecciones asintomáticas a tos convulsa leve o clásica [1]. Por otro lado, *B. bronchiseptica* causa ocasionalmente infecciones respiratorias en humanos, principalmente en individuos inmunocomprometidos [1]. *B. holmesii* fue inicialmente detectada como causante de bacteriemia en pacientes con enfermedades subyacentes y posteriormente fue aislada del tracto respiratorio de pacientes con síntomas de tos convulsa [50, 51].

1.4. Tratamiento

La infección de niños menores de 6 meses requiere hospitalización debido a las complicaciones que pueden producirse como, por ejemplo, apnea, hipoxia y dificultad para respirar. El tratamiento con antibióticos tiene su máxima efectividad en el periodo de incubación, siendo menor en el catarral. Una vez establecida la tos paroxística, el tratamiento no disminuye significativamente el curso clínico de la enfermedad, pero reduce las posibilidades de transmisión a otras personas. Anteriormente la eritromicina era la droga de elección para el tratamiento de pertussis, sin embargo, su utilización fue asociada con una serie de efectos adversos entre los que se incluyen hipertrofia pilórica, estenosis en infantes y arritmias cardíacas. Actualmente se recomienda el uso de azitromicina y claritromicina [52]. En niños mayores de dos meses de edad con alergia o intolerancia a macrólidos se puede utilizar trimetoprima en combinación con sulfametoxazol. Como fármacos coadyuvantes para el tratamiento sintomático de los paroxismos de tos se han empleado el salbutamol, los corticoides [53] y la globulina hiperinmune anti-pertussis [54]. Los dos primeros se emplean con frecuencia tanto en tratamiento ambulatorio como hospitalario. Sin embargo, hasta el momento, no hay estudios controlados suficientemente amplios que hayan demostrado su eficacia. El suero hiperinmune obtenido de adultos en fase de convalecencia de tos convulsa o de adultos vacunados ha sido utilizado en décadas pasadas, sin embargo, el beneficio de su uso no ha sido significativo [53], por lo que hasta el momento no está justificado su empleo.

Se ha propuesto recientemente el uso de dos fármacos para disminuir la respuesta proinflamatoria del huésped y así evitar los efectos adversos de la fase aguda de la tos convulsa. El primero de ellos es la acetazolamida, un inhibidor de la enzima anhidrasa carbónica, cuya administración reduce la patología inflamatoria pulmonar en ratones infectados con *B. pertussis* [55]. La inhibición de la enzima anhidrasa carbónica disminuiría los niveles de bicarbonato exportados por el transportador pendrina, un intercambiador de aniones presente en las células epiteliales [56]. Un estudio reciente demostró que la toxina pertussis produce un aumento marcado en la expresión del transportador pendrina en células del epitelio respiratorio [55], y que la actividad de este transportador modularía el pH del epitelio a niveles óptimos para la actividad de mediadores proinflamatorios [57]. Otro fármaco propuesto es el 2-amino-4-(4-heptiloxifenil)-2-metilbutanol (AAL-R), un ligando del receptor de esfingosina-1-fosfato

(S1PR) presente en células mieloides [57]. La esfingosina-1-fosfato (S1P) es un esfingolípido que regula muchos procesos celulares importantes, incluida la señalización de la respuesta del sistema inmune [58]. El tratamiento con AAL-R reduce la letalidad de la infección con *B. pertussis* en un modelo murino neonatal, probablemente mediante la regulación negativa de un componente clave involucrado en la estimulación de la respuesta inflamatoria a la infección bacteriana [57]. Si bien estos fármacos están aprobados para su uso en humanos, todavía no hay estudios que demuestren su efectividad en el tratamiento de la tos convulsa.

1.5. Factores de virulencia

1.5.1. Factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS

B. pertussis posee una gran variedad de factores de virulencia y la expresión de la mayoría de éstos se encuentra regulada por el sistema de dos componentes formado por las proteínas BvgA y BvgS [59].

1.5.1.1. Toxina Pertussis (PT)

La toxina pertussis (PT) fue una de las primeras toxinas identificadas de *B. pertussis* [60] y es uno de los factores de virulencia más estudiados. PT, que es sintetizada y secretada exclusivamente por *B. pertussis*, es una toxina de tipo AB₅ que cataliza la ribosilación de ADP de la subunidad α de proteínas G triméricas de las células del huésped [61]. Esta toxina está compuesta por una subunidad catalítica (la subunidad A) y cinco subunidades de unión a membrana o de transporte (subunidades B, que forman el pentámero B), que se ensamblan en el periplasma y luego se exportan mediante un sistema de secreción de tipo IV que está codificado por el *locus ptl* (del inglés, *pertussis toxin liberation*) [62]. La toxina PT puede unirse a casi cualquier glicoproteína que contenga ácido siálico [63] y, por lo tanto, se han identificado y caracterizado múltiples receptores en una amplia gama de tipos celulares *in vitro* [64]. Sin embargo, se desconocen los blancos celulares específicos de PT en la infección *in vivo* [59]. Después de la unión con el receptor en la membrana celular, PT entra en la célula huésped por endocitosis mediada por receptor y sigue una ruta de transporte retrógrada al aparato de Golgi y luego al retículo endoplásmico (RE) [65]. La subunidad A sale del RE y es activada en el citoplasma en donde cataliza la transferencia de ADP-ribosa desde NAD⁺ a un residuo de

cisteína de la subunidad α de las proteínas G heterotriméricas, algunas de las cuales son proteínas G inhibitorias. Entre otros efectos, esta modificación elimina la capacidad de estas proteínas G inhibitorias para inhibir la actividad de la adenilato ciclasa del huésped (lo que resulta en niveles elevados de AMP cíclico [cAMP] en la célula) y bloquea otras enzimas y vías reguladas por proteínas G [64, 66], lo que lleva a la desregulación de la respuesta inmune. PT inhibe la migración de células que expresan receptores de quimoquinas acoplados a proteína G *in vitro*, como neutrófilos, monocitos y linfocitos [67]. En modelos murinos, la expresión de PT por *B. pertussis* se correlaciona con una producción disminuida de citoquinas y quimoquinas proinflamatorias y un aumento de la colonización bacteriana al comienzo de la infección [68, 69]. PT retarda el reclutamiento de neutrófilos a los pulmones reduciendo la capacidad de los anticuerpos opsonizantes anti-*B. pertussis* de mediar la eliminación de la bacteria [69]. Además, se ha encontrado que PT interfiere con la expresión de moléculas presentadoras de antígenos en macrófagos [70] e incrementa la expresión de CR3 en estas células [71], favoreciendo así la unión de *B. pertussis* a este tipo celular a través de la hemaglutinina filamentosa (FHA), la principal adhesina de este patógeno. Experimentos en ratones han sugerido que PT inicialmente actúa sobre los macrófagos alveolares [72]. PT también altera la expresión de moléculas de superficie en las células dendríticas [73] reduciendo la respuesta adaptativa y promoviendo la reinfección de individuos. Si bien éstas y otras observaciones en modelos animales sugieren que PT contribuye al establecimiento de la infección al suprimir la inflamación temprana e inhibir la acción microbicida de las células inmunes, no se sabe si PT induce estos efectos durante la infección en humanos [59]. Más aún, se ha demostrado que la presencia de PT es la causante de la linfocitosis extrema que ocurre en los casos de tos convulsa, por lo que suele llamársela factor promotor de linfocitosis, [74] y los anticuerpos contra esta toxina protegen contra la sintomatología de la enfermedad [54].

1.5.1.2. Toxina Adenilato Ciclasa (CyaA)

La toxina adenilato ciclasa (CyaA), que es un miembro de la familia de toxinas RTX (del inglés, *repeats in toxin*), está codificada por el gen *cyaA* y es producida por todas las especies de *Bordetella* que infectan mamíferos [75]. CyaA es modificada mediante palmitoilación por CyaC y posteriormente es secretada por el sistema de secreción de tipo I formado por las proteínas CyaBDE [76, 77]. La toxina contiene dos

módulos funcionales distintos: el dominio C-terminal, que contiene las repeticiones RTX, media la unión a las células blanco y es responsable de la actividad hemolisina al formar poros selectivos de cationes en la membrana plasmática eucariota [78, 79]; y el dominio N-terminal, que es una adenilato ciclasa dependiente de calmodulina que convierte ATP en AMP cíclico (cAMP) [80, 81]. Estudios recientes indican que CyaA puede adoptar múltiples conformaciones con distintas capacidades para afectar la formación de poros o la translocación de la adenilato ciclasa en la célula huésped [82]. Por lo tanto, los efectos observados de CyaA en diferentes tipos celulares son el resultado de una combinación de permeabilidad iónica, aumento en los niveles de cAMP (que conduce a la perturbación de la transducción de señales mediadas por este segundo mensajero) y posiblemente, el agotamiento del ATP intracelular [59]. Aunque CyaA puede intoxicar muchos tipos celulares, se une con alta afinidad al receptor de complemento 3 (CR3, también conocido como integrina $\alpha_M\beta_2$ o CD11b/CD18 o Mac-1), que está presente en neutrófilos, macrófagos y células dendríticas [83]. Los trabajos iniciales con esta toxina correlacionaron la producción de cAMP dependiente de CyaA en neutrófilos humanos con la inhibición de la fagocitosis y el estallido respiratorio, que favorece la persistencia bacteriana [84]. Estudios más recientes han demostrado que CyaA bloquea la fagocitosis dependiente del complemento por los macrófagos [85] e interfiere con los mecanismos bactericidas dependientes de especies reactivas de nitrógeno en este tipo celular [86]. Además, esta toxina también suprime la activación y la quimiotaxis de las células T [87]. En modelos murinos, las bacterias deficientes en CyaA se eliminan más rápido que las de tipo salvaje [88], y los estudios que utilizan ratones inmunodeficientes y neutropénicos sugieren que CyaA tiene un papel crucial en permitir que las bacterias resistan la eliminación mediada por neutrófilos [89]. Nuestro grupo ha demostrado recientemente que tanto CyaA como PT manipulan la respuesta bactericida e inflamatoria de los macrófagos infectados con *B. pertussis*, favoreciendo la persistencia intracelular de este patógeno [90].

1.5.1.3. Hemaglutinina Filamentosa (FHA)

FHA es una proteína fibrilar de 2-4 nm de diámetro y 100 nm de longitud, muy inmunogénica, que puede estar asociada a la superficie bacteriana o ser liberada al medio extracelular [91]. FHA, que está codificada por el gen *phaB*, es la principal adhesina de *B. pertussis*. La proteína es sintetizada como un precursor de 367 kDa, denominado FhaB,

que sufre varias modificaciones hasta generar la proteína FHA madura de 220 kDa, la cual es exportada a través de la membrana citoplasmática por un sistema dependiente de péptido señal y de la maquinaria de exporte Sec [92, 93]. Su transporte y secreción a través de la membrana externa requiere la proteína accesoria FhaC, localizada en la membrana externa. Ambas proteínas conforman un sistema de secreción de dos componentes (del inglés, *two-partner secretion* [TPS] *system*) [94]. Una vez localizada en la superficie celular, FHA puede ser liberada al medio extracelular a través del clivaje mediado por la proteasa SphB1 [95]. La liberación de FHA por acción de la proteasa SphB1 es importante para la colonización de *B. pertussis*, ya que facilita la dispersión de las bacterias de las microcolonias iniciales a nuevos sitios de infección en el tracto respiratorio [96]. FHA es necesaria y suficiente para mediar la adherencia bacteriana a varios tipos de células eucariotas *in vitro* [97]. Estudios *in vitro*, empleando diferentes líneas celulares de mamíferos, sugieren que FHA contiene al menos tres dominios involucrados en la adhesión de *B. pertussis* a las células del hospedador. El triplete Arg-Gly-Asp (RGD) promueve la adhesión a macrófagos, leucocitos polimorfonucleares (PMNs) y otros tipos celulares mediante la unión a integrinas (LRI, $\alpha_v\beta_3$ y IAP, CD47) y al receptor CR3 (CD11b/CD18, $\alpha_M\beta_2$, Mac-1), presentes en estos tipos celulares [98-100]. Específicamente, el dominio RGD de FHA participa en la unión a la integrina VLA-5 (del inglés, *very late antigen 5*, $\alpha_5\beta_1$) de células epiteliales bronquiales [101] y esta unión induce la activación de NF- κ B, lo que conduce a un incremento en la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 (del inglés, *epithelial intercelular adhesion molecule 1*) [102, 103]. El aumento de ICAM-1 está involucrado en el reclutamiento de leucocitos y su activación en el sitio de infección. FHA también posee un dominio de interacción con carbohidratos (CRD), el cual media la adhesión a células epiteliales respiratorias ciliadas y macrófagos *in vitro* [104]. Además, FHA presenta actividad de unión tipo lectina con afinidad por heparina y otros carbohidratos sulfatados, que se encuentra involucrada en la adhesión a células epiteliales no ciliadas. Este sitio de unión a heparina es necesario para la hemaglutinación mediada por FHA [105]. Un hallazgo interesante descrito por nuestro grupo indica que la actividad adhesina de FHA se ve influenciada por la presencia de adenilato ciclasa (CyaA) en la membrana bacteriana [106]. Si CyaA no se encuentra expresada, como es el caso de *B. pertussis* en fase intermedia, la interacción de FHA con las células epiteliales es menos eficiente pero no se encuentra inhibida por heparina sugiriendo que CyaA modifica el dominio de unión de FHA a polisacáridos sulfatados [106]. Estudios bioquímicos posteriores confirmaron la interacción física entre estos dos

factores de virulencia [107]. Por último, se ha encontrado que FHA media la interacción de *B. pertussis* con dominios de membrana ricos en colesterol (balsas lipídicas) a través de su interacción con colesterol y proteínas presentes en estos dominios. Esta interacción favorece no sólo la adhesión e internalización de *B. pertussis* a la célula huésped sino también su sobrevivencia intracelular [108, 109].

1.5.1.4. Fimbrias (Fim)

B. pertussis produce fimbrias (Fim), también conocidas como pili de tipo I, que son estructuras proteicas poliméricas de tipo filamentosas localizadas en la superficie bacteriana, conformadas por dos subunidades, una mayor y una menor. Existen dos serotipos principales de subunidad mayor de fimbria, Fim2 y Fim3, que comparten una subunidad menor común denominada FimD, que se ubica en la punta de este pili [110]. El gen *fimD* forma parte del operón *fimBCD*, el *locus* funcional para la biosíntesis de fimbria, que incluye a la chaperona FimB y al acomodador FimC [111]. Este operón se encuentra ubicado entre los genes *fhaB* y *fhaC* [112]. Los genes *fim2* y *fim3*, que codifican las dos subunidades fimbriales principales, se ubican en otra parte del cromosoma y pueden experimentar variación de fase [113]. También se ha identificado un gen que codifica para una subunidad mayor alternativa denominada *fimX* [114], que aunque es expresado en muy bajos niveles *in vitro* [115], estaría fuertemente expresado *in vivo* [116]. Varios estudios sugieren que Fim interviene en la adhesión de *B. pertussis* al epitelio respiratorio a través de Fim2 y Fim3, y a monocitos por medio de FimD [117, 118]. Fim interacciona también con azúcares sulfatados que se encuentran comúnmente en el tracto respiratorio, como heparina, condroitín y dextrano [119]. Se ha demostrado que FimD interviene en la adhesión de *B. pertussis* no opsonizada a VLA-5 en la superficie de monocitos provocando un aumento de expresión de CR3 e incrementando los sitios de interacción para FHA y CyaA [117, 120].

Se ha encontrado que la inclusión de Fim en las formulaciones vacunales acelulares aumenta la eficacia de éstas y que los anticuerpos anti-Fimbria contribuyen a la protección contra *B. pertussis* [121, 122]. Nuestro grupo demostró que la actividad protectora de los anticuerpos anti-Fim está basada en su gran actividad aglutinante, la cual interfiere significativamente en la capacidad de *B. pertussis* de interaccionar con las células epiteliales respiratorias y promueve la eliminación de la bacteria del tracto respiratorio [123].

1.5.1.5. Sistema de Secreción de Tipo III (SST3)

B. pertussis posee un sistema de secreción de tipo III (SST3), denominado Bsc, que está regulado positivamente tanto por BvgAS [124] como por la disponibilidad de hierro [125]. El SST3 es un aparato secretor especializado que permite a las bacterias Gram-negativas inyectar proteínas, llamadas efectores, directamente en el citoplasma de células eucariotas [126]. Las proteínas inyectadas generalmente se asemejan a factores eucarióticos con funciones de transducción de señales y son capaces de interferir en las vías de señalización de la célula huésped, resultando en el desarme de las respuestas inmunes del huésped o en la reorganización del citoesqueleto. Este sistema se estudió fundamentalmente en *B. bronchiseptica*, dado que se expresa constitutivamente facilitando su estudio. En este patógeno el SST3 induce muerte necrótica independiente de caspasas en una amplia gama de tipos celulares *in vitro* [127]. Las mutaciones que eliminan la actividad del SST3 disminuyen la persistencia bacteriana en las vías respiratorias inferiores de ratas y ratones [128, 129]. La infección de ratones con mutantes de *B. bronchiseptica* defectivos en el SST3 también da como resultado una respuesta de anticuerpos más robusta. Asimismo, los esplenocitos reestimulados de animales que han sido infectados con estos mutantes muestran una producción incrementada de la citoquina proinflamatoria IFN- γ y una producción disminuida de la citoquina antiinflamatoria IL-10 [130]. En este sentido, se ha demostrado que el IFN- γ facilita la eliminación de *B. bronchiseptica* del tracto respiratorio inferior, mientras que la IL-10 retrasa la eliminación bacteriana [130]. En conjunto, estas observaciones sugieren que el SST3 tiene un papel inmunomodulatorio que promueve la persistencia en el tracto respiratorio inferior de *Bordetella*, sin embargo, la base molecular de este fenómeno aún no se conoce.

A pesar de los esfuerzos concertados de varios grupos de investigación, solamente una proteína efectora, BteA (también llamada BopC), se ha identificado como un factor translocado por el SST3 [131, 132]. Se ha propuesto un segundo efector, BopN [133], pero hasta el momento no existe evidencia de que sea translocado por el SST3. BteA es suficiente para causar citotoxicidad *in vitro*, y las mutaciones en *bteA* reproducen los fenotipos que están asociados con la eliminación de la actividad del SST3 *in vitro* e *in vivo* [129, 131]. Tras la translocación a las células huésped, el dominio de direccionamiento N-terminal de BteA produce la localización de este efector en las balsas lipídicas ricas en ezrina que median la unión bacteriana [134]. Los mecanismos responsables de la potente citotoxicidad de BteA siguen sin ser esclarecidos.

Quizás la pregunta más intrigante con respecto al SST3 se relaciona con el rol que cumple en la infección por *B. pertussis*. A pesar de que en esta especie los genes del SST3 están intactos, tanto su secuencia como aquellos implicados en la regulación de su expresión, y que los alelos *bteA* son funcionalmente intercambiables entre las subespecies de *Bordetella* [124, 134], no se ha encontrado las condiciones en las cuales este sistema se expresa o cual es la función que cumple en la patogénesis de *B. pertussis*. Recientemente se publicaron resultados que sugieren la expresión de este sistema *in vivo* [135]. Aunque generalmente no se observa actividad relacionada al SST3 en cepas de *B. pertussis* adaptadas al laboratorio, se encontró que la proteína Bsp22, que forma el complejo de punta del SST3 y es utilizada como un marcador de la activación de este sistema, se encuentra expresada y es secretada por aislados clínicos *in vitro* [135]. Además, la mutación del gen *bscN*, que codifica para la ATPasa que da energía al SST3, en cepas clínicas da como resultado la inducción de una producción elevada de citoquinas proinflamatorias en el ratón y una eliminación acelerada de *B. pertussis* de los pulmones de ratones infectados, sugiriendo que este sistema es funcional y relevante para la patogénesis de esta bacteria [135]. En este sentido, se ha demostrado que en *B. pertussis* la actividad de SST3 se pierde tras los sucesivos repiques *in vitro* y se recupera después del contacto con el huésped [136]. Esta diferencia en la activación del SST3 entre las especies de *Bordetella* puede deberse a la regulación diferencial de este sistema por BtrA, una proteína que inhibe la función del SST3 [137]. Ahuja y col. demostraron que BtrA regula de forma diferencial la expresión de genes del SST3, tanto en *B. pertussis* como en *B. bronchiseptica* [138]. La eliminación de *btrA* en *B. pertussis* activa la secreción del SST3 y aumenta la expresión de los genes relacionados a este sistema como *bopB*, *bopD*, *bopN*, *bsp22*, *bscN* y *bteA*. Este hallazgo sugiere que el SST3 es completamente funcional en *B. pertussis*, pero su expresión y activación está reprimida por el nodo regulador de BtrA, que ejercería una inhibición mayor en esta especie en comparación con *B. bronchiseptica*.

1.5.1.6. Pertactina (Prn) y otros autotransportadores

B. pertussis expresa distintas proteínas de membrana externa que pertenecen a la familia de autotransportadores. Esta familia incluye diversas proteínas funcionalmente diferentes, como proteasas, adhesinas, toxinas, lipasas e invasinas cuya característica distintiva es que dirigen su propia exportación a través a la membrana externa [139]. El

primer miembro de esta familia descrito en *Bordetella* fue pertactina (Prn), una proteína de 69 kDa que posee un motivo RGD y regiones ricas en prolina y repeticiones de leucina, ambos dominios potencialmente involucrados en la adhesión de la bacteria a células del hospedador [139, 140]. Estudios realizados por nuestro grupo sugieren que anticuerpos anti-Prn juegan un rol crucial en la protección contra *B. pertussis* debido a su capacidad opsonizante, capaz de promover la inmunoeliminación mediada por células [141, 142]. En estos estudios se observó además que Prn es el único antígeno incluido en las formulaciones de vacunas acelulares actuales que induce anticuerpos opsonofagocíticos [141], lo cual explica la importancia de su inclusión en tales vacunas [143] y la aparición de cepas circulantes que expresan Prn con variaciones en regiones implicadas en el reconocimiento inmune [144] o incluso, más recientemente, cepas que carecen de la expresión de este antígeno [145-147]. La pertactina es una proteína que no está involucrada en la patogénesis lo cual ha determinado que la mayoría de las cepas circulantes en países donde se ha usado la vacuna acelular por más de una década no expresan Prn como consecuencia de una inmunoselección dirigida por vacunación [148-150].

Otros autotransportadores identificadas como factores de virulencia de *B. pertussis* incluyen: TcfA, originalmente clasificado como un factor de colonización traqueal [151], BrkA [152], SphB1 [95], Vag8 [153] y BapC [154]. BrkA y BapC le confieren a *B. pertussis* cierta resistencia a la activación de la vía clásica del complemento [152, 154, 155] y a los péptidos antimicrobianos [154, 156]. Vag8 es otro de los autotransportadores utilizados por *B. pertussis* para evadir la actividad bactericida del sistema de complemento, interviniendo principalmente en la vía clásica y de las lectinas [157, 158]. Se ha sugerido que BapC podría estar involucrada en la adhesión de *B. pertussis* a células del hospedador [159]. SphB1, como ya se indicó, es una proteasa que interviene en la liberación de FHA al medio extracelular [95].

1.5.1.7. Toxina Dermonecrótica (DNT)

DNT es una toxina de tipo A-B compuesta por un dominio N-terminal de unión a receptor y un dominio enzimático C-terminal [160, 161] que se encuentra regulada positivamente por BvgAS [162]. Esta toxina posee actividad transglutaminasa y causa la activación constitutiva de GTPasas Rho intracelulares [163, 164]. Estas GTPasas regulan varios procesos celulares incluyendo la reorganización del citoesqueleto y diferenciación

celular, entre otros [165], y su activación por la DNT provoca la reorganización de los filamentos de actina [166] y la intoxicación celular. Aunque el receptor de DNT no ha sido identificado, se sabe que esta toxina es internalizada y luego escindida por proteasas de las células eucariotas como furina, lo cual es indispensable para su actividad [167]. A pesar que DNT carece de una secuencia señal típica para su exportación y no es secretada por bacterias en cultivo [160], estos hechos no excluyen la posibilidad de que esta toxina sea secretada durante la colonización del huésped, mediante un mecanismo de secreción aun no caracterizado [168].

1.5.1.8. Cápsula

La cápsula es una matriz compleja de polisacáridos que rodea a las bacterias y las protege contra una variedad de condiciones ambientales desfavorables [169]. Es considerado un factor esencial en la virulencia de las bacterias patógenas ya que proporciona resistencia contra diversos mecanismos de defensa del huésped. Neo y col. reportaron la presencia de una microcápsula intacta producida en la superficie de *B. pertussis* cuya síntesis es regulada por BvgAS [169]. Si bien este reporte podría confirmar estudios previos, que describieron a *B. pertussis* como un microorganismo encapsulado [170], aún hay dudas de la existencia de cápsula en esta bacteria y se desconoce el rol que podría cumplir en la patogénesis de este microorganismo.

1.5.2. Regulación por el sistema de dos componentes BvgAS

La expresión de los factores de virulencia mencionados anteriormente se encuentra regulada por el sistema de dos componentes formado por las proteínas BvgA y BvgS, codificadas en el *locus bvgAS* (del inglés, *bordetella virulence genes*) [59]. BvgAS controla cientos de genes en el género *Bordetella* en respuesta a cambios en las condiciones ambientales, incluyendo genes que codifican estructuras presentes en la superficie bacteriana y proteínas secretadas involucradas en la patogénesis, factores necesarios para la supervivencia fuera del huésped, enzimas involucradas en el metabolismo celular y sistemas regulatorios adicionales [162]. BvgA es una proteína reguladora de respuesta (RR) con un dominio receptor (Rec) en su extremo amino terminal y un dominio de unión a ADN de tipo hélice-giro-hélice (HTH) en su extremo carboxilo terminal [171] (**Figura 1.1**). BvgS es una proteína sensor quinasa multidominio

que contiene dos motivos tipo venus atrapamoscas (*venus flytrap*, VFT) en su extremo N-terminal, con localización periplasmática, implicados en la detección de moléculas señales que regulan su actividad [172] (**Figura 1.1**). A continuación de los dominios VFT se encuentra una región que atraviesa la membrana interna, seguida por un dominio PAS localizado en el citoplasma, un dominio histidina quinasa (HK), un dominio receptor (Rec) y un dominio histidina fosfotransferasa (Hpt). Durante el crecimiento *in vitro* en medio de cultivo a 37 °C, BvgS está activo y usa ATP para fosforilar una histidina conservada en su dominio HK [173]. El grupo fosforilo se transmite posteriormente a un aspartato en el dominio Rec, luego a una histidina en el dominio Hpt y finalmente a un aspartato en el dominio Rec del regulador de respuesta BvgA [173] (**Figura 1.1**). Una vez fosforilado BvgA se dimeriza y se une al ADN en la secuencia consenso heptamérica TTT(C/C)NTA [174] para activar o reprimir la transcripción [175, 176]. Aunque la señal o señales a las que responde BvgS en la naturaleza se desconocen, el crecimiento a baja temperatura (por debajo de 25 °C) o en presencia de sulfato (como por ejemplo MgSO₄) o ácido nicotínico (que son denominados moduladores químicos) inactivan a BvgS y, por lo tanto, BvgA permanece sin fosforilación y no puede regular la transcripción [59]. Es importante destacar que esta regulación no es del tipo encendido-apagado, sino que responde a los distintos moduladores a modo de reóstato, controlando la expresión de distintos genes en respuesta a variaciones sutiles en las condiciones del entorno [174, 177-180]. El dominio PAS de BvgS estaría involucrado en la detección de moléculas intracelulares cuya abundancia reflejaría el estado metabólico de la bacteria, y los cambios en la concentración de estos componentes podrían afectar la señalización de BvgS [181], que explicaría el comportamiento de tipo reóstato atribuido a este sensor. Aunque además de la temperatura no se conocen otros reguladores *in vivo*, se cree que la regulación diferencial de los factores de virulencia en respuesta a los distintos ambientes encontrados tanto dentro del hospedador como durante la transmisión a otros hospedadores podría tener un rol importante en la patogénesis de esta bacteria.

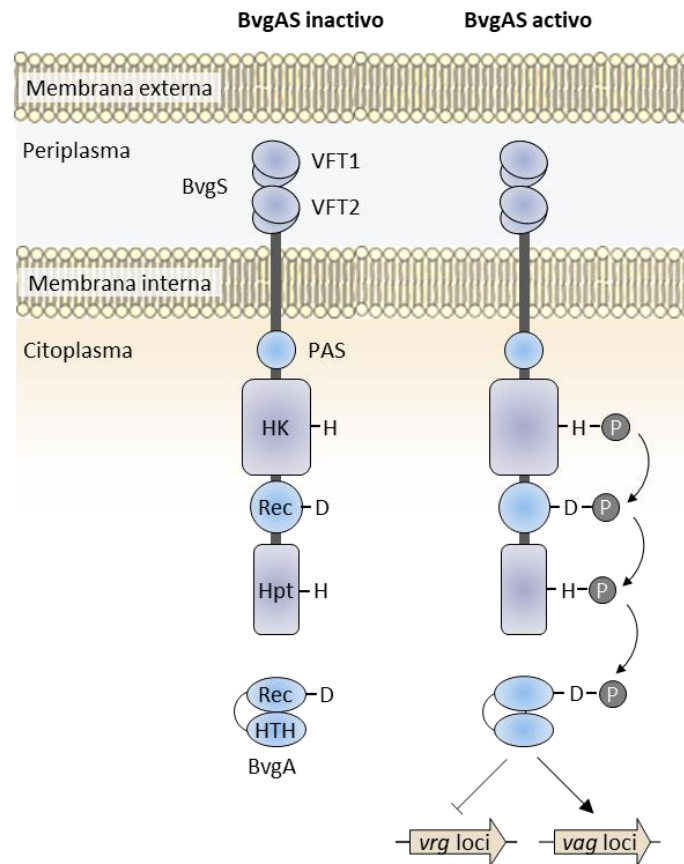


Figura 1.1: El sistema regulador BvgAS. BvgS es una proteína sensor histidina quinasa multidominio que contiene (desde el extremo amino hasta el carboxilo terminal) dos dominios venus atrapamoscas (VFT1 y VFT2), un dominio transmembrana, un dominio PAS, un dominio histidina quinasa (HK), un dominio receptor (Rec) y un dominio de fosfotransferencia de histidina (Hpt). BvgA es una proteína reguladora de respuesta que tiene un dominio Rec N-terminal y un dominio de hélice-giro-hélice (HTH) C-terminal. BvgS se activa a 37 °C y se autofosforila en una histidina conservada (H) en el dominio HK. El grupo fosforilo se transfiere luego al dominio Rec, seguido del Hpt y finalmente al dominio Rec de BvgA. BvgA fosforilado (BvgA-P) dimeriza y activa la expresión de genes asociados a virulencia (*vag loci*) y reprime la expresión de genes reprimidos por virulencia (*vrg loci*). BvgS se inactiva y permanece sin fosforilación cuando las bacterias crecen a baja temperatura (< 25 °C) o a 37 °C en presencia de moduladores químicos (como sulfato de magnesio (MgSO₄) o ácido nicotínico). Fuente: Melvin, J. y col. (2014) Nat. Rev. Microbiol.

Al menos tres fases fenotípicas han sido identificadas *in vitro* reguladas por BvgAS, denominadas fase virulenta (Bvg⁺), fase intermedia (Bvgⁱ) y fase avirulenta (Bvg⁻) [174], que surgen como respuesta a cambios graduales en las concentraciones de agentes moduladores (como MgSO₄ o ácido nicotínico) o a cambios en la temperatura del cultivo (**Figura 1.2**). Este fenómeno de transición de fase es reversible y se conoce como modulación fenotípica [182]. Cuando la bacteria crece a 37 °C, en ausencia de MgSO₄ o ácido nicotínico, BvgS fosforila a BvgA (BvgA-P), induciendo la expresión de los genes

vag (del inglés, *virulence activated genes*). Simultáneamente, se reprime la transcripción de los genes *vrg* (del inglés, *virulence repressed genes*) mediante la proteína BvgR, cuya expresión es activada por BvgA [183, 184]. En base a experimentos *in vitro*, los genes regulados por BvgAS fueron clasificados en cuatro clases de acuerdo con diferencias temporales en su expresión [162, 185, 186]. Los genes de clase 1 (*vag* tardíos), presentan una cinética de inducción relativamente lenta, requiriendo mayores niveles de BvgA-P para su expresión [185]. Los genes *vag* tardíos incluyen el operón *ptx-ptl* (que codifica PT y su sistema de transporte); el operón *cyaA-E* (que codifica CyaA) y el operón *bsc* (que codifica el SST3). Los genes de clase 2 (*vag* tempranos) responden rápidamente a la activación y requieren bajas concentraciones de BvgA-P para su inducción [185] e incluyen a *fhaB* (que codifica la hemaglutinina filamentosa; FHA), genes *fim* (que codifican fimbrias) y también a *bvgAS*. Por lo tanto, *bvgAS* está autorregulado positivamente, lo que confiere un nivel de control adicional [187]. La necesidad de distintos niveles de BvgA-P para transcribir los diferentes *vag* está determinado por la localización y la afinidad de los sitios de unión de BvgA-P a sus respectivos promotores [188]. Este patrón de expresión de los genes *vag* fue confirmado *in vivo* [186] y se cree que le permitiría a la bacteria adaptar la expresión de sus factores de virulencia de acuerdo a los diferentes estadios de la infección o a los nichos en los cuales se encuentre. Cuando *B. pertussis* se cultiva a 25 °C ó a 37 °C en presencia de MgSO₄ o ácido nicotínico, se inactiva la fosforilación de BvgAS, por lo que es incapaz de activar la transcripción de los genes *vag*, mientras que los genes clase 4 (*loci vrg*) se expresan debido a la ausencia del represor BvgR, dando lugar a la fase Bvg⁻ o avirulenta. El *loci vrg* incluye genes relacionados con la biosíntesis del lipooligosacárido (LOS) y de polisacáridos de cápsula en *B. pertussis* [189]. La fase intermedia (Bvgⁱ) ocurre cuando las bacterias crecen en presencia de concentraciones bajas de moduladores químicos o en las primeras horas después del cambio de las condiciones inductoras de fase Bvg⁻ a condiciones inductoras de fase Bvg⁺. Esta fase se caracteriza por la ausencia de expresión de los genes clase 1 (*vag* tardíos) y clase 4 (*vrg*), la expresión de los genes clase 2 (*vag* tempranos) [174] y genes expresados exclusivamente en esta fase intermedia (genes clase 3) [162], de los cuales el único gen caracterizado es *bipA* [174, 190], que codifica para una proteína que parece tener un papel importante durante las primeras etapas de colonización de las vías respiratorias [190, 191].

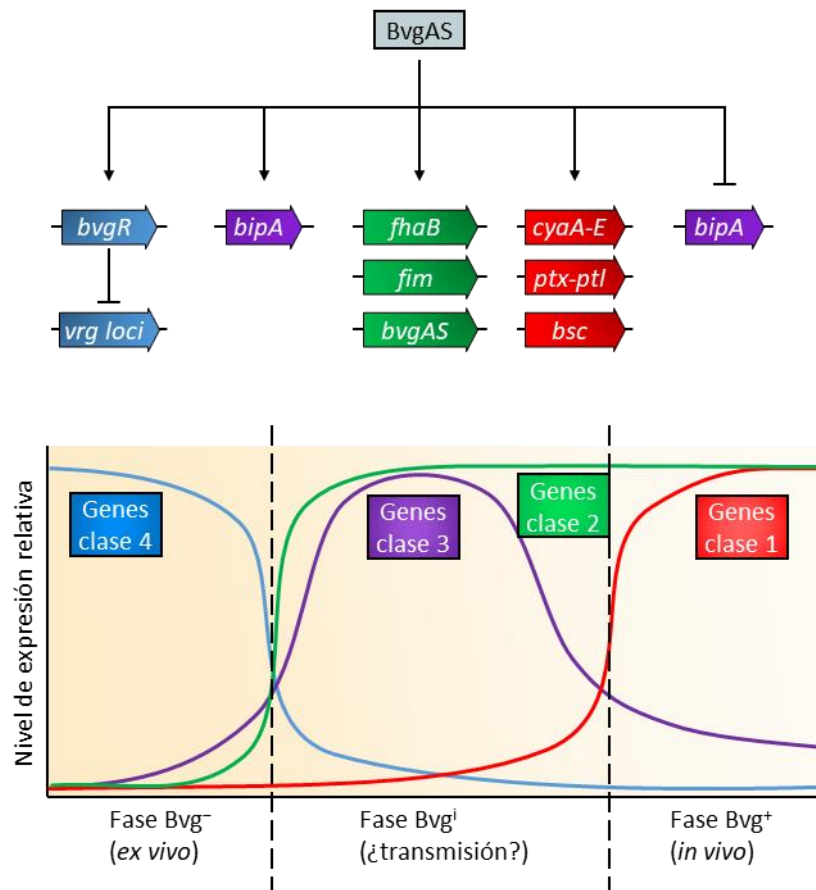


Figura 1.2: Fases fenotípicas reguladas por BvgAS en *Bordetella*. BvgAS controla cuatro clases de genes y tres fases fenotípicas distintas. El efecto de la activación de BvgAS en las diversas clases de genes se muestra en el panel superior. La fase Bvg⁺ ocurre cuando BvgAS está completamente activo y se caracteriza por la expresión máxima de genes que codifican adhesinas (genes de clase 2, como *fhaB* y *fim*, los niveles de expresión están indicados por la línea verde) y toxinas (genes de clase 1, como *cyaA-E*, *ptx-ptl* y *bsc*, los niveles de expresión están indicados por la línea roja) y la expresión mínima de los genes de clase 3 y clase 4 (los niveles de expresión están indicados por líneas violeta y azul, respectivamente). La fase Bvg⁻ ocurre cuando BvgAS está inactivo y se caracteriza por la expresión máxima de genes de clase 4 (genes *vrg*, como los genes *kps* de síntesis de cápsula) y la expresión mínima de genes de clase 1, clase 2 y clase 3. En particular, la regulación de algunos *loci vrg* es indirecta: cuando BvgAS está inactivo no activa la expresión de *bvgR*, que es un regulador negativo del *loci vrg*. La fase Bvgⁱ ocurre cuando BvgAS está parcialmente activo y se caracteriza por la expresión máxima de genes de clase 2 y clase 3 y una expresión mínima de genes de clase 1 y clase 4. El único gen de clase 3 que se ha caracterizado hasta el momento es *bipA*. Fuente: Melvin, J. y col. (2014) Nat. Rev. Microbiol.

Ensayos empleando sistemas reporteros de alta sensibilidad permitieron evaluar el funcionamiento del sistema de regulación por BvgAS *in vivo* en modelos animales y demostraron un patrón temporal de expresión de FHA, Prn, PT y CyaA similar al observado *in vitro*, pero con tiempos de expresión más cortos, lo que sugiere que las

condiciones de entorno encontradas dentro del huésped permiten a la bacteria una mayor capacidad de inducción de los genes regulados por el sistema BvgAS [162].

Se ha postulado que factores ambientales tales como la baja temperatura en la zona nasofaríngea y durante la transmisión de hospedador a hospedador, podrían determinar la modulación de la virulencia de manera tal que al ingresar al hospedador la bacteria se encontraría en fase intermedia o avirulenta [192, 193]. De ser así, durante los primeros estadios de colonización, este patógeno podría no expresar las proteínas codificadas por los genes *vag* (bacterias en fase avirulenta o Bvg⁻). Una vez dentro del hospedador el cambio de temperatura induciría primero la expresión de adhesinas (*vag* tempranos) favoreciendo la interacción con las células del epitelio respiratorio. A las dos horas de la inducción de adhesinas, si las condiciones se mantienen, comenzaría la expresión de toxinas propias de la fase virulenta o Bvg⁺. Estas toxinas en general son las responsables de alterar los mecanismos de defensa del hospedador. La expresión de toxinas se relaciona con la fase aguda de la enfermedad y la sintomatología típica. Aunque no se conoce aún el rol de la modulación de estos factores de virulencia durante el ciclo infeccioso, la conservación de este sistema de dos componentes a lo largo de la evolución sugiere un rol relevante en la sobrevida bacteriana.

1.5.3. Regulación por el sistema de dos componentes RisA/RisK

B. pertussis presenta un segundo sistema de dos componentes denominado Ris (del inglés, *regulator of intracellular stress response*) que se encuentra interconectado con el sistema BvgAS. RisAS fue originalmente identificado en un estudio de mutagénesis al azar realizado para identificar genes involucrados en la sobrevida intracelular de *B. bronchiseptica* dentro de células eucariotas [194]. Este sistema se encuentra codificado en el *locus risAS*, que codifica para un regulador de respuesta RisA y un sensor con actividad quinasa RisS [194]. Este sistema de dos componentes presenta un alto grado de identidad de secuencia con los genes *ompR-envZ* de *Escherichia coli* involucrados en procesos de osmorregulación [195] y con los genes *phoPQ* de *Salmonella enterica* requeridos para la activación intrafagosomal de genes de virulencia [196, 197]. En el caso de *B. bronchiseptica*, se ha encontrado que la expresión de RisAS se encuentra inducida cuando la bacteria se encuentra en localización intracelular favoreciendo su sobrevida [194]. En *B. pertussis* el gen *risS* contiene un corrimiento en el marco de lectura, lo que produce una proteína RisS truncada no funcional [198]. Sin embargo, este

patógeno expresa una proteína RisA funcionalmente activa. Recientemente se ha identificado a RisK como la proteína sensor histidina quinasa encargada de fosforilar a RisA en *B. pertussis*, codificada en un gen ubicado por fuera del *locus risAS* [199, 200]. La eliminación de *risA* en *B. pertussis* conlleva a un defecto en la invasión de células epiteliales [198] y a una fuerte disminución de la transcripción de los genes *vrg*, lo que sugiere que RisA juega un papel antagónico al de BvgR en la regulación de estos genes [198, 201]. Se ha postulado que BvgR podría inhibir la expresión de los genes *vrg* previniendo la unión de RisA a los promotores de dichos genes, ya sea de forma directa compitiendo por la secuencia del promotor o indirectamente mediante la unión a RisA. También se ha postulado que BvgR podría interferir en la actividad de RisA a través de la degradación del segundo mensajero c-di-GMP, necesario para la acción de RisA sobre los promotores de los genes *vrg* [201]. En fase avirulenta (Bvg⁻) BvgR no se produce, por lo tanto, RisA puede activar la expresión de los genes *vrg*. Estudios transcriptómicos recientes han mostrado que RisA regula la expresión en *B. pertussis* de otros genes además de los *vrg*, incluyendo genes regulados por hierro y otros de función desconocida [200]. De cualquier manera, el rol que juega RisA/RisK en la patogénesis de *B. pertussis* continua en estudio.

1.5.4. Regulación por el sistema de dos componentes PlrSR

Un sistema de dos componentes recientemente caracterizado en *B. pertussis* que se encuentra interconectado con BvgAS, al igual que RisA/RisK, es el sistema PlrSR (del inglés, *persistance in the low respiratory tract*) [202]. PlrSR está involucrado en la detección de CO₂ y/o O₂ por *B. bronchiseptica* y es requerido para mantener BvgAS activo en los pulmones del ratón, pero no en la cavidad nasal, sugiriendo que PlrSR coordina mecanismos de virulencia específicos de ese sitio anatómico [202]. Es interesante destacar que PlrSR es requerido para lograr la persistencia de *B. bronchiseptica* en el tracto respiratorio inferior incluso cuando se utiliza una cepa mutante que activa constitutivamente BvgAS, sugiriendo la presencia de factores de virulencia independientes de BvgAS, pero dependientes de PlrSR, que son críticos para la supervivencia bacteriana en dicho sitio [202]. Se ha observado que PlrSR es requerido por *B. pertussis* para poder persistir en el tracto respiratorio inferior en un modelo de infección murino, sugiriendo que este sistema de dos componentes funcionaría de una manera similar al de *B. bronchiseptica* [202].

1.5.5. Regulación post transcripcional mediada por la chaperona Hfq

Hfq es una proteína de unión al ARN que desempeña una función clave en el control de la expresión génica en diversas especies bacterianas [203]. Esta proteína interviene en la interacción entre ARN reguladores pequeños y sus ARNm objetivo, afectando la traducción y estabilidad de los ARNm, cumpliendo así un papel importante en la regulación post transcripcional de muchas proteínas involucradas en procesos celulares en bacterias [203], incluida la producción de factores de virulencia. En *B. pertussis*, Hfq interviene en la expresión de factores de virulencia regulados por BvgAS, entre los que se encuentran CyaA, PT, FHA, Vag8, TcfA y genes del SST3 [204, 205]. La mutación en Hfq disminuye la producción de los factores de virulencia mencionados anteriormente y reduce tanto la sobrevivencia intracelular en macrófagos como la capacidad de colonizar ratones por *B. pertussis* [204, 205], indicando que la regulación post transcripcional de la expresión de los factores de virulencia mediada por Hfq es importante para la patogénesis de esta bacteria.

1.5.6. Factores de virulencia no regulados por el sistema BvgAS

No todos los factores de virulencia están regulados por el *locus* BvgAS. Existen factores de virulencia regulados independientemente del sistema BvgAS y otros de expresión constitutiva que se mencionan a continuación.

1.5.6.1. Citotoxina Traqueal (TCT)

La citotoxina traqueal (TCT) es un producto resultante de la degradación del peptidoglicano que es producido por todas las bacterias Gram-negativas y liberado durante el crecimiento. A diferencia de otras bacterias Gram-negativas, que reciclan el peptidoglicano por transporte al citoplasma por medio la proteína integral de membrana AmpG, *Bordetella* libera este producto al medio externo debido a que carece de dicha proteína [206, 207]. Por este motivo, TCT se expresa de forma constitutiva e independientemente del sistema BvgAS. TCT causa disfunción (ciliastosis) y muerte de células epiteliales ciliadas [208] resultando en la destrucción y extrusión de las mismas de la superficie epitelial [209]. La destrucción de las células ciliadas está relacionada con el incremento en la producción de óxido nítrico (NO) [210]. Se ha postulado que, *in vivo*, TCT estimula la producción de IL-1 α en células secretoras de *mucus* no ciliadas, lo cual

controla positivamente la expresión de la enzima NO sintetasa. Esto conduciría a una producción elevada de NO que luego difunde a las células ciliadas vecinas, más susceptibles a sus efectos tóxicos [210]. El óxido nítrico provoca el agotamiento del hierro intracelular lo cual deriva en la inactivación de enzimas que contienen hierro involucradas en la respiración mitocondrial y la síntesis de ADN. Como resultado de esta intoxicación celular, la unión entre células epiteliales se ve comprometida y ocurre la extrusión de células ciliadas.

1.5.6.2. Lipooligosacárido (LOS)

Como otras bacterias Gram-negativas, *B. pertussis* posee LPS en su membrana externa, una potente endotoxina bacteriana. El mismo está constituido por un lípido A pentaacilado anclado a la membrana externa que está unido a un complejo trisacárido central. *B. pertussis* no posee antígeno O (cadena de polisacáridos), característico del LPS de la mayoría de las bacterias Gram-negativas, por lo tanto el LPS de *B. pertussis* es llamado lipooligosacárido (LOS). El locus *wlb*, compuesto por doce genes (de *wlbA* a *wlbL*) codifica las enzimas involucradas en su biosíntesis y ensamblado [211]. El LOS de *B. pertussis* es pirogénico, mitogénico e histaminosensibilizante, siendo el lípido A de esta molécula la fracción endotóxica principal [212-214]. El LOS es responsable de la reactogenicidad y efectos adyuvantes de la vacuna celular. En contacto con células epiteliales, macrófagos y otras células del sistema inmune induce la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IL-12 y IL-8) lo cual conduce a la toxicidad sistémica o “shock inducido por endotoxina” [214]. Sin embargo, en comparación con el LPS de *B. bronchiseptica*, el LOS de *B. pertussis* es detectado de manera menos eficiente por el receptor TLR4 en ratones [215]. Asimismo, la estructura del LOS de *B. pertussis* sugiere que su capacidad para estimular TLR4 en humanos es aún más débil que su capacidad para estimular TLR4 en ratones [215]. Sobre la base de estas observaciones, se ha sugerido que *B. pertussis* ha evolucionado para causar una respuesta inflamatoria menor que *B. bronchiseptica*, que podría facilitar la persistencia durante la infección en humanos [215]. Además, la estructura del LOS protege a *B. pertussis* de los efectos de la proteína surfactante A (SP-A) presente en el epitelio respiratorio [216]. Posiblemente, la particular conformación (por ausencia de antígeno O) del LOS impide a SP-A interactuar con esta molécula obstaculizando la eliminación de la bacteria del tracto respiratorio. TCT

actúa sinérgicamente con LOS induciendo la producción de NO en el epitelio respiratorio [209].

1.5.7. Sistemas de captura de hierro

La gran mayoría del hierro de los vertebrados está secuestrado en la proteína de almacenamiento de hierro intracelular ferritina o está formando parte del grupo hemo como un cofactor de la hemoglobina o la mioglobina [217]. Además, el entorno aeróbico y el pH neutro del suero aseguran que el hierro extracelular sea insoluble y, por lo tanto, de difícil acceso por los patógenos invasores. Esta dificultad se ve reforzada por las proteínas transferrina y lactoferrina, que unen hierro con una afinidad muy elevada [217]. En conjunto, estos factores aseguran que la cantidad de hierro disponible para las bacterias invasoras sea mucho menor de lo que se requiere para promover su crecimiento [217]. Estos mecanismos activos de retención de hierro para prevenir el crecimiento bacteriano, junto con el secuestro de zinc y manganeso, forman parte de una de las primeras líneas de defensa del huésped contra la infección bacteriana denominada inmunidad nutricional [218]. Los microorganismos patógenos logran sobrevivir e infectar a expensas de sistemas de alta afinidad que le permiten obtener hierro a partir de las distintas fuentes que encuentran dentro del huésped. Estos sistemas son esenciales para la patogenicidad microbiana [219, 220]. *B. pertussis* posee varios sistemas que facilitan la adquisición de hierro en el hospedador (**Tabla 1.1**). Entre ellos se encuentra la producción del sideróforo alcaligina [221], el sistema de captura de xenosideróforos Bfe [222], el sistema de captura de hemo Bhu [223], los receptores de complejos hierro-catecolaminas BfrD y BfrE [224], y el sistema Ftr de captura de Fe^{2+} que incluye al transportador IRP1-3 [225].

Tabla 1.1: Receptores involucrados en la captura de hierro de *B. pertussis*.

Receptor	Fuente de hierro / Función
AlcABCDER – AlcS – FauA	Sideróforo alcaligina
BfeAB – BfeR	Xenosideróforos
BhuRSTUV – HurIR	Hemo
AfuA / FbpABC	Transporte periplásmico de Fe^{3+}
IRP1-3 / FtrABCD	Transporte periplásmico de Fe^{2+}
BfrD - BfrE	Catecoles y catecolaminas

1.5.7.1. Captura de hierro mediada por sideróforos

Los sideróforos son compuestos quelantes de hierro de bajo peso molecular que son secretados por bacterias y que unen Fe^{3+} con mayor afinidad que la transferrina y la lactoferrina [226]. *B. pertussis* produce el sideróforo tipo hidroxamato alcaligina [221]. El grupo de genes que codifica este sistema de captura se compone de cuatro unidades transcripcionales distintas: *alcABCDER*, que codifica enzimas involucradas en la biosíntesis del sideróforo; *alcR*, que codifica un regulador transcripcional inducible por alcaligina [227-229]; *alcS*, que codifica para la proteína exportadora de alcaligina [230]; y *fauA*, que codifica para un receptor de membrana externa que transporta la alcaligina férrica al interior celular [231]. En condiciones de limitación de hierro la expresión de *alcABCDER* y de *fauA* es inducida por el factor de transcripción Fur (del inglés, *ferric uptake regulator*) [232]. El ingreso de alcaligina férrica al interior de la bacteria, mediado por el receptor FauA, requiere del sistema TonB [227, 228, 231]. El complejo TonB-ExbB-ExbD, referido como sistema TonB, interactúa con la mayoría de los receptores de membrana externa involucrados en la captura de hierro y provee la energía requerida para la transferencia de este metal al periplasma [233, 234]. La expresión del operón *tonB-exbBD* de *B. pertussis* se activa también en condiciones de limitación en hierro [235].

Alternativamente, los microorganismos pueden utilizar sideróforos producidos por otros organismos, llamados en este caso xenosideróforos [236]. *B. pertussis* no produce sideróforos de naturaleza catecol, como enterobactina, pero es capaz de capturar estos sideróforos sintetizados por otras especies bacterianas como xenosideróforos [222]. La adquisición de un nutriente limitante como el hierro sin el costo energético de la biosíntesis y secreción de un sideróforo representa una ventaja competitiva importante para la bacteria, especialmente considerando que la afinidad por hierro de la enterobactina es mayor que la de la alcaligina. *B. pertussis* produce el receptor de membrana externa BfeA que junto con la proteína hidrolítica BfeB están involucrados en el transporte y utilización de sideróforos catecoles [222]. La expresión de *bfeAB* es aumentada por el regulador específico BfeR, que utiliza enterobactina como cofactor [237], en un mecanismo de inducción por sustrato. En condiciones de limitación de hierro la expresión del sistema de captura de enterobactina es inducida por el factor de transcripción Fur [238].

Una vez en el periplasma, el complejo sideróforo-hierro es reconocido y transportado al citoplasma principalmente por transportadores ABC [219]. En *B. pertussis*, los sistemas de captura de hierro que utilizan alcaligina o xenosideróforos

convergen en un receptor periplasmático denominado AfuA [239] (también llamado FbpA [125]), el cual es parte de un sistema de la familia ABC requerido para transportar este metal desde los receptores de membrana externa hacia el citoplasma [125, 240].

1.5.7.2. Adquisición de grupos hemo

B. pertussis puede utilizar hemina (grupo hemo) y hemoglobina como fuente de hierro mediante un mecanismo dependiente de TonB [235, 241]. Los genes que codifican las proteínas involucradas en el transporte y utilización de estos compuestos se agrupan en el grupo *hurIR* (del inglés, *heme uptake regulator*) y *bhuRSTUV* (del inglés, *bordetella heme utilization*) [223, 242]. Los genes *bhu* de *B. pertussis* codifican proteínas necesarias para el transporte y la utilización de grupos hemo. Por otro lado, los genes *hurIR* están involucrados en aumentar la transcripción de los genes *bhu* sólo en presencia de grupos hemo, mientras que Fur regula la expresión de este sistema sólo en limitación de hierro. BhuR es el receptor de membrana externa para moléculas de hemina, que forman parte de la estructura de hemoproteínas como hemoglobina o mioglobina [223].

1.5.7.3. Receptores de complejos hierro-catecolaminas

Los neuroquímicos del huésped de tipo catecolaminas, como la epinefrina y norepinefrina, pueden capturar transitoriamente el hierro contenido en las glicoproteínas transferrina y lactoferrina [243]. *B. pertussis* posee los receptores BfrD y BfrE que pueden capturar los complejos de hierro-catecolaminas para utilizarlos como fuente de este metal [244]. De esta manera, esta bacteria utilizaría como xenosideróforos moléculas propias del huésped para suplir sus necesidades de hierro.

1.5.7.4. Captura de hierro en estado ferroso

Los microorganismos también cuentan con transportadores de hierro en estado ferroso (Fe^{2+}), que puede ser incorporado sin el uso de intermediarios debido a que este estado de oxidación es relativamente soluble en comparación al estado Fe^{3+} [245]. La estabilidad del estado Fe^{2+} es favorecida en condiciones anaeróbicas y/o de pH ácido [245]. El único receptor de Fe^{2+} caracterizado en *B. pertussis* es IRP1-3 (también llamado FtrA) que forma parte de un sistema transportador de hierro de alta afinidad codificado en el operón *ftrABCD* [225]. Este sistema de captura se induce en limitación de hierro o

en entornos con pH ácido [225]. Esta última condición, como se mencionó anteriormente, favorece la estabilidad del estado de oxidación Fe^{2+} .

1.6. Vacunación

Entre 1940 y 1950, se introdujo la primera vacuna contra pertussis, compuesta por células enteras de *B. pertussis* en fase virulenta inactivadas por calor o tratamientos químicos (P), formulada en combinación con el toxoide tetánico (T) y diftérico (D), que se denominó triple bacteriana (DTP). Esta vacuna, aunque efectiva en disminuir la incidencia, presenta efectos adversos de distinta magnitud, como dolor local, fiebre, y encefalopatías e incluso causar la muerte en 1 de cada 310.000 vacunados. El principal factor desencadenante de estos efectos nocivos es el lipooligosacárido (LOS) de *B. pertussis* presente en estas formulaciones. Estas reacciones adversas desencadenaron una disminución de la aceptación de la vacuna en distintos países e incluso en países tales como Gales, Inglaterra y Japón se detuvo la vacunación contra la tos convulsa. Esto desencadenó una epidemia entre 1977 y 1979 en los tres países mencionados [246, 247] y condujo al desarrollo de nuevas vacunas acelulares (Pa) más seguras, formuladas a partir de factores de virulencia purificados de *B. pertussis*. La primera vacuna Pa fue desarrollada en Japón por Sato y colaboradores en la década de 1970 [248] y estaba formulada con proteínas de *B. pertussis* copurificadas, que comprendían esencialmente la toxina pertussis (PT) y la hemaglutinina filamentosa (FHA). Posteriormente, se desarrollaron nuevas vacunas compuestas de antígenos purificados individualmente. En la actualidad, la mayoría de los países industrializados utilizan vacunas acelulares, que combinan el toxoide diftérico (D) y tetánico (T) con antígenos purificados de *B. pertussis* (DTPa). Las vacunas actualmente en uso son una combinación de FHA, PT, pertactina (Prn), y fimbrias (Fim). Las diferentes vacunas acelulares contra *B. pertussis* difieren básicamente en el número de antígenos que incluyen. Las monovalentes (solo PT), las bivalentes (PT + FHA), las trivalentes (PT + FHA + Prn) y las pentavalentes (PT + FHA + Prn + Fim2 y Fim3). Estudios epidemiológicos llevados a cabo en varios países sugieren que, en general, las vacunas con tres o más componentes son más eficaces contra los casos típicos de pertussis o con sintomatología leve que las formulaciones que sólo contienen PT, o PT más FHA [1].

Como se mencionó previamente, el aumento sostenido en el número de casos de tos convulsa ha llevado a que la enfermedad haya sido declarada remergente. Distintos factores parecen haber contribuido a esta remergencia, entre los cuales se destacan factores relacionados con las vacunas actualmente en uso. Por un lado, la inmunización con vacunas celulares, al igual que lo que sucede durante la infección natural, induce un perfil de citoquinas predominantemente Th1/Th17, mientras que en la inmunización con vacunas acelulares el perfil de citoquinas es tipo del tipo Th1/Th2 [249-252], una respuesta inmune desfasada con respecto a la infección natural. En este sentido, estudios de evaluación de la eficacia de las distintas vacunas en humanos señalan que las vacunas celulares presentan una mayor protección contra *B. pertussis* que las acelulares. Varios estudios indican que la vacuna celular presenta una eficacia próxima al 95% [253-256], mientras que estudios similares de vacunas acelulares indicaron una mayor variación en los porcentajes de eficacia, con valores que comprenden entre un 59% hasta un 83% de eficacia [253, 256-258]. Resultados similares fueron obtenidos en ensayos de protección en modelos animales [259, 260].

La inmunidad adquirida por vacunación confiere protección solo durante un corto plazo [261], que es menor al inducido por la infección [262], que luego decae en el tiempo (*waning immunity*). En el caso de la vacuna celular, la inmunidad comienza a declinar luego de 3 a 5 años, con ausencia de protección luego de 10 a 12 años [263]. La duración de la inmunidad conferida por la vacuna acelular declinaría luego de 4 a 5 años [263, 264], y la duración de la protección sería menor que la inducida por la vacuna celular [262]. Esto determina que la población adulta no se encuentre eficazmente protegida contra la infección, aunque hayan sido inmunizados con vacuna celular o acelular y tengan el esquema de vacunación obligatoria completo.

Por otro lado, numerosos estudios han demostrado que las poblaciones de *B. pertussis* cambiaron después de la introducción de la vacunación, lo que sugiere una adaptación del patógeno [144]. Estas adaptaciones no implicaron la adquisición de nuevos genes, sino pequeños cambios genéticos que se produjeron en pasos sucesivos en un período de 40 años [144]. De manera similar a lo observado en otros países, relevamientos realizados en Argentina demostraron que las cepas circulantes en la población presentan variaciones polimórficas respecto a la cepa vacunal en regiones inmunodominantes de los principales antígenos presentes en las vacunas acelulares, como son toxina pertussis (PT) y pertactina (Prn) [265]. Más aún, se observó que las variantes polimórficas

predominantes en nuestro país son las mismas que en el resto del mundo [265, 266], lo cual sustenta la hipótesis de la inmunoselección de cepas circulantes dirigidas por vacunación. La inmunoselección de cepas dirigida por vacunación ha determinado, incluso, la aparición de cepas circulantes que presentan eliminaciones en algunos de los antígenos que componen las vacunas acelulares [145-147], lo cual evidentemente disminuye aún más la eficacia de las vacunas. En particular, un elevado porcentaje de las cepas circulantes en Europa carecen de Prn [267]. Un aspecto particularmente interesante es que se ha podido comprobar que esta diseminación no ha sido causada por expansión clonal sino por el surgimiento simultáneo e independiente de cepas defectivas lo cual apoya la hipótesis de presión de selección por inmunización [268]. A estas causas posibles de la falta de eficacia de las vacunas en uso se agrega un hallazgo relativamente reciente. Se ha observado que las condiciones de entorno previas y durante la transmisión de hospedador a hospedador inducen la disminución de la expresión de casi todos los antígenos vacunales en el fenotipo infectante [192, 193].

Recientemente se ha aprobado para su uso en algunos países, entre los que se incluyen Estados Unidos, Australia, Canadá, Francia, Alemania, Suiza, y desde el año 2009 Argentina, el uso de formulaciones vacunales acelulares seguras para adolescentes y adultos, denominadas Tdap, que difieren de la utilizada para infantes (DTPa) porque contienen cantidades menores de toxoide diftérico y de antígeno pertussis. Según *The Global Pertussis Initiative*, un grupo de expertos de diferentes países que han formado un comité de seguimiento epidemiológico de pertussis, la vacunación de adolescentes y adultos no sólo disminuiría la incidencia de la enfermedad, sino que reduciría el riesgo de contagio a niños no inmunizados o con esquemas de vacunación incompletos [269]. El objetivo principal de las estrategias de vacunación contra *B. pertussis* es proteger a los infantes y neonatos, en los cuales la enfermedad es severa, pudiendo provocar la muerte. Debido a que distintos estudios indican que anticuerpos maternos son capaces de conferir protección contra pertussis en el recién nacido [270] la inmunización con Tdap durante el embarazo puede contribuir a disminuir los casos de tos convulsa en neonatos [271].

En Argentina, la inmunización contra pertussis comenzó en la década de 1960 [272]. Actualmente, como en la mayoría de los países en vías de desarrollo, se continúa utilizando la vacuna celular que se administra junto con el toxoide tetánico y diftérico (DTP), el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HB) y el polisacárido de *Haemophilus influenzae* serotipo b (Hib), formando la vacuna pentavalente (DTP-HB-

Hib). De acuerdo con el Calendario Nacional de Vacunación la misma se aplica en tres dosis que se administran a los 2, 4 y 6 meses de edad. A los 18 meses se administra un primer refuerzo con la vacuna cuádruple bacteriana (DTP-Hib) de igual composición que la vacuna pentavalente con excepción del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. Finalmente, a la edad de ingreso escolar (5-6 años) se administra un segundo refuerzo con la vacuna DTP. Como se mencionara anteriormente, en el año 2009 el esquema de vacunación se amplió para incluir una inmunización con Tdap a los 11 años de edad para disminuir la incidencia de la enfermedad en adolescentes y reducir el posible contagio a niños no inmunizados. Asimismo, a partir del año 2012, para disminuir la morbimortalidad en menores de 6 meses de edad, se incorporó la vacunación obligatoria con Tdap a embarazadas a partir de la semana 20 de gestación, a personal de salud que está en contacto con niños menores de 1 año y a familiares de bebés prematuros que pesen menos de 1,5 kg al momento de nacer [272]. Las dosis adicionales recientemente agregadas al calendario de vacunación tienen como objetivo aumentar la inmunidad de grupo (*herd immunity*), que permite la resistencia a la propagación de una enfermedad contagiosa dentro de una población cuando una proporción suficientemente alta de individuos es inmune a la enfermedad. En este contexto, el agregado de la vacunación durante el embarazo y a los 11 años de edad es debido a que la principal fuente de contagio de tos convulsa en infantes es un miembro de la familia, principalmente la madre, seguida de los hermanos [38]. Un estudio reciente indica que en Argentina la introducción del refuerzo con vacuna Tdap durante el embarazo produjo una disminución pronunciada en las tasas de mortalidad por pertussis [272].

Como se mencionó anteriormente, las vacunas actuales, tanto celulares como acelulares, si bien protegen contra la sintomatología de la enfermedad, no confieren protección contra la colonización por *B. pertussis*, permitiendo que se establezcan infecciones subclínicas y portadores asintomáticos que transmiten la enfermedad a individuos susceptibles. La vacunación regular de adultos está siendo propuesta en muchos países como forma de controlar mejor esta enfermedad. Esta medida, aunque potencialmente contribuya a disminuir la incidencia de esta enfermedad, probablemente no logre erradicarla definitivamente de la población, continuando vigente el problema de base, es decir, la falta de protección contra la colonización. En este sentido, la búsqueda de nuevos inmunógenos y/o nuevas formulaciones que protejan eficientemente contra la infección de pertussis sigue siendo prioritaria, para lo cual es indispensable conocer las

características del fenotipo infectante, la patogénesis y el ciclo infeccioso de este patógeno.

En los últimos años se han considerado varias estrategias para el desarrollo de la nueva generación de vacunas contra la tos convulsa, que incluyen: la adición de nuevos antígenos a las vacunas acelulares actuales, la repolarización de la respuesta Th2 del huésped provocada por el adyuvante de aluminio presente en las vacunas acelulares a una respuesta Th1/Th17 cambiando el adyuvante y/o agregando nuevos antígenos, o la reintroducción de las vacunas celulares (vivas atenuadas o muertas) ya sea como inmunización primaria o como un refuerzo que modifique la polarización de la respuesta inmune [273]. Así, se ha propuesto al autotransportador BrkA como posible componente de nuevas vacunas acelulares [274]. Ensayos en un modelo murino demuestran que, si bien la inmunización con BrkA es incapaz de conferir protección contra la infección, la combinación de la misma con FHA y PT mejora la protección conferida por vacunas formuladas con estos dos antígenos [274]. Sin embargo, el agregado de BrkA a la vacuna acelular de tres componentes (FHA, PT y Prn) no mejora su capacidad de protección [274]. Una estrategia de vacunación alternativa propuesta recientemente se basa en la inmunización intranasal con una cepa viva atenuada de *B. pertussis*, denominada BPZE1, en la cual tres toxinas diferentes (PT, TCT y DNT) se han inactivado o reducido su expresión mediante ingeniería genética [14]. Se ha demostrado que esta cepa es segura en modelos preclínicos y genéticamente estable durante al menos un año de pasajes continuos *in vitro* e *in vivo* en ratones [275]. La administración de una única dosis nasal de esta vacuna provee inmunidad a largo plazo contra la infección por *B. pertussis* en un modelo murino [276]. La ventaja de esta vacuna es que su uso induce inmunidad a nivel de mucosas, que sería crucial para prevenir la colonización por esta bacteria [275]. Asimismo, se ha demostrado recientemente que el uso de esta vacuna evita la colonización y enfermedad por *B. pertussis* en babuinos [277], un modelo animal más relevante que el murino. De cualquier manera, existe cierta preocupación en la comunidad respecto al uso de esta vacuna. Siendo una vacuna de bacteria atenuada no está clara la dinámica de propagación que podría generarse, ni como se controlaría su eventual reversión a la virulencia. También se ha propuesto el uso de vesículas de membrana externa (OMVs) derivadas de *B. pertussis* como un candidato vacunal multiproteico [278], que serían más seguras que las vacunas celulares actuales debido a su menor

contenido de lipooligosacárido (LOS) [279], sin embargo, no pueden considerarse acelulares ni usarse en adultos por su contenido de LOS.

Nuestro grupo de trabajo, con el objetivo de identificar nuevos inmunógenos protectores y empleando proteómica comparativa combinando con inmunoproteómica, logró identificar dos antígenos denominados AfuA e IRP1-3 expresados en limitación de hierro [239], un fenotipo que se asemeja al infectante. Nuestros estudios han demostrado que ambas proteínas son capaces de inducir anticuerpos opsonizantes, cruciales en la actividad bactericida celular contra este patógeno [141], y que la inmunización en formulaciones monovalentes genera protección contra la infección con *B. pertussis* [280, 281]. Más importante aún, el agregado de ambos antígenos a las vacunas actuales mejora su capacidad de protección contra la infección [280, 281]. Actualmente, ambos antígenos se encuentran en etapas de evaluación preclínica en ensayos en primates no humanos.

1.7. Epidemiología

En países con tasas de vacunación altas, se ha observado un cambio en la epidemiología de pertussis, registrándose un aumento en la incidencia de la enfermedad entre adolescentes y adultos, quienes como se ha mencionado previamente han perdido la inmunidad por vacunación, y en infantes menores de 6 meses, quienes aún no tienen el esquema de vacunación completo [282]. La proporción de casos en pacientes mayores de 10 años de edad declarados por la agencia estadounidense CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) a finales de 1970 fue de 15,1%, mientras que en 1990 este número aumentó a 26,9% y en 2000 a 49% [283]. El aumento de la incidencia de la tos convulsa en adolescentes y adultos se explica en parte dado que la inmunidad generada por las vacunas utilizadas en la actualidad decae más rápidamente que la inmunidad inducida por vacuna celular o infección natural [262]. Este decaimiento de la inmunidad luego de la vacunación (*waning immunity*), combinado con la ausencia de refuerzos regulares, ya sea mediante vacunación o exposición a la bacteria, explicaría este cambio en el rango etario de la incidencia de la tos convulsa [282].

En la era prevacunal, las epidemias por pertussis ocurrían a nivel mundial y presentaban un patrón cíclico, con picos de incidencia cada 2 a 5 años [284]. La enfermedad afectaba principalmente a niños, los que representaban la mayor fuente de transmisión. Los adultos recibían refuerzos por repetidas exposiciones a la bacteria.

Durante el embarazo, las madres transferían anticuerpos al feto a través de la placenta, quienes, una vez nacidos, resultaban vulnerables a la infección cuando el nivel de estos anticuerpos decaía. Esto determinó que la tos convulsa fuera una de las mayores causas de mortalidad infantil en todo el mundo. Registros de Estados Unidos indican que sólo en ese país el número de casos reportados por año ascendía a más de 200.000 [285]. La introducción de la vacuna celular entre los años 1940 y 1950, condujo a una drástica disminución en la incidencia de la enfermedad [285, 286]. Como consecuencia de la vacunación masiva a nivel mundial, la circulación de *B. pertussis* disminuyó, por lo que adolescentes y adultos dejaron de recibir el refuerzo de la inmunización por infección. De esta forma, comenzó a observarse un aumento en el número de casos en adolescentes y adultos, debido a la corta duración de la inmunidad generada por vacunación, y por lo tanto en neonatos, quienes no reciben una adecuada inmunización pasiva desde la madre [37]. Existen estudios que indican que esta población de individuos adultos infectados constituye un reservorio importante de *B. pertussis* [37, 287] y que son fuente de transmisión de este patógeno para los lactantes y niños con esquemas de vacunación incompletos [35, 288-290].

La inmunización por vacunación a nivel mundial, tanto con vacuna celular [291] como acelular [292], no ha modificado el patrón cíclico de aparición de picos epidémicos de la tos convulsa ni el período que transcurre entre dichos picos, lo que sugiere que las vacunas de uso actual controlan la enfermedad, evitando la sintomatología asociada a la fase tóxica, pero no logran disminuir adecuadamente la circulación de *B. pertussis* en la población [291]. Estudios recientes realizados en un modelo babuino, que muestra mayores similitudes con la infección en humanos en comparación a los modelos murinos, confirmaron que la inmunización con vacuna acelular protege contra los síntomas severos de la enfermedad pero no previenen la infección ni la transmisión de *B. pertussis* [293].

La situación epidemiológica en Argentina es similar a la del resto del mundo, aunque había pasado inadvertida por años debido a la falta de notificación obligatoria. Nuestro grupo estuvo involucrado en el relevamiento de *B. pertussis* en Argentina desde el año 2002. Desde entonces se organizó a través del Programa de Vigilancia de la Salud y Control de las Enfermedades (VIGIA) del Ministerio de Salud de la Nación el relevamiento epidemiológico de esta enfermedad y la búsqueda sistemática de casos sospechosos. El relevamiento epidemiológico permitió detectar un incremento importante y sostenido en el número de casos reportados registrándose un brote muy importante de

pertussis en la provincia de Neuquén en el año 2005 [266]. Posteriormente se registró un nuevo brote en esta provincia y otro brote en la provincia de Chaco. Los principales afectados fueron niños menores de 6 meses con esquemas de vacunación incompletos. Sin embargo, también se observó un incremento en el número de casos en adolescentes y adultos [266]. De acuerdo con el Boletín Integrado de Vigilancia del Ministerio de Salud, durante el período 2010-2016, se produjeron dos brotes de tos convulsa, uno en 2011 y otro en 2016 (**Figura 1.3**). En el primero, la incidencia fue de 6,9 cada 100.000 habitantes y la tasa de letalidad fue del 2,6%. A partir de entonces, se detectó un descenso en la incidencia hasta 2014. Durante 2015 y 2016 se produjo un aumento en la incidencia (2,2 y 3,9 cada 100.000 habitantes, respectivamente), pero este aumento afortunadamente no estuvo acompañado de un aumento en la tasa de letalidad (1,0% y 0,6%, respectivamente). Se ha sugerido que la disminución en la tasa de letalidad y la incidencia máxima en los brotes es debido a la implementación de la inmunización maternal obligatoria con Tdap a partir del año 2012 [294]. En términos de la distribución de casos confirmados con respecto a la edad hospitalaria durante el período 2010-2016, del total de casos confirmados cada año, 25-29% correspondió a bebés de menos de 2 meses de edad y 62-89% a bebés de menos de 6 meses. La mayoría de los casos de pertussis notificados entre 2010 y 2016 correspondieron a las provincias más pobladas, como Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe y Mendoza [272].

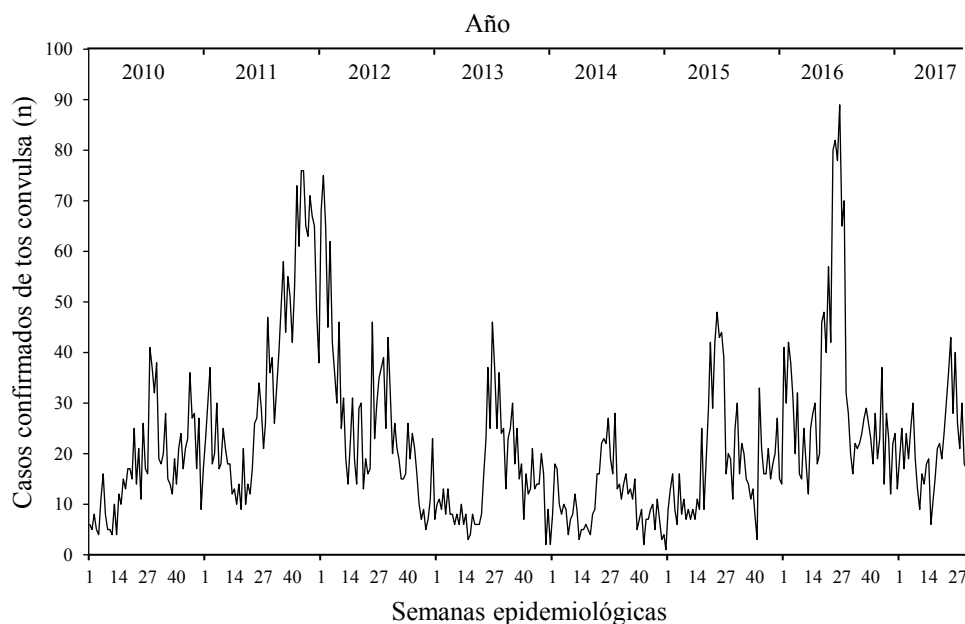


Figura 1.3: Número de casos confirmados de tos convulsa en Argentina durante el período 2010-2017. Datos actualizados al 23 de agosto de 2017. Datos recopilados del Boletín Integrado de Vigilancia N° 203, N° 257, N° 309, N° 355 y N° 379; Ministerio de Salud.

Además, como se mencionó anteriormente, de manera similar a lo observado en otros países, relevamientos realizados en Argentina demostraron que las cepas circulantes en la población presentan variaciones polimórficas respecto a la cepa vacunal en regiones inmunodominantes de los principales antígenos presentes en las vacunas [265]. Los estudios realizados hasta el momento no permiten atribuir la reemergencia a la aparición de cepas con variantes en los antígenos vacunales, pero en sí misma, la aparición de variantes antigénicas demuestra que *B. pertussis* nunca ha dejado de circular en la población, ni siquiera en poblaciones con un elevado estándar de vida y coberturas de vacunación cercanas al 100%, como es el caso de Europa, Estados Unidos y Canadá, entre otros.

1.8. Patogénesis

La colonización del epitelio por un patógeno implica una compleja serie de eventos entre los que se incluye la adhesión, la evasión de las defensas del huésped, la multiplicación bacteriana, seguida generalmente de daño tisular y la eventual invasión celular que finalmente podría conducir a la persistencia del microorganismo dentro del hospedador. Estos eventos son modulados por la interacción de los factores de virulencia

con los receptores celulares del hospedador, un fenómeno multifactorial y dinámico donde las señales se transmiten desde el patógeno hacia el hospedador y viceversa.

En el caso de *B. pertussis*, la infección se inicia con la adhesión a las células epiteliales del tracto respiratorio superior. Si bien varios factores de virulencia regulados por BvgAS han sido señalados como potenciales adhesinas (FHA, Fim, PT, TcfA, BrkA, Vag8 y Prn) [295], numerosos estudios han demostrado que FHA es la adhesina más importante de *B. pertussis* en fase virulenta [98-100, 104]. Otro evento primario durante la colonización por *B. pertussis* es la inducción de la pérdida de movimiento de las células ciliadas del epitelio respiratorio (ciliastosis) la cual, junto con el daño al epitelio respiratorio y la acumulación de *mucus*, dificulta la eliminación de este microorganismo. El daño local de las células epiteliales se debe a la acción de TCT, LOS y DNT, y en menor medida a CyaA [165, 296]. Se ha postulado que la expresión del autotransportador con actividad proteasa SphB1 facilitaría el corte de FHA en la membrana externa bacteriana posibilitando la dispersión de *B. pertussis* desde las microcolonias iniciales a nuevos sitios de infección en el tracto respiratorio [96]. El síntoma característico de la enfermedad es la tos paroxística, la cual parecería ser causada por daño tisular local. Sin embargo, el período de duración de la tos es mayor que el que dura el daño tisular, por lo que probablemente existan otros factores de virulencia, aún no identificados, que contribuyan a la persistencia de los síntomas.

Con respecto a la adquisición de hierro en el tracto respiratorio, la interacción de *B. pertussis* con su hospedador produce característicamente inflamación, activación de la respuesta inmune y daño tisular, que conduce a cambios en la fuente de hierro que la bacteria encuentra a lo largo del curso de la infección [232]. Una característica importante de los sistemas de adquisición de hierro de *B. pertussis* es que en su mayoría son regulados por la presencia de la fuente de hierro específica que capturan, un mecanismo utilizado para integrar la información que procede de las condiciones de entorno del patógeno, de modo de priorizar la expresión de sistemas de captura de hierro más efectivos [232]. Se ha demostrado que la expresión del receptor del sideróforo alcaligina (FauA), el receptor del xenosideróforo enterobactina (BfeA) y el receptor de hemo (BhuR) es crítica para la supervivencia de *B. pertussis* y la colonización del hospedador, aunque en diferentes etapas de la infección [232]. El sistema alcaligina tiene un papel crucial en la colonización inicial y durante todo el curso de la infección [297]. La captura de xenosideróforos por BfeA, que podría capturar enterobactina producida por bacterias comensales del tracto

respiratorio superior o bien un compuesto producido por el huésped con similitud estructural a la enterobactina [232], contribuye significativamente al crecimiento inicial, pero en menor medida que el sistema alcaligina, y su función disminuye después del pico de multiplicación bacteriana observado en el modelo murino de infección [298]. En cambio, el sistema de captura de hemo no es necesario para la supervivencia hasta después del pico del crecimiento de *B. pertussis*, sugiriendo que es utilizado en tiempos tardíos de infección [299]. Estos resultados se explican teniendo en cuenta que a medida que progresa la infección, la extravasación de células inmunes, eritrocitos y suero a la superficie de la mucosa se ve exacerbada. El suero y la lisis celular proveen nuevas fuentes de hierro para la bacteria, como por ejemplo transferrina o compuestos con grupos hemo tales como hemoglobina. El hierro de la transferrina y lactoferrina puede ser adquirido a partir del sideróforo alcaligina [300, 301] o a partir de compuestos catecoles como las catecolaminas del huésped utilizando los receptores BfrD y BfrE [224]. Por último, las superficies del epitelio respiratorio se acidifican bajo condiciones inflamatorias [302, 303], un entorno que favorece la estabilidad del estado Fe^{2+} , que podría ser capturado por el transportador IRP1-3 [225].

También se ha propuesto que *B. pertussis* es capaz de formar biopelículas (*biofilms*) como un mecanismo de patogénesis que promueve su persistencia en el hospedador [304, 305]. El *biofilm* se define como una comunidad de microorganismos sésiles, es decir, células que están adheridas a una superficie y/o unas con otras, embebida en una matriz de sustancia polimérica extracelular (EPS) que les confiere resistencia [306]. La capacidad de desarrollar *biofilm* puede contribuir a la patogénesis y desempeñar un rol importante en la evasión de los mecanismos de inmunidad y en la persistencia a largo plazo dentro del hospedador. Así como ocurre con otros determinantes de virulencia en *B. pertussis*, el desarrollo de *biofilm* está regulado por el sistema BvgAS, al menos *in vitro* [307]. Estudios recientes han mostrado evidencia de formaciones de *biofilm* en la cavidad nasofaríngea en modelos animales [308, 309]. Cabe destacar que los aislados clínicos recientes de *B. pertussis* presentan una capacidad incrementada de formación de biopelículas en comparación a las cepas de referencia de laboratorio [310, 311], un resultado que podría indicar que ha habido una evolución hacia la promoción de mecanismos de persistencia en las cepas circulantes.

Parte del éxito de este patógeno de difícil erradicación son los múltiples mecanismos de evasión del sistema inmune del hospedador, mediada principalmente por

la acción de CyaA y PT. Específicamente, CyaA ingresa a neutrófilos y provoca la intoxicación de la célula mediante la producción elevada de cAMP, comprometiendo de esta forma su capacidad fagocítica. Por otro lado, PT retarda la migración de neutrófilos al sitio de infección mediante la modulación de producción de citoquinas y quimioquinas en células epiteliales y macrófagos e inhibe la activación de células inmunes [69]. Además de PT, TCT también contribuye a inhibir la quimiotaxis de neutrófilos, al menos *in vitro* [296]. Como consecuencia de los efectos de CyaA, PT y, tal vez TCT, *B. pertussis* podría evadir la inmunidad innata temprana durante la colonización. Como resultado de las múltiples estrategias de inmunoevasión de *B. pertussis*, y a la vez como parte de ellas, este patógeno podría tener una forma de persistencia dentro de células del hospedador, tal como se detalla más adelante.

B. pertussis es un patógeno estrictamente humano sin reservorios conocidos por fuera del hombre. La circulación permanente de este patógeno en la población sugiere la existencia de períodos transitorios o prolongados de infección asintomática [1, 312]. La localización de *B. pertussis* dentro del hospedador se desconoce, lo cual ha dificultado el desarrollo de estrategias preventivas eficaces que permitan erradicar definitivamente este patógeno de la población. Existía cierta evidencia experimental que indicaba que *B. pertussis* es capaz de ingresar a diferentes tipos celulares incluyendo macrófagos, neutrófilos y células epiteliales respiratorias [101, 313-316], lo que podría suponer un mecanismo de persistencia del microorganismo. En humanos, *B. pertussis* ha sido encontrada en macrófagos alveolares aislados de niños coinfectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [317] y en infantes en los cuales se ha confirmado neumonía provocada por *B. pertussis* [41], sugiriendo que este tipo celular podría constituir un reservorio de esta bacteria. La necesidad de una respuesta celular tanto como la de una respuesta humoral para combatir a esta enfermedad parece apoyar esta hipótesis [318]. Pese a la relevancia a nivel epidemiológico y en el desarrollo de vacunas que tendría la existencia de un nicho de persistencia intracelular en *B. pertussis*, prácticamente no hay trabajos que hayan investigado acabadamente esta posibilidad.

Nuestro grupo de investigación ha trabajado en los últimos años en esclarecer los aspectos referidos a la invasión y sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en células del hospedador. En este sentido, hemos demostrado que en ausencia de anticuerpos opsonizantes *B. pertussis* sobrevive a la interacción con neutrófilos al inhibir tanto el estallido respiratorio como su propio tráfico a lisosomas permaneciendo viable en

localización intracelular [142]. Esta inhibición es dependiente de la adhesión e internalización de *B. pertussis* a través de dominios tipo balsas lipídicas ricos en colesterol (*lipid rafts*) en la membrana del neutrófilo a las que esta bacteria se une a través de FHA [319]. *B. pertussis* inhibe también los mecanismos bactericidas extracelulares de los neutrófilos, como son la degranulación [319] y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), en un mecanismo dependiente de CyaA [320]. Con respecto a la interacción de *B. pertussis* con las células del epitelio respiratorio, se demostró que la limitación en hierro, condición de entorno durante la infección, aumenta la adhesión de *B. pertussis* a este tipo celular [321]. Asimismo, *B. pertussis* es capaz de invadir las células epiteliales en un mecanismo dependiente del ensamblado de microtúbulos, la integridad de las balsas lipídicas y la señalización por tirosina quinasas de la célula huésped [108]. Una vez dentro de las células epiteliales, *B. pertussis* evade la fusión fagolisosomal y permanece viable en compartimentos no ácidos, siendo capaz de egresar de la célula huésped para repoblar el medio extracelular [108]. Con respecto a las células de la inmunidad innata, *B. pertussis* no sólo es capaz de evadir la acción bactericida de neutrófilos sino también de los macrófagos. Nuestros estudios demostraron que en ausencia de anticuerpos opsonizantes *B. pertussis* es capaz de evadir la fusión fagolisosomal dentro del macrófago, permanecer viable y eventualmente duplicar en compartimentos con acceso a nutrientes y con características de endosomas tempranos [322]. Hemos demostrado que *B. pertussis* interfiere con la respuesta defensiva del macrófago interfiriendo con la transcripción de genes involucrados en la respuesta inflamatoria y bactericida del macrófago [90]. Esta manipulación de la respuesta celular involucra dos de las principales toxinas de esta bacteria, PT y CyaA [90].

La sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* puede significar ventajas sustanciales para la misma además de protegerla contra los distintos efectores inmunes. Durante la respuesta proinflamatoria inducida por la infección, un nicho intracelular permitirá que la bacteria se mantenga viable hasta que la reacción inflamatoria sea modulada por los distintos mecanismos antiinflamatorios, permitiéndole emerger en condiciones de entorno más permisivas. Alternativamente, los macrófagos podrían transportar las bacterias a nuevos sitios del huésped donde iniciar nuevas microcolonias, en un mecanismo de tipo caballo de Troya [323, 324]. En apoyo de esta hipótesis hemos encontrado *B. pertussis* en hígado y en bazo durante la infección empleando un modelo murino (resultados aún no publicados). *B. pertussis* no es una bacteria invasiva que pueda

ser aislada de sangre y estos resultados sugieren que podría ser trasladada por macrófagos hasta estos sitios.

1.9. Inmunidad

El desarrollo de inmunidad requiere del reconocimiento de los componentes bacterianos por las células implicadas en la inmunidad innata, la producción de mediadores solubles, y el reclutamiento y activación de moléculas y células efectoras. Un modelo ampliamente utilizado para estudiar la inmunidad contra *B. pertussis* es la infección respiratoria de ratones [325]. Los resultados obtenidos con este modelo deben ser analizados cuidadosamente, ya que la tos, que es el síntoma prototípico de la tos convulsa, está ausente en dicho modelo y los hallazgos patológicos pulmonares son diferentes de los observados en humanos [326]. Sin embargo, el curso de la infección y muchos de los efectos sistémicos de la tos convulsa, como la leucocitosis y la hipoglucemia, son similares a los observados en humanos [327]. Además, los mecanismos inmunes inducidos en ratones infectados coinciden con los observados en humanos infectados, así como con el modelo babuino de infección desarrollado recientemente [326]. Cuando *B. pertussis* coloniza la mucosa del tracto respiratorio en el modelo de infección murino se desencadena una respuesta local de citoquinas proinflamatorias [328, 329] que conlleva al reclutamiento de células del sistema inmune al sitio de la infección. Generalmente, los neutrófilos son las primeras células que llegan, seguidos de una segunda ola compuesta de células *natural killer* (NK), macrófagos, células dendríticas (DCs) y linfocitos [330-334]. Sin embargo, ciertos factores de virulencia de la bacteria limitan esta respuesta inflamatoria local. Por ejemplo, como se mencionó anteriormente, las toxinas PT y TCT producidas por *B. pertussis* inhiben el tráfico de células inmunes al tracto respiratorio [69, 335]. Por otro lado, CyaA y FHA inducen la secreción de citoquinas antiinflamatorias, como IL-10, que limitan la respuesta local [336-338]. En el tracto respiratorio murino, *B. pertussis* es eventualmente reconocida y capturada por células presentadoras de antígenos, entre las que se encuentran las células dendríticas y macrófagos, que procesan y presentan los antígenos bacterianos a las células T, induciendo la generación de una respuesta inmune adaptativa [318].

Tanto la inmunidad celular como la humoral juegan un rol importante en la eliminación de la bacteria del tracto respiratorio [318]. La inmunidad celular contra *B.*

pertussis está mediada principalmente por linfocitos T CD4⁺ [339, 340]. De acuerdo al perfil de citoquinas que expresan, las células T CD4⁺ se dividen principalmente en células T *helper* tipo 1 (Th1) y células T *helper* tipo 2 (Th2) [341, 342]. Las células Th1 secretan INF- γ e IL-12 y resultan esenciales en la inmunidad mediada por células [343], cruciales en la eliminación de patógenos intracelulares. Por otro lado, las células Th2 juegan un papel más importante en el desarrollo de la respuesta humoral y se caracterizan por la secreción de nivel altos de IL-4, IL-5 e IL-13 [343]. Existe otro tipo de células T *helper* denominadas Th17 [344], que secretan las citoquinas IL-17, IL-21 e IL-22, y se encuentran implicadas en la respuesta inflamatoria del huésped contra distintos patógenos extracelulares [345]. En lo que respecta a *B. pertussis*, varios estudios han demostrado un rol importante de las células Th1, secretoras de INF- γ , en la protección contra este patógeno en el modelo murino [346-348]. También la generación de células Th17 antígeno específicas ha sido relacionada con la protección contra *B. pertussis* en ratones [349, 350]. En resumen, casi 20 años de estudios con el modelo de infección murino respaldan la noción de que existe un rol central de las células Th1/Th17 en la protección contra *B. pertussis*, e indican que la contribución de los efectores Th2 tendría un rol menor [326]. Asimismo, se ha establecido recientemente un modelo babuino muy confiable para estudiar la infección por *B. pertussis*, dado que en estos primates la enfermedad es muy similar a lo que ocurre en humanos [351]. A diferencia de los ratones, los babuinos desarrollan tos severa que persiste por más de dos semanas. Los estudios en este modelo confirmaron un papel importante de la inmunidad por células T contra *B. pertussis*, con la inducción de células secretoras de IFN- γ e IL-17 en animales convalecientes, sugiriendo la inducción de respuestas adaptativas Th1 y Th17, con ausencia de una respuesta Th2 [293]. Respecto a los humanos, varios estudios indican la inducción de respuestas de tipo Th1 [326] y la participación de la respuesta Th17 [352] inducidas por la infección con *B. pertussis*. Este perfil Th1/Th17 necesario para la eliminación eficiente de *B. pertussis* del tracto respiratorio es consistente con la ubicación tanto extra como intracelular de este patógeno durante su ciclo infeccioso [318].

En cuanto a la inmunidad adquirida por vacunación, el tipo de respuesta generada varía con la vacuna usada. El estudio de la respuesta de células T en infantes inmunizados con vacunas celulares y acelulares sugiere que estas vacunas inducen distintas subpoblaciones de células T CD4⁺. La inmunización con vacunas celulares, al igual que lo que sucede durante la infección, induce un perfil de citoquinas predominantemente

Th1/Th17, mientras que en la inmunización con vacunas acelulares el perfil de citoquinas es tipo del tipo Th1/Th2 [249-252]. Estudios realizados en ratones señalan que la protección conferida por las vacunas celulares involucra la activación de TLR4 y la producción de IL-1, IL-12 e IL-23 por células dendríticas, lo que conduce a la inducción de un perfil tipo Th17 junto con un perfil Th1, mientras que la inmunización con vacunas acelulares induce la producción de IL-5 y anticuerpos IgG₁, lo que determina un perfil tipo Th2 [349]. Estudios recientes realizados en un modelo de infección babuino encontró diferencias claves en la inmunidad por células T entre los animales inmunizados con las distintas vacunas y los infectados, similares a lo encontrado en humanos y ratones. Los animales infectados o inmunizados con vacuna celular presentaron una respuesta robusta de células Th1/Th17 específica contra *B. pertussis*, mientras que los inmunizados con vacuna acelular presentaron una respuesta Th1/Th2 [293]. En particular, se observó que la inmunización con vacuna acelular los protege contra los síntomas de la enfermedad pero no impide la colonización del tracto respiratorio ni la transmisión de este patógeno [293]. Más aún, los animales no vacunados resuelven la infección mucho más rápido que los animales inmunizados con vacuna acelular, recuperándose bacterias de la cavidad nasofaríngea en animales vacunados durante mucho tiempo después que los animales no vacunados. Estos hallazgos han aportado evidencia irrefutable de que las vacunas acelulares protegen básicamente contra los síntomas de la enfermedad, tal como se creía, pero no sólo no previenen la colonización sino que la prolongan por el tipo de respuesta inmune que inducen frente al encuentro con este patógeno [351].

Con respecto a la inmunidad humoral, distintos estudios demuestran que la presencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* cumple un rol fundamental en la protección contra esta infección [121, 122]. Anticuerpos contra determinados antígenos de *B. pertussis* pueden prevenir la adhesión a células epiteliales del tracto respiratorio (bloqueo de adhesinas), neutralizar toxinas bacterianas, o promover la opsonofagocitosis. Ha sido demostrado que anticuerpos dirigidos contra PT son críticos para la protección contra la sintomatología de la enfermedad [121]. Estudios realizados por nuestro grupo de investigación demostraron que la opsonización por anticuerpos específicos es crucial para inducir la actividad celular bactericida contra este patógeno [142], tanto en neutrófilos [142, 319] como en macrófagos [322]. En ausencia de anticuerpos opsonizantes, *B. pertussis* es capaz de sobrevivir dentro de células del huésped [319, 322]. Un aspecto particularmente interesante de estos estudios es que, de todos los antígenos incluidos en

las vacunas acelulares, Prn es el único que induce anticuerpos con actividad opsonofagocítica [142]. Como ya se mencionó hay un aumento alarmante de la prevalencia de aislados clínicos defectivos en la expresión de Prn en todo el mundo [145-147]. Nuestro grupo también demostró que la capacidad de anticuerpos dirigidos contra Fim de inducir la aglutinación bacteriana conduce a una disminución de adhesión de la bacteria a células epiteliales y por lo tanto a una disminución de la adhesión inicial del epitelio [123], señalando la importancia de la presencia de anticuerpos dirigidos contra estas proteínas.

En resumen, una respuesta protectora contra *B. pertussis* requiere tanto de inmunidad humoral como celular. Los distintos factores de virulencia de *B. pertussis* y su capacidad para evadir el sistema inmune del hospedador explican la necesidad de anticuerpos bloqueantes de la adhesión, neutralizantes de toxinas y con capacidad de promover la fagocitosis de la bacteria para asegurar así su inmunoeliminación. De otra forma, esta bacteria podría invadir distintos tipos celulares y/o ser fagocitada por células inmunes, en donde puede permanecer viable en localización intracelular, y con capacidad de emerger al espacio extracelular para volver a infectar al mismo huésped o a otros huéspedes susceptibles cuando las condiciones de entorno lo propicien. En este marco, las células con infecciones intracelulares pueden ser consideradas como nichos de persistencia, y en este sentido, las estrategias de vacunación y tratamiento contra este patógeno deberían estar dirigidas para evitar el establecimiento de estos nichos y/o promover su eliminación.

1.10. Antecedentes y objetivos de este trabajo

Los patógenos, luego de coevolucionar con sus hospedadores, han desarrollado una serie de estrategias para evitar su destrucción por el sistema inmune, tales como la evasión de la respuesta innata, la sobrevida intracelular y la variación antigénica, entre otras. Con respecto a la sobrevida intracelular, en los últimos años se han acumulado ejemplos de patógenos bacterianos clásicamente clasificados como extracelulares que promueven su entrada en células del hospedador *in vivo*, resultando en una fase de residencia intracelular que es relevante para el establecimiento de infecciones crónicas o recurrentes que dificultan la erradicación del patógeno [353]. Los ejemplos de patógenos extracelulares que emplean una fase intracelular incluyen a *Staphylococcus aureus* [354], *Streptococcus pyogenes* [355], *Streptococcus pneumoniae* [356], *Bacillus anthracis* [357], *Helicobacter pylori* [358] y diversas cepas patogénicas de *Escherichia coli* [359-362]. En concordancia con estos resultados *in vivo*, se ha demostrado que los patógenos extracelulares nombrados anteriormente tienen la capacidad de multiplicar o de sobrevivir dentro de las células del huésped cultivadas *in vitro* [353].

Si bien tanto la infección natural como la inmunización confieren cierto grado de protección contra los síntomas de la tos convulsa, no previenen eficazmente la colonización por *B. pertussis* [1, 318], indicando que esta bacteria ha desarrollado mecanismos que le permiten sobrevivir en el ambiente hostil encontrado dentro del huésped. Esta situación ha motivado que en los últimos años un número importante de grupos de investigación hayan orientado sus esfuerzos a dilucidar los mecanismos que promueven la persistencia de este patógeno en el hospedador. En particular, trabajos previos de nuestro grupo indican que esta bacteria, históricamente considerada extracelular y no invasiva, tendría uno o varios estadios intracelulares durante el ciclo infectivo y que los macrófagos podrían ser los principales nichos de persistencia [322]. Estos estudios indican que en ausencia de anticuerpos *B. pertussis* es capaz de evadir la acción bactericida de los macrófagos permaneciendo en compartimientos endosomales que favorecerían su sobrevida y eventual duplicación intracelular [322]. Nuestro grupo fue pionero en demostrar que esta bacteria es, en realidad, un patógenos intracelular facultativo, lo cual es particularmente relevante en el marco de la epidemiología de pertussis y el desarrollo de vacunas. La existencia de estadios intracelulares tiene consecuencias directas en el tipo de inmunidad que las vacunas deben producir.

Inmunógenos capaces inducir actividad opsonizante así como formulaciones que aseguren una respuesta celular podrían mejorar significativamente la situación epidemiológica. Dentro de este marco, la presente Tesis tuvo como objetivo avanzar en la comprensión de los factores bacterianos involucrados en la adaptación de *B. pertussis* al hospedador mediante el estudio a nivel proteómico del fenotipo de este patógeno en estadio intracelular. Estos estudios nos permitieron tener una visión global de la adaptación fenotípica de *B. pertussis* al entorno intracelular. A partir de esta información se avanzó en la caracterización funcional de una serie de proteínas potencialmente relevantes para la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis*.

A modo de resumen, en el **Capítulo 3** se describen los estudios realizados para analizar los cambios en el proteoma de *B. pertussis* durante su adaptación al entorno intracelular en macrófagos humanos. Encontramos un aumento en la expresión de proteínas bacterianas involucradas en la respuesta al estrés, adquisición de hierro, metabolismo celular, regulación transcripcional y virulencia involucradas en el proceso de adaptación al entorno intracelular. A partir de este análisis, se decidió estudiar en profundidad una serie de proteínas potencialmente involucradas en el establecimiento de nichos intracelulares. El estudio se centró particularmente en factores involucrados en la adquisición de nutrientes y en la adaptación a las condiciones encontradas dentro del fagosoma, un primer paso de crucial importancia para el establecimiento de un nicho intracelular de persistencia. Entre ellas, se encuentran proteínas implicadas en la adquisición de hierro (IRP1-3, BfrD y BfrE) y en la adaptación al entorno fagosomal (MgtC). En el **Capítulo 4** se describen los estudios realizados para evaluar el rol de los receptores de hierro a partir de catecolaminas BfrD y BfrE en la adaptación intracelular de *B. pertussis*, mientras que en el **Capítulo 5** se describen los estudios realizados para evaluar el rol del transportador de hierro ferroso IRP1-3. Los resultados presentados en el **Capítulo 4** muestran que los receptores BfrD y BfrE están involucrados en la sobrevivencia intracelular de este patógeno tanto en macrófagos como en células del epitelio respiratorio. Por otro lado, en el **Capítulo 5** se demuestra que el transportador IRP1-3 es un receptor de hierro secundario que está involucrado en la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en células del hospedador sólo en ausencia de la fuente de hierro que capturan los receptores BfrD y BfrE. En el **Capítulo 6** se analiza el rol del factor MgtC en la sobrevivencia de *B. pertussis* en células del hospedador, así como los posibles factores involucrados en su regulación. Los estudios indican que MgtC está involucrado en la

sobrevida intracelular de *B. pertussis* en macrófagos humanos. En ensayos *in vitro* se pudo comprobar que MgtC está involucrado en la adaptación de esta bacteria a la baja disponibilidad de magnesio y a pH ácido. En estudios con macrófagos se observó que en localización intracelular MgtC está fundamentalmente involucrada en mantener la viabilidad de la bacteria en el entorno ligeramente ácido encontrado en los endosomas que habita. Por último, en el **Capítulo 7** se presenta la Discusión General de este trabajo.

1.11. Referencias

1. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev.* 2005,18(2):326-382.
2. Bordet JOG. Le microbe de la coqueluche. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 1906,20:48-68.
3. Eldering G, Kendrick P. *Bacillus para-pertussis*: a species resembling both *Bacillus pertussis* and *Bacillus bronchisepticus* but identical with neither. *J Bacteriol.* 1938,35(6):561.
4. Ferry N. A preliminary report of the bacterial findings in canine distemper. *Am Vet Rev.* 1910,37:499-504.
5. van der Zee A, Mooi F, Van Embden J, Musser J. Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella spp.*: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences. *J Bacteriol.* 1997,179(21):6609-6617.
6. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MT, y col. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet.* 2003,35(1):32-40.
7. Weyant RS, Hollis DG, Weaver RE, Amin M, Steigerwalt AG, O'Connor SP, Whitney AM, Daneshvar MI, Moss CW, Brenner DJ. *Bordetella holmesii sp. nov.*, a new gram-negative species associated with septicemia. *J Clin Microbiol.* 1995,33(1):1-7.
8. Vandamme P, Heyndrickx M, Vancanneyt M, Hoste B, De Vos P, Falsen E, Kersters K, Hinz K-H. *Bordetella trematum sp. nov.*, isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Rügner and Tan 1983. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1996,46(4):849-858.
9. von Wintzingerode F, Schattke A, Siddiqui RA, Rosick U, Gobel UB, Gross R. *Bordetella petrii sp. nov.*, isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001,51(Pt 4):1257-1265.
10. Ko KS, Peck KR, Oh WS, Lee NY, Lee JH, Song J-H. New species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii sp. nov.*, isolated from the purulent exudate of an epidermal cyst. *J Clin Microbiol.* 2005,43(5):2516-2519.
11. Vandamme PA, Peeters C, Cnockaert M, Inganas E, Falsen E, Moore ER, Nunes OC, Manaia CM, Spilker T, LiPuma JJ. *Bordetella bronchialis sp. nov.*, *Bordetella flabilis sp. nov.* and *Bordetella sputigena sp. nov.*, isolated from human respiratory specimens, and reclassification of *Achromobacter sediminum* Zhang et al. 2014 as *Verticia sediminum gen. nov.*, comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015,65(10):3674-3682.
12. Kersters K, Hinz K-H, Hertle A, Segers P, Lievens A, Siegmann O, De Ley J. *Bordetella avium sp. nov.*, isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1984,34(1):56-70.
13. Cookson B, Vandamme P, Carlson L, Larson A, Sheffield J, Kersters K, Spach D. Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, "*B. hinzii*". *J Clin Microbiol.* 1994,32(10):2569-2571.
14. Ivanov YV, Linz B, Register KB, Newman JD, Taylor DL, Boschert KR, Le Guyon S, Wilson EF, Brinkac LM, Sanka R, Greco SC, Klender PM, Losada L, Harvill ET. Identification and taxonomic characterization of *Bordetella pseudohinzii sp. nov.* isolated from laboratory-raised mice. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016,66(12):5452-5459.
15. Tazato N, Handa Y, Nishijima M, Kigawa R, Sano C, Sugiyama J. Novel environmental species isolated from the plaster wall surface of mural paintings in the Takamatsuzuka tumulus: *Bordetella muralis sp. nov.*, *Bordetella tumulicola sp. nov.* and *Bordetella tumbae sp. nov.* *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015,65(12):4830-4838.
16. Mattoo S, Foreman-Wykert AK, Cotter PA, Miller JF. Mechanisms of *Bordetella pathogenesis*. *Front Biosci.* 2001,6:E168-186.

17. Aslanabadi A, Ghabili K, Shad K, Khalili M, Sajadi MM. Emergence of whooping cough: notes from three early epidemics in Persia. *Lancet Infect Dis*. 2015,15(12):1480-1484.
18. Magner LN, Diseases of the premodern period in Korea, in *The Cambridge world history of human disease*. 1993, Cambridge University Press, Cambridge. p. 392-400.
19. Cone TC, Jr. Whooping cough is first described as a disease sui generis by Baillou in 1640. *Pediatrics*. 1970,46(4):522.
20. Lapin JH. Whooping Cough. *Whooping Cough*. 1943.
21. Ledermann D. W. Breve historia de la *Bordetella pertussis*, una elusiva damisela. *Revista chilena de infectología*. 2004,21:241-246.
22. Moreno-Lopez M. El género *bordetella*. *Microbiol Esp*. 1952,5:177-181.
23. Edwards K, Decker M. Pertussis vaccines. *Vaccines*, 6th ed. 2013.
24. Andrews R, Herceg A, Roberts C. Pertussis notifications in Australia, 1991 to 1997. *Commun Dis Intell*. 1997,21(11):145-148.
25. Baron S, Njamkepo E, Grimprel E, Begue P, Desenclos JC, Drucker J, Guiso N. Epidemiology of pertussis in French hospitals in 1993 and 1994: thirty years after a routine use of vaccination. *Pediatr Infect Dis J*. 1998,17(5):412-418.
26. de Melker HE, Conyn-van Spaendonck MA, Rumke HC, van Wijngaarden JK, Mooi FR, Schellekens JF. Pertussis in The Netherlands: an outbreak despite high levels of immunization with whole-cell vaccine. *Emerg Infect Dis*. 1997,3(2):175-178.
27. Guris D, Strebel PM, Bardenheier B, Brennan M, Tachdjian R, Finch E, Wharton M, Livengood JR. Changing epidemiology of pertussis in the United States: increasing reported incidence among adolescents and adults, 1990-1996. *Clin Infect Dis*. 1999,28(6):1230-1237.
28. Gzyl A, Augustynowicz E, Rabczenko D, Gniadek G, Slusarczyk J. Pertussis in Poland. *Int J Epidemiol*. 2004,33(2):358-365.
29. He Q, Mertsola J. Factors contributing to pertussis resurgence. *Future Microbiol*. 2008,3(3):329-339.
30. Hellenbrand W, Beier D, Jensen E, Littmann M, Meyer C, Oppermann H, Wirsing von König CH, Reiter S. The epidemiology of pertussis in Germany: past and present. *BMC Infect Dis*. 2009,9:22.
31. Ntezayabo B, De Serres G, Duval B. Pertussis resurgence in Canada largely caused by a cohort effect. *Pediatr Infect Dis J*. 2003,22(1):22-27.
32. Van Buynder PG, Owen D, Vurdien JE, Andrews NJ, Matthews RC, Miller E. *Bordetella pertussis* surveillance in England and Wales: 1995-7. *Epidemiol Infect*. 1999,123(3):403-411.
33. Organization WH. Pertussis vaccines: WHO position paper—August 2015. *Weekly Epidemiological Record*. 2015,90(35):433-458.
34. Yeung KHT, Duclos P, Nelson EAS, Hutubessy RCW. An update of the global burden of pertussis in children younger than 5 years: a modelling study. *Lancet Infect Dis*. 2017,17(9):974-980.
35. Tan T, Trindade E, Skowronski D. Epidemiology of pertussis. *Pediatr Infect Dis J*. 2005,24(5 Suppl):S10-18.
36. De Serres G, Duval B. Pertussis vaccination beyond childhood. *Lancet*. 2005,365(9464):1015-1016.
37. Hewlett EL, Edwards KM. Clinical practice. Pertussis--not just for kids. *N Engl J Med*. 2005,352(12):1215-1222.
38. Bisgard KM, Pascual FB, Ehresmann KR, Miller CA, Cianfrini C, Jennings CE, Rebmann CA, Gabel J, Schauer SL, Lett SM. Infant pertussis: who was the source? *Pediatr Infect Dis J*. 2004,23(11):985-989.
39. Carbonetti NH. Pertussis leukocytosis: mechanisms, clinical relevance and treatment. *Pathogens and disease*. 2016,74(7):ftw087.

40. Mikelova LK, Halperin SA, Scheifele D, Smith B, Ford-Jones E, Vaudry W, Jadavji T, Law B, Moore D. Predictors of death in infants hospitalized with pertussis: a case-control study of 16 pertussis deaths in Canada. *J Pediatr*. 2003,143(5):576-581.
41. Paddock CD, Sanden GN, Cherry JD, Gal AA, Langston C, Tatti KM, Wu KH, y col. Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin Infect Dis*. 2008,47(3):328-338.
42. Cherry JD, Grimprel E, Guiso N, Heininger U, Mertsola J. Defining pertussis epidemiology: clinical, microbiologic and serologic perspectives. *Pediatr Infect Dis J*. 2005,24(5 Suppl):S25-34.
43. Heininger U, Klich K, Stehr K, Cherry JD. Clinical findings in *Bordetella pertussis* infections: results of a prospective multicenter surveillance study. *Pediatrics*. 1997,100(6):E10.
44. Heininger U, Cherry JD, Eckhardt T, Lorenz C, Christenson P, Stehr K. Clinical and laboratory diagnosis of pertussis in the regions of a large vaccine efficacy trial in Germany. *Pediatr Infect Dis J*. 1993,12(6):504-509.
45. Long SS, Lischner HW, Deforest A, Clark JL. Serologic evidence of subclinical pertussis in immunized children. *Pediatr Infect Dis J*. 1990,9(10):700-705.
46. Long SS, Welkon CJ, Clark JL. Widespread silent transmission of pertussis in families: antibody correlates of infection and symptomatology. *J Infect Dis*. 1990,161(3):480-486.
47. Deen JL, Mink CA, Cherry JD, Christenson PD, Pineda EF, Lewis K, Blumberg DA, Ross LA. Household contact study of *Bordetella pertussis* infections. *Clin Infect Dis*. 1995,21(5):1211-1219.
48. Deville JG, Cherry JD, Christenson PD, Pineda E, Leach CT, Kuhls TL, Viker S. Frequency of unrecognized *Bordetella pertussis* infections in adults. *Clin Infect Dis*. 1995,21(3):639-642.
49. Versteegh F, Schellekens J, Nagelkerke A, Roord J. Laboratory-confirmed reinfections with *Bordetella pertussis*. *Acta Paediatr*. 2002,91(1):95-97.
50. Bottero D, Griffith MM, Lara C, Flores D, Pianciola L, Gaillard ME, Mazzeo M, y col. *Bordetella holmesii* in children suspected of pertussis in Argentina. *Epidemiol Infect*. 2013,141(4):714-717.
51. Guiso N, Hegerle N. Other Bordetellas, lessons for and from pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2014,13(9):1125-1133.
52. Altunaiji S, Kukuruzovic R, Curtis N, Massie J. Antibiotics for whooping cough (pertussis). *Cochrane Database Syst Rev*. 2007(3):Cd004404.
53. González-Hachero J. Diagnóstico y tratamiento de la tos ferina. *Vox Paediatrica*. 1999,7:135-138.
54. Bruss JB, Malley R, Halperin S, Dobson S, Dhalla M, Mciver J, Siber GR. Treatment of severe pertussis: a study of the safety and pharmacology of intravenous pertussis immunoglobulin. *The Pediatric infectious disease journal*. 1999,18(6):505-511.
55. Scanlon KM, Gau Y, Zhu J, Skerry C, Wall SM, Soleimani M, Carbonetti NH. Epithelial anion transporter pendrin contributes to inflammatory lung pathology in mouse models of *Bordetella pertussis* infection. *Infect Immun*. 2014,82(10):4212-4221.
56. Everett LA, Glaser B, Beck JC, Idol JR, Buchs A, Heyman M, Adawi F, y col. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet*. 1997,17(4):411-422.
57. Carbonetti NH. *Bordetella pertussis*: new concepts in pathogenesis and treatment. *Curr Opin Infect Dis*. 2016,29(3):287-294.
58. Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol*. 2012,22(1):50-60.
59. Melvin JA, Scheller EV, Miller JF, Cotter PA. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol*. 2014,12(4):274-288.

60. Morse S, Morse J. Isolation and properties of the leukocytosis-and lymphocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis*. *J Exp Med*. 1976,143(6):1483-1502.
61. Stein PE, Boodhoo A, Armstrong GD, Cockle SA, Klein MH, Read RJ. The crystal structure of pertussis toxin. *Structure*. 1994,2(1):45-57.
62. Kotob SI, Hausman SZ, Burns DL. Localization of the promoter for the *ptl* genes of *Bordetella pertussis*, which encode proteins essential for secretion of pertussis toxin. *Infect Immun*. 1995,63(8):3227-3230.
63. Stein PE, Boodhoo A, Armstrong GD, Heerze LD, Cockle SA, Klein MH, Read RJ. Structure of a pertussis toxin–sugar complex as a model for receptor binding. *Nat Struct Mol Biol*. 1994,1(9):591.
64. Loch C, Coutte L, Mielcarek N. The ins and outs of pertussis toxin. *The FEBS journal*. 2011,278(23):4668-4682.
65. el Bayâ A, Brückener K, Schmidt MA. Nonrestricted differential intoxication of cells by pertussis toxin. *Infect Immun*. 1999,67(1):433-435.
66. Graf R, Codina J, Birnbaumer L. Peptide inhibitors of ADP-ribosylation by pertussis toxin are substrates with affinities comparable to those of the trimeric GTP-binding proteins. *Mol Pharmacol*. 1992,42(5):760-764.
67. Spangrude G, Sacchi F, Hill H, Van Epps D, Daynes R. Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. *The Journal of Immunology*. 1985,135(6):4135-4143.
68. Andreasen C, Carbonetti NH. Pertussis toxin inhibits early chemokine production to delay neutrophil recruitment in response to *Bordetella pertussis* respiratory tract infection in mice. *Infect Immun*. 2008,76(11):5139-5148.
69. Kirimanjeswara GS, Agosto LM, Kennett MJ, Bjornstad ON, Harvill ET. Pertussis toxin inhibits neutrophil recruitment to delay antibody-mediated clearance of *Bordetella pertussis*. *J Clin Invest*. 2005,115(12):3594-3601.
70. Shumilla JA, Lacaille V, Hornell TMC, Huang J, Narasimhan S, Relman DA, Mellins ED. *Bordetella pertussis* Infection of Primary Human Monocytes Alters HLA-DR Expression. *Infect Immun*. 2004,72(3):1450-1462.
71. van't Wout J, Burnette WN, Mar VL, Rozdzinski E, Wright SD, Tuomanen EI. Role of carbohydrate recognition domains of pertussis toxin in adherence of *Bordetella pertussis* to human macrophages. *Infect Immun*. 1992,60(8):3303-3308.
72. Carbonetti NH, Artamonova GV, Van Rooijen N, Ayala VI. Pertussis toxin targets airway macrophages to promote *Bordetella pertussis* infection of the respiratory tract. *Infect Immun*. 2007,75(4):1713-1720.
73. Martino A, Volpe E, Auricchio G, Colizzi V, Baldini PM. Influence of pertussis toxin on CD1a isoform expression in human dendritic cells. *J Clin Immunol*. 2006,26(2):153-159.
74. MU HH, Cooley MA, Sewell WA. Studies on the lymphocytosis induced by pertussis toxin. *Immunology & Cell Biology*. 1994,72(3):267-270.
75. Carbonetti NH. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol*. 2010,5(3):455-469.
76. Glaser P, Danchin A, Ladant D, Barzu O, Ullmann A. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: the gene and the protein. *The Tokai journal of experimental and clinical medicine*. 1988,13:239-252.
77. Hackett M, Guo L, Shabanowitz J, Hunt DF, Hewlett EL. Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science*. 1994:433-433.
78. El-Azami-El-Idrissi M, Bauche C, Loucka J, Osicka R, Sebo P, Ladant D, Leclerc C. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J Biol Chem*. 2003,278(40):38514-38521.

79. Sakamoto H, Bellalou J, Sebo P, Ladant D. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem.* 1992,267(19):13598-13602.
80. Ladant D, Michelson S, Sarfati R, Gilles A, Predeleanu R, Barzu O. Characterization of the calmodulin-binding and of the catalytic domains of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *J Biol Chem.* 1989,264(7):4015-4020.
81. Glaser á, Elmaoglou-Lazaridou A, Krin E, Ladant D, Barzu O, Danchin A. Identification of residues essential for catalysis and binding of calmodulin in *Bordetella pertussis* adenylate cyclase by site-directed mutagenesis. *The EMBO journal.* 1989,8(3):967-972.
82. Fiser R, Masin J, Bumba L, Pospisilova E, Fayolle C, Basler M, Sadilkova L, Adkins I, Kamanova J, Cerny J. Calcium influx rescues adenylate cyclase-hemolysin from rapid cell membrane removal and enables phagocyte permeabilization by toxin pores. *PLoS Path.* 2012,8(4):e1002580.
83. Guermonprez P, Khelef N, Blouin E, Rieu P, Ricciardi-Castagnoli P, Guiso N, Ladant D, Leclerc C. The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med.* 2001,193(9):1035-1044.
84. Confer DL, Eaton JW. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science.* 1982,217(4563):948-950.
85. Kamanova J, Kofronova O, Masin J, Genth H, Vojtova J, Linhartova I, Benada O, Just I, Sebo P. Adenylate cyclase toxin subverts phagocyte function by RhoA inhibition and unproductive ruffling. *The Journal of Immunology.* 2008,181(8):5587-5597.
86. Cerny O, Kamanova J, Masin J, Bibova I, Skopova K, Sebo P. *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin Blocks Induction of Bactericidal Nitric Oxide in Macrophages through cAMP-Dependent Activation of the SHP-1 Phosphatase. *J Immunol.* 2015,194(10):4901-4913.
87. Paccani SR, Dal Molin F, Benagiano M, Ladant D, D'Elis MM, Montecucco C, Baldari CT. Suppression of T-lymphocyte activation and chemotaxis by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 2008,76(7):2822-2832.
88. Goodwin M, Weiss A. Adenylate cyclase toxin is critical for colonization and pertussis toxin is critical for lethal infection by *Bordetella pertussis* in infant mice. *Infect Immun.* 1990,58(10):3445-3447.
89. Henderson MW, Inatsuka CS, Sheets AJ, Williams CL, Benaron DJ, Donato GM, Gray MC, Hewlett EL, Cotter PA. Contribution of *Bordetella* filamentous hemagglutinin and adenylate cyclase toxin to suppression and evasion of interleukin-17-mediated inflammation. *Infect Immun.* 2012,80(6):2061-2075.
90. Valdez HA, Oviedo JM, Gorgojo JP, Lamberti Y, Rodriguez ME. *Bordetella pertussis* modulates human macrophage defense gene expression. *Pathog Dis.* 2016,74(6).
91. Mazar J, Cotter PA. Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol Microbiol.* 2006,62(3):641-654.
92. Guedin S, Willery E, Tommassen J, Fort E, Drobecq H, Loch C, Jacob-Dubuisson F. Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem.* 2000,275(39):30202-30210.
93. Jacob-Dubuisson F, El-Hamel C, Saint N, Guedin S, Willery E, Molle G, Loch C. Channel formation by FhaC, the outer membrane protein involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem.* 1999,274(53):37731-37735.
94. Hodak H, Clantin B, Willery E, Villeret V, Loch C, Jacob-Dubuisson F. Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate. *Mol Microbiol.* 2006,61(2):368-382.

95. Coutte L, Antoine R, Drobecq H, Loch C, Jacob-Dubuisson F. Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J.* 2001,20(18):5040-5048.
96. Coutte L, Alonso S, Reveneau N, Willery E, Quatannens B, Loch C, Jacob-Dubuisson F. Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen. *J Exp Med.* 2003,197(6):735-742.
97. Alonso S, Pethe K, Mielcarek N, Raze D, Loch C. Role of ADP-Ribosyltransferase Activity of Pertussis Toxin in Toxin-Adhesin Redundancy with Filamentous Hemagglutinin during *Bordetella pertussis* Infection. *Infect Immun.* 2001,69(10):6038-6043.
98. Relman D, Tuomanen E, Falkow S, Golenbock DT, Saukkonen K, Wright SD. Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell.* 1990,61(7):1375-1382.
99. Saukkonen K, Cabellos C, Burroughs M, Prasad S, Tuomanen E. Integrin-mediated localization of *Bordetella pertussis* within macrophages: role in pulmonary colonization. *J Exp Med.* 1991,173(5):1143-1149.
100. Ishibashi Y, Claus S, Relman DA. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J Exp Med.* 1994,180(4):1225-1233.
101. Ishibashi Y, Relman DA, Nishikawa A. Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and alpha5beta1 integrin. *Microb Pathog.* 2001,30(5):279-288.
102. Ishibashi Y, Nishikawa A. *Bordetella pertussis* infection of human respiratory epithelial cells up-regulates intercellular adhesion molecule-1 expression: role of filamentous hemagglutinin and pertussis toxin. *Microb Pathog.* 2002,33(3):115-125.
103. Ishibashi Y, Nishikawa A. Role of nuclear factor-kappa B in the regulation of intercellular adhesion molecule 1 after infection of human bronchial epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Microb Pathog.* 2003,35(4):169-177.
104. Prasad SM, Yin Y, Rodzinski E, Tuomanen EI, Masure HR. Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1993,61(7):2780-2785.
105. Menozzi FD, Gantiez C, Loch C. Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin. *FEMS Microbiol Lett.* 1991,78(1):59-64.
106. Perez Vidakovics ML, Lamberti Y, van der Pol WL, Yantorno O, Rodriguez ME. Adenylate cyclase influences filamentous haemagglutinin-mediated attachment of *Bordetella pertussis* to epithelial alveolar cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006,48(1):140-147.
107. Hoffman C, Eby J, Gray M, Heath Damron F, Melvin J, Cotter P, Hewlett E. *Bordetella* adenylate cyclase toxin interacts with filamentous haemagglutinin to inhibit biofilm formation in vitro. *Mol Microbiol.* 2017,103(2):214-228.
108. Lamberti Y, Gorgojo J, Massillo C, Rodriguez ME. *Bordetella pertussis* entry into respiratory epithelial cells and intracellular survival. *Pathog Dis.* 2013,69(3):194-204.
109. Lamberti Y, Alvarez Hayes J, Perez Vidakovics ML, Rodriguez ME. Cholesterol-dependent attachment of human respiratory cells by *Bordetella pertussis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009,56(2):143-150.
110. Mooi FR, van der Heide HG, ter Avest AR, Welinder KG, Livey I, van der Zeijst BA, Gaastra W. Characterization of fimbrial subunits from *Bordetella* species. *Microb Pathog.* 1987,2(6):473-484.
111. Willems RJ, Geuijen C, van der Heide HG, Renauld G, Bertin P, van den Akker WM, Loch C, Mooi FR. Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* *fim/fha* gene cluster:

- identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA. *Mol Microbiol.* 1994,11(2):337-347.
112. Willems RJ, Heide HG, Mooi FR. Characterization of a *Bordetella pertussis* fimbrial gene cluster which is located directly downstream of the filamentous haemagglutinin gene. *Mol Microbiol.* 1992,6(18):2661-2671.
 113. Willems R, Paul A, Heide Hvd, Avest A, Mooi FR. Fimbrial phase variation in *Bordetella pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation. *The EMBO journal.* 1990,9(9):2803-2809.
 114. Pedroni á, Riboli B, Ferra F, Grandi G, Toma S, Arico B, Rappuoli R. Cloning of a novel pilin-like gene from *Bordetella pertussis*: homology to the *fim2* gene. *Mol Microbiol.* 1988,2(4):539-543.
 115. Riboli B, Pedroni P, Cuzzoni A, Grandi G, De Ferra F. Expression of *Bordetella pertussis* fimbrial (*fim*) genes in *Bordetella bronchiseptica*: *fimX* is expressed at a low level and vir-regulated. *Microb Pathog.* 1991,10(5):393-403.
 116. van Beek LFF, de Gouw DD, Eleveld MMJ, Bootsma HHJ, de Jonge MMI, Mooi FFR, Zomer AA, Diavatopoulos DDA. Adaptation of *Bordetella pertussis* to the respiratory tract. *The Journal of Infectious Diseases.* 2018:jiy125-jiy125.
 117. Hazenbos WL, Geuijen CA, van den Berg BM, Mooi FR, van Furth R. *Bordetella pertussis* fimbriae bind to human monocytes via the minor fimbrial subunit FimD. *J Infect Dis.* 1995,171(4):924-929.
 118. Mooi FR, Jansen WH, Brunings H, Gielen H, van der Heide HG, Walvoort HC, Guinee PA. Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. *Microb Pathog.* 1992,12(2):127-135.
 119. Geuijen CA, Willems RJ, Bongaerts M, Top J, Gielen H, Mooi FR. Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. *Infect Immun.* 1997,65(10):4222-4228.
 120. Hazenbos WL, van den Berg BM, Geuijen CW, Mooi FR, van Furth R. Binding of FimD on *Bordetella pertussis* to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases. *J Immunol.* 1995,155(8):3972-3978.
 121. Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine.* 1998,16(20):1907-1916.
 122. Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, Stehr K. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine.* 1998,16(20):1901-1906.
 123. Rodriguez ME, Hellwig SM, Perez Vidakovics ML, Berbers GA, van de Winkel JG. *Bordetella pertussis* attachment to respiratory epithelial cells can be impaired by fimbriae-specific antibodies. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006,46(1):39-47.
 124. Mattoo S, Yuk MH, Huang LL, Miller JF. Regulation of type III secretion in *Bordetella*. *Mol Microbiol.* 2004,52(4):1201-1214.
 125. Brickman TJ, Cummings CA, Liew SY, Relman DA, Armstrong SK. Transcriptional profiling of the iron starvation response in *Bordetella pertussis* provides new insights into siderophore utilization and virulence gene expression. *J Bacteriol.* 2011,193(18):4798-4812.
 126. Galan JE, Lara-Tejero M, Marlovits TC, Wagner S. Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annu Rev Microbiol.* 2014,68:415-438.
 127. Stockbauer KE, Foreman-Wykert AK, Miller JF. *Bordetella* type III secretion induces caspase 1-independent necrosis. *Cell Microbiol.* 2003,5(2):123-132.
 128. Yuk MH, Harvill ET, Cotter PA, Miller JF. Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF- κ B activation by the *Bordetella* type III secretion system. *Mol Microbiol.* 2000,35(5):991-1004.

129. Yuk MH, Harvill ET, Miller JF. The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol*. 1998,28(5):945-959.
130. Skinner JA, Pilione MR, Shen H, Harvill ET, Yuk MH. *Bordetella* type III secretion modulates dendritic cell migration resulting in immunosuppression and bacterial persistence. *The Journal of Immunology*. 2005,175(7):4647-4652.
131. Panina EM, Mattoo S, Griffith N, Kozak NA, Yuk MH, Miller JF. A genome-wide screen identifies a *Bordetella* type III secretion effector and candidate effectors in other species. *Mol Microbiol*. 2005,58(1):267-279.
132. Kuwae A, Matsuzawa T, Ishikawa N, Abe H, Nonaka T, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Abe A. BopC is a novel type III effector secreted by *Bordetella bronchiseptica* and has a critical role in type III-dependent necrotic cell death. *J Biol Chem*. 2006,281(10):6589-6600.
133. Nagamatsu K, Kuwae A, Konaka T, Nagai S, Yoshida S, Eguchi M, Watanabe M, Mimuro H, Koyasu S, Abe A. *Bordetella* evades the host immune system by inducing IL-10 through a type III effector, BopN. *J Exp Med*. 2009,206(13):3073-3088.
134. French CT, Panina EM, Yeh SH, Griffith N, Arambula DG, Miller JF. The *Bordetella* type III secretion system effector BteA contains a conserved N-terminal motif that guides bacterial virulence factors to lipid rafts. *Cell Microbiol*. 2009,11(12):1735-1749.
135. Fennelly NK, Sisti F, Higgins SC, Ross PJ, van der Heide H, Mooi FR, Boyd A, Mills KH. *Bordetella pertussis* expresses a functional type III secretion system that subverts protective innate and adaptive immune responses. *Infect Immun*. 2008,76(3):1257-1266.
136. Gaillard ME, Bottero D, Castuma CE, Basile LA, Hozbor D. Laboratory adaptation of *Bordetella pertussis* is associated with the loss of type three secretion system functionality. *Infect Immun*. 2011,79(9):3677-3682.
137. Kurushima J, Kuwae A, Abe A. The type III secreted protein BspR regulates the virulence genes in *Bordetella bronchiseptica*. *PLoS ONE*. 2012,7(6):e38925.
138. Ahuja U, Shokeen B, Cheng N, Cho Y, Blum C, Coppola G, Miller JF. Differential regulation of type III secretion and virulence genes in *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica* by a secreted anti-sigma factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016,113(9):2341-2348.
139. Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun*. 2001,69(3):1231-1243.
140. Emsley P, McDermott G, Charles IG, Fairweather NF, Isaacs NW. Crystallographic characterization of pertactin, a membrane-associated protein from *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol*. 1994,235(2):772-773.
141. Hellwig SM, Rodriguez ME, Berbers GA, van de Winkel JG, Mooi FR. Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity. *J Infect Dis*. 2003,188(5):738-742.
142. Rodriguez ME, Hellwig SM, Hozbor DF, Leusen J, van der Pol WL, van de Winkel JG. Fc receptor-mediated immunity against *Bordetella pertussis*. *J Immunol*. 2001,167(11):6545-6551.
143. Cherry JD. Comparative efficacy of acellular pertussis vaccines: an analysis of recent trials. *Pediatr Infect Dis J*. 1997,16(4 Suppl):S90-96.
144. Mooi FR. *Bordetella pertussis* and vaccination: The persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol*. 2010,10(1):36-49.
145. Bouchez V, Brun D, Cantinelli T, Dore G, Njamkepo E, Guiso N. First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing Pertussis Toxin or Pertactin. *Vaccine*. 2009,27(43):6034-6041.
146. Otsuka N, Han HJ, Toyozumi-Ajisaka H, Nakamura Y, Arakawa Y, Shibayama K, Kamachi K. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. *PLoS ONE*. 2012,7(2):e31985.

147. Barkoff AM, Mertsola J, Guillot S, Guiso N, Berbers G, He Q. Appearance of *Bordetella pertussis* strains not expressing the vaccine antigen pertactin in Finland. *Clin Vaccine Immunol.* 2012,19(10):1703-1704.
148. Pawloski LC, Queenan AM, Cassiday PK, Lynch AS, Harrison MJ, Shang W, Williams MM, y col. Prevalence and Molecular Characterization of Pertactin-Deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clin Vaccine Immunol.* 2014,21(2):119-125.
149. Zeddeman A, Gent Mv, Heuvelman C, Heide H, Bart M, Advani A, Hallander H, Wirsing von Konig C, Riffelman M, Storsaeter J. Investigations into the emergence of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in six European countries, 1996 to 2012. 2014.
150. Hegerle N, Paris AS, Brun D, Dore G, Njamkepo E, Guillot S, Guiso N. Evolution of French *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* isolates: increase of *Bordetellae* not expressing pertactin. *Clin Microbiol Infect.* 2012,18(9):E340-E346.
151. Finn TM, Stevens LA. Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol Microbiol.* 1995,16(4):625-634.
152. Fernandez RC, Weiss AA. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun.* 1994,62(11):4727-4738.
153. Finn TM, Amsbaugh DF. Vag8, a *Bordetella pertussis* bvg-regulated protein. *Infect Immun.* 1998,66(8):3985-3989.
154. Noofeli M, Bokhari H, Blackburn P, Roberts M, Coote JG, Parton R. BapC autotransporter protein is a virulence determinant of *Bordetella pertussis*. *Microb Pathog.* 2011,51(3):169-177.
155. Barnes MG, Weiss AA. BrkA protein of *Bordetella pertussis* inhibits the classical pathway of complement after C1 deposition. *Infect Immun.* 2001,69(5):3067-3072.
156. Fernandez RC, Weiss AA. Susceptibilities of *Bordetella pertussis* strains to antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996,40(4):1041-1043.
157. Hovingh ES, van den Broek B, Kuipers B, Pinelli E, Rooijackers SHM, Jongerius I. Acquisition of C1 inhibitor by *Bordetella pertussis* virulence associated gene 8 results in C2 and C4 consumption away from the bacterial surface. *PLoS Pathog.* 2017,13(7):e1006531.
158. Marr N, Shah NR, Lee R, Kim EJ, Fernandez RC. *Bordetella pertussis* autotransporter Vag8 binds human C1 esterase inhibitor and confers serum resistance. *PLoS ONE.* 2011,6(6):e20585.
159. Bokhari H, Bilal I, Zafar S. BapC autotransporter protein of *Bordetella pertussis* is an adhesion factor. *J Basic Microbiol.* 2012,52(4):390-396.
160. Cowell JL, Hewlett EL, Manclark CR. Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1979,25(3):896-901.
161. Zhang YL, Sekura RD. Purification and characterization of the heat-labile toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1991,59(10):3754-3759.
162. Cummings CA, Bootsma HJ, Relman DA, Miller JF. Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by *Bordetella* BvgAS. *J Bacteriol.* 2006,188(5):1775-1785.
163. Masuda M, Betancourt L, Matsuzawa T, Kashimoto T, Takao T, Shimonishi Y, Horiguchi Y. Activation of rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella* dermonecrotizing toxin. *EMBO J.* 2000,19(4):521-530.
164. Schmidt G, Goehring UM, Schirmer J, Lerm M, Aktories K. Identification of the C-terminal part of *Bordetella* dermonecrotic toxin as a transglutaminase for rho GTPases. *J Biol Chem.* 1999,274(45):31875-31881.
165. Fukui A, Horiguchi Y. *Bordetella* dermonecrotic toxin exerting toxicity through activation of the small GTPase Rho. *J Biochem.* 2004,136(4):415-419.
166. Horiguchi Y, Inoue N, Masuda M, Kashimoto T, Katahira J, Sugimoto N, Matsuda M. *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress

- fibers through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997,94(21):11623-11626.
167. Matsuzawa T, Fukui A, Kashimoto T, Nagao K, Oka K, Miyake M, Horiguchi Y. *Bordetella* dermonecrotic toxin undergoes proteolytic processing to be translocated from a dynamin-related endosome into the cytoplasm in an acidification-independent manner. *J Biol Chem*. 2004,279(4):2866-2872.
 168. Horiguchi Y. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factors and *Bordetella* dermonecrotic toxin: the dermonecrosis-inducing toxins activating Rho small GTPases. *Toxicon*. 2001,39(11):1619-1627.
 169. Neo Y, Li R, Howe J, Hoo R, Pant A, Ho S, Alonso S. Evidence for an intact polysaccharide capsule in *Bordetella pertussis*. *Microb Infect*. 2010,12(3):238-245.
 170. Lawson GM. Modified technique for staining capsules of *Hemophilus pertussis*. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1940,25(4):435-438.
 171. Decker KB, James TD, Stibitz S, Hinton DM. The *Bordetella pertussis* model of exquisite gene control by the global transcription factor BvgA. *Microbiology*. 2012,158(7):1665-1676.
 172. Herrou J, Bompard C, Wintjens R, Dupré E, Willery E, Villeret V, Loch C, Antoine R, Jacob-Dubuisson F. Periplasmic domain of the sensor-kinase BvgS reveals a new paradigm for the Venus flytrap mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010,107(40):17351-17355.
 173. Uhl MA, Miller JF. Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994,91(3):1163-1167.
 174. Deora R, Bootsma HJ, Miller JF, Cotter PA. Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol Microbiol*. 2001,40(3):669-683.
 175. Boucher PE, Maris AE, Yang M-S, Stibitz S. The response regulator BvgA and RNA polymerase α subunit C-terminal domain bind simultaneously to different faces of the same segment of promoter DNA. *Mol Cell*. 2003,11(1):163-173.
 176. Boucher PE, Murakami K, Ishihama A, Stibitz S. Nature of DNA binding and RNA polymerase interaction of the *Bordetella pertussis* BvgA transcriptional activator at the *fha* promoter. *J Bacteriol*. 1997,179(5):1755-1763.
 177. Cotter PA, Jones AM. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol*. 2003,11(8):367-373.
 178. Stibitz S, Yang MS. Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the vir locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol*. 1991,173(14):4288-4296.
 179. Boucher PE, Stibitz S. Synergistic binding of RNA polymerase and BvgA phosphate to the pertussis toxin promoter of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol*. 1995,177(22):6486-6491.
 180. Cotter PA, Miller JF. A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* *bvgS* gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens. *Mol Microbiol*. 1997,24(4):671-685.
 181. Dupre E, Wohlkonig A, Herrou J, Loch C, Jacob-Dubuisson F, Antoine R. Characterization of the PAS domain in the sensor-kinase BvgS: mechanical role in signal transmission. *BMC Microbiol*. 2013,13:172.
 182. Melton AR, Weiss AA. Characterization of environmental regulators of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 1993,61(3):807-815.
 183. Merkel TJ, Barros C, Stibitz S. Characterization of the *bvgR* locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol*. 1998,180(7):1682-1690.
 184. Merkel TJ, Boucher PE, Stibitz S, Grippe VK. Analysis of *bvgR* expression in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol*. 2003,185(23):6902-6912.

185. Scarlato V, Arico B, Prugnola A, Rappuoli R. Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J*. 1991,10(12):3971-3975.
186. Veal-Carr WL, Stibitz S. Demonstration of differential virulence gene promoter activation in vivo in *Bordetella pertussis* using RIVET. *Mol Microbiol*. 2005,55(3):788-798.
187. Roy CR, Miller JF, Falkow S. Autogenous regulation of the *Bordetella pertussis* bvgABC operon. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990,87(10):3763-3767.
188. Jones AM, Boucher PE, Williams CL, Stibitz S, Cotter PA. Role of BvgA phosphorylation and DNA binding affinity in control of Bvg-mediated phenotypic phase transition in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol*. 2005,58(3):700-713.
189. Moon K, Bonocora RP, Kim DD, Chen Q, Wade JT, Stibitz S, Hinton DM. The BvgAS Regulon of *Bordetella pertussis*. *MBio*. 2017,8(5).
190. Stockbauer KE, Fuchslocher B, Miller JF, Cotter PA. Identification and characterization of BipA, a *Bordetella* Bvg-intermediate phase protein. *Mol Microbiol*. 2001,39(1):65-78.
191. Sukumar N, Mishra M, Sloan GP, Ogi T, Deora R. Differential Bvg phase-dependent regulation and combinatorial role in pathogenesis of two *Bordetella* paralogs, BipA and BcfA. *J Bacteriol*. 2007,189(10):3695-3704.
192. McCabe K TJ, Hernandez M, Merkel T. Regulation and function of the *Bordetella pertussis* aerosol tolerance genes. *9th International Bordetella Symposium*. 2010.
193. Vergara-Irigaray N, Chavarri-Martinez A, Rodriguez-Cuesta J, Miller JF, Cotter PA, Martinez de Tejada G. Evaluation of the role of the Bvg intermediate phase in *Bordetella pertussis* during experimental respiratory infection. *Infect Immun*. 2005,73(2):748-760.
194. Jungnitz H, West NP, Walker MJ, Chhatwal GS, Guzman CA. A second two-component regulatory system of *Bordetella bronchiseptica* required for bacterial resistance to oxidative stress, production of acid phosphatase, and in vivo persistence. *Infect Immun*. 1998,66(10):4640-4650.
195. Comeau DE, Ikenaka K, Tsung K, Inouye M. Primary characterization of the protein products of the *Escherichia coli* ompB locus: structure and regulation of synthesis of the OmpR and EnvZ proteins. *J Bacteriol*. 1985,164(2):578-584.
196. Aranda CA, Swanson JA, LooMI S WP, Miller SI. *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992,89(21):10079-10083.
197. Miller SI, Kukral AM, Mekalanos JJ. A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989,86(13):5054-5058.
198. Stenson TH, Allen AG, Al-Meer JA, Maskell D, Peppler MS. *Bordetella pertussis* risA, but not risS, is required for maximal expression of Bvg-repressed genes. *Infect Immun*. 2005,73(9):5995-6004.
199. Chen Q, Ng V, Warfel JM, Merkel TJ, Stibitz S. Activation of Bvg-repressed genes in *Bordetella pertussis* by RisA requires cross talk from noncooperonic histidine kinase RisK. *J Bacteriol*. 2017,199(22):e00475-00417.
200. Coutte L, Huot L, Antoine R, Slupek S, Merkel TJ, Chen Q, Stibitz S, Hot D, Loch C. The multifaceted RisA regulon of *Bordetella pertussis*. *Sci Rep*. 2016,6:32774.
201. Croinin TO, Grippe VK, Merkel TJ. Activation of the vrg6 promoter of *Bordetella pertussis* by RisA. *J Bacteriol*. 2005,187(5):1648-1658.
202. Bone MA, Wilk AJ, Perault AI, Marlatt SA, Scheller EV, Anthouard R, Chen Q, Stibitz S, Cotter PA, Julio SM. *Bordetella* PlrSR regulatory system controls BvgAS activity and virulence in the lower respiratory tract. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017.
203. Vogel J, Luisi BF. Hfq and its constellation of RNA. *Nature Reviews Microbiology*. 2011,9(8):578.

204. Bibova I, Hot D, Keidel K, Amman F, Slupek S, Cerny O, Gross R, Vecerek B. Transcriptional profiling of *Bordetella pertussis* reveals requirement of RNA chaperone Hfq for Type III secretion system functionality. *RNA Biol.* 2015,12(2):175-185.
205. Bibova I, Skopova K, Masin J, Cerny O, Hot D, Sebo P, Vecerek B. The RNA chaperone Hfq is required for virulence of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 2013,81(11):4081-4090.
206. Cookson BT, Tyler AN, Goldman WE. Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Biochemistry (Mosc).* 1989,28(4):1744-1749.
207. Rosenthal RS, Nogami W, Cookson BT, Goldman WE, Folkening WJ. Major fragment of soluble peptidoglycan released from growing *Bordetella pertussis* is tracheal cytotoxin. *Infect Immun.* 1987,55(9):2117-2120.
208. Wilson R, Read R, Thomas M, Rutman A, Harrison K, Lund V, Cookson B, Goldman W, Lambert H, Cole P. Effects of *Bordetella pertussis* infection on human respiratory epithelium in vivo and in vitro. *Infect Immun.* 1991,59(1):337-345.
209. Flak TA, Goldman WE. Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell Microbiol.* 1999,1(1):51-60.
210. Flak TA, Goldman WE. Autotoxicity of nitric oxide in airway disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996,154(4 Pt 2):S202-206.
211. Preston A, Thomas R, Maskell DJ. Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* wlb LPS biosynthesis locus. *Microb Pathog.* 2002,33(3):91-95.
212. Ayme G, Caroff M, Chaby R, Haeffner-Cavaillon N, Le Dur A, Moreau M, Muset M, y col. Biological activities of fragments derived from *Bordetella pertussis* endotoxin: isolation of a nontoxic, Shwartzman-negative lipid A possessing high adjuvant properties. *Infect Immun.* 1980,27(3):739-745.
213. Nakase Y, Tateishi M, Sekiya K, Kasuga T. Chemical and biological properties of the purified O antigen of *Bordetella pertussis*. *Jpn J Microbiol.* 1970,14(1):1-8.
214. Watanabe M, Takimoto H, Kumazawa Y, Amano K. Biological properties of lipopolysaccharides from *Bordetella* species. *J Gen Microbiol.* 1990,136(3):489-493.
215. Mann PB, Wolfe D, Latz E, Golenbock D, Preston A, Harvill ET. Comparative toll-like receptor 4-mediated innate host defense to *Bordetella* infection. *Infect Immun.* 2005,73(12):8144-8152.
216. Schaeffer LM, McCormack FX, Wu H, Weiss AA. *Bordetella pertussis* lipopolysaccharide resists the bactericidal effects of pulmonary surfactant protein A. *J Immunol.* 2004,173(3):1959-1965.
217. Skaar EP. The Battle for Iron between Bacterial Pathogens and Their Vertebrate Hosts. *PLoS Path.* 2010,6(8):e1000949.
218. Kehl-Fie TE, Skaar EP. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Curr Opin Chem Biol.* 2010,14(2):218-224.
219. Schalk IJ, Guillon L. Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways. *Amino Acids.* 2013,44(5):1267-1277.
220. Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007,71(3):413-451.
221. Moore CH, Foster LA, Gerbig DG, Jr., Dyer DW, Gibson BW. Identification of alcaligin as the siderophore produced by *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *J Bacteriol.* 1995,177(4):1116-1118.
222. Beall B, Sanden GN. A *Bordetella pertussis* *fepA* homologue required for utilization of exogenous ferric enterobactin. *Microbiology.* 1995,141 (Pt 12):3193-3205.
223. Vanderpool CK, Armstrong SK. The *Bordetella* *bhu* locus is required for heme iron utilization. *J Bacteriol.* 2001,183(14):4278-4287.

224. Brickman TJ, Suhadolc RJ, Armstrong SK. Interspecies variations in *Bordetella* catecholamine receptor gene regulation and function. *Infect Immun*. 2015,83(12):4639-4652.
225. Brickman TJ, Armstrong SK. Iron and pH-responsive FtrABCD ferrous iron utilization system of *Bordetella* species. *Mol Microbiol*. 2012,86(3):580-593.
226. Hood MI, Skaar EP. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol*. 2012,10(8).
227. Beaumont FC, Kang HY, Brickman TJ, Armstrong SK. Identification and characterization of alcR, a gene encoding an AraC-like regulator of alcaligin siderophore biosynthesis and transport in *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol*. 1998,180(4):862-870.
228. Brickman TJ, Kang HY, Armstrong SK. Transcriptional activation of *Bordetella* alcaligin siderophore genes requires the AlcR regulator with alcaligin as inducer. *J Bacteriol*. 2001,183(2):483-489.
229. Pradel E, Guiso N, Loch C. Identification of AlcR, an AraC-type regulator of alcaligin siderophore synthesis in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol*. 1998,180(4):871-880.
230. Brickman TJ, Armstrong SK. *Bordetella* AlcS transporter functions in alcaligin siderophore export and is central to inducer sensing in positive regulation of alcaligin system gene expression. *J Bacteriol*. 2005,187(11):3650-3661.
231. Brickman TJ, Armstrong SK. Essential role of the iron-regulated outer membrane receptor FauA in alcaligin siderophore-mediated iron uptake in *Bordetella* species. *J Bacteriol*. 1999,181(19):5958-5966.
232. Brickman TJ, Armstrong SK. Temporal signaling and differential expression of *Bordetella* iron transport systems: the role of ferrimones and positive regulators. *BioMetals*. 2009,22(1):33-41.
233. Brickman TJ, Anderson MT, Armstrong SK. *Bordetella* iron transport and virulence. *BioMetals*. 2007,20(3-4):303-322.
234. Moeck GS, Coulton JW. TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol Microbiol*. 1998,28(4):675-681.
235. Pradel E, Guiso N, Menozzi FD, Loch C. *Bordetella pertussis* TonB, a Bvg-independent virulence determinant. *Infect Immun*. 2000,68(4):1919-1927.
236. Neilands JB. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem*. 1995,270(45):26723-26726.
237. Anderson MT, Armstrong SK. The BfeR regulator mediates enterobactin-inducible expression of *Bordetella* enterobactin utilization genes. *J Bacteriol*. 2004,186(21):7302-7311.
238. Beall BW, Sanden GN. Cloning and initial characterization of the *Bordetella pertussis* fur gene. *Curr Microbiol*. 1995,30(4):223-226.
239. Vidakovics ML, Paba J, Lamberti Y, Ricart CA, de Sousa MV, Rodriguez ME. Profiling the *Bordetella pertussis* proteome during iron starvation. *J Proteome Res*. 2007,6(7):2518-2528.
240. Banerjee S, Weerasinghe AJ, Parker Siburt CJ, Kreulen RT, Armstrong SK, Brickman TJ, Lambert LA, Crumbliss AL. *Bordetella pertussis* FbpA binds both unchelated iron and iron siderophore complexes. *Biochemistry (Mosc)*. 2014,53(24):3952-3960.
241. Nicholson ML, Beall B. Disruption of tonB in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis* prevents utilization of ferric siderophores, haemin and haemoglobin as iron sources. *Microbiology*. 1999,145 (Pt 9):2453-2461.
242. Vanderpool CK, Armstrong SK. Integration of environmental signals controls expression of *Bordetella* heme utilization genes. *J Bacteriol*. 2004,186(4):938-948.

243. Sandrini SM, Shergill R, Woodward J, Muralikuttan R, Haigh RD, Lyte M, Freestone PP. Elucidation of the mechanism by which catecholamine stress hormones liberate iron from the innate immune defense proteins transferrin and lactoferrin. *J Bacteriol.* 2010,192(2):587-594.
244. Armstrong SK, Brickman TJ, Suhadolc RJ. Involvement of multiple distinct *Bordetella* receptor proteins in the utilization of iron liberated from transferrin by host catecholamine stress hormones. *Mol Microbiol.* 2012,84(3):446-462.
245. Cartron ML, Maddocks S, Gillingham P, Craven CJ, Andrews SC. Feo--transport of ferrous iron into bacteria. *BioMetals.* 2006,19(2):143-157.
246. Miller CL, Fletcher WB. Severity of notified whooping cough. *Br Med J.* 1976,1(6002):117-119.
247. Watanabe M, Nagai M. Acellular pertussis vaccines in Japan: past, present and future. *Expert Rev Vaccines.* 2005,4(2):173-184.
248. Sato Y, Sato H. Development of acellular pertussis vaccines. *Biologicals.* 1999,27(2):61-69.
249. Dirix V, Verscheure V, Goetghebuer T, Hainaut M, Debrue AS, Loch C, Mascart F. Cytokine and antibody profiles in 1-year-old children vaccinated with either acellular or whole-cell pertussis vaccine during infancy. *Vaccine.* 2009,27(43):6042-6047.
250. Ryan M, Gothefors L, Storsaeter J, Mills KH. *Bordetella pertussis*-specific Th1/Th2 cells generated following respiratory infection or immunization with an acellular vaccine: comparison of the T cell cytokine profiles in infants and mice. *Dev Biol Stand.* 1997,89:297-305.
251. Ryan M, Murphy G, Ryan E, Nilsson L, Shackley F, Gothefors L, Oymar K, Miller E, Storsaeter J, Mills KH. Distinct T-cell subtypes induced with whole cell and acellular pertussis vaccines in children. *Immunology.* 1998,93(1):1-10.
252. Ausiello CM, Urbani F, la Sala A, Lande R, Cassone A. Vaccine- and antigen-dependent type 1 and type 2 cytokine induction after primary vaccination of infants with whole-cell or acellular pertussis vaccines. *Infect Immun.* 1997,65(6):2168-2174.
253. Liese JG, Meschievitz CK, Harzer E, Froeschle J, Hosbach P, Hoppe JE, Porter F, Stojanov S, Niinivaara K, Walker AM, Belohradsky BH. Efficacy of a two-component acellular pertussis vaccine in infants. *Pediatr Infect Dis J.* 1997,16(11):1038-1044.
254. Schmitt HJ, von Konig CH, Neiss A, Bogaerts H, Bock HL, Schulte-Wissermann H, Gahr M, Schult R, Folkens JU, Rauh W, Clemens R. Efficacy of acellular pertussis vaccine in early childhood after household exposure. *JAMA.* 1996,275(1):37-41.
255. Simondon F, Preziosi MP, Yam A, Kane CT, Chabirand L, Itehan I, Sanden G, Mboup S, Hoffenbach A, Knudsen K, Guiso N, Wassilak S, Cadoz M. A randomized double-blind trial comparing a two-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal. *Vaccine.* 1997,15(15):1606-1612.
256. Stehr K, Cherry JD, Heininger U, Schmitt-Grohé S, Überall M, Laussucq S, Eckhardt T, Meyer M, Engelhardt R, Christenson P. 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.* 1998,101(1):1-11.
257. Gustafsson L, Hallander HO, Olin P, Reizenstein E, Storsaeter J. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N Engl J Med.* 1996,334(6):349-355.
258. Trollfors B, Taranger J, Lagergard T, Lind L, Sundh V, Zackrisson G, Lowe CU, Blackwelder W, Robbins JB. A placebo-controlled trial of a pertussis-toxoid vaccine. *N Engl J Med.* 1995,333(16):1045-1050.
259. Mills KH, Ryan M, Ryan E, Mahon BP. A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and

- cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 1998,66(2):594-602.
260. van den Berg BM, David S, Beekhuizen H, Mooi FR, van Furth R. Protection and humoral immune responses against *Bordetella pertussis* infection in mice immunized with acellular or cellular pertussis immunogens. *Vaccine*. 2000,19(9-10):1118-1128.
261. Wendelboe AM, Van Rie A, Salmaso S, Englund JA. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatr Infect Dis J*. 2005,24(5 Suppl):S58-61.
262. Mooi FR, Van Der Maas NA, De Melker HE. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin. *Epidemiol Infect*. 2014,142(4):685-694.
263. Halperin SA. The control of pertussis--2007 and beyond. *N Engl J Med*. 2007,356(2):110-113.
264. Yeh SH, Mink CM. Shift in the epidemiology of pertussis infection: an indication for pertussis vaccine boosters for adults? *Drugs*. 2006,66(6):731-741.
265. Fingermann M, Fernandez J, Sisti F, Rodriguez ME, Gatti B, Bottero D, Graieb A, Gaillard ME, Ayala SG, Mooi FR, Lopardo H, Hozbor D. Differences of circulating *Bordetella pertussis* population in Argentina from the strain used in vaccine production. *Vaccine*. 2006,24(17):3513-3521.
266. Hozbor D, Mooi F, Flores D, Weltman G, Bottero D, Fossati S, Lara C, Gaillard ME, Pianciola L, Zurita E, Fioriti A, Archuby D, Galas M, Binsztein N, Regueira M, Castuma C, Fingermann M, Graieb A. Pertussis epidemiology in Argentina: trends over 2004-2007. *J Infect*. 2009,59(4):225-231.
267. Hegerle N, Guiso N. *Bordetella pertussis* and pertactin-deficient clinical isolates: lessons for pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2014,13(9):1135-1146.
268. Carbonetti NH, Von König CHW, Lan R, Jacob-Dubuisson F, Cotter PA, Deora R, Merkel TJ, Van Els CA, Loch C, Hozbor D. Highlights of the 11th international *Bordetella* symposium: from basic biology to vaccine development. *Clin Vaccine Immunol*. 2016:CVI. 00388-00316.
269. Forsyth KD, Campins-Marti M, Caro J, Cherry JD, Greenberg D, Guiso N, Heining U, Schellekens J, Tan T, von König CH, Plotkin S. New pertussis vaccination strategies beyond infancy: recommendations by the global pertussis initiative. *Clin Infect Dis*. 2004,39(12):1802-1809.
270. Van Rie A, Wendelboe AM, Englund JA. Role of maternal pertussis antibodies in infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2005,24(5 Suppl):S62-65.
271. Mooi FR, de Greeff SC. The case for maternal vaccination against pertussis. *Lancet Infect Dis*. 2007,7(9):614-624.
272. Vizzotti C, Neyro S, Katz N, Juárez MV, Perez Carrega ME, Aquino A, Kaski Fullone F. Maternal immunization in Argentina: A storyline from the prospective of a middle income country. *Vaccine*. 2015,33(47):6413-6419.
273. Boehm DT, Hall JM, Wong TY, DiVenere A, Sen-Kilic E, Bevere JR, Bradford SD, Blackwood CB, Elkins C, DeRoos KA. Evaluation of adenylate cyclase toxoid antigen in acellular pertussis vaccines using a *Bordetella pertussis* challenge model in mice. *Infect Immun*. 2018:IAI. 00857-00817.
274. Marr N, Oliver DC, Laurent V, Poolman J, Denoel P, Fernandez RC. Protective activity of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter in the murine lung colonization model. *Vaccine*. 2008,26(34):4306-4311.
275. Loch C. Pertussis: acellular, whole-cell, new vaccines, what to choose? *Expert Rev Vaccines*. 2016,15(6):671-673.
276. Feunou PF, Kammoun H, Debrie AS, Mielcarek N, Loch C. Long-term immunity against pertussis induced by a single nasal administration of live attenuated *B. pertussis* BPZE1. *Vaccine*. 2010,28(43):7047-7053.

277. Locht C, Papin JF, Lecher S, Debrie A-S, Thalen M, Solovay K, Rubin K, Mielcarek N. Live Attenuated Pertussis Vaccine BPZE1 Protects Baboons Against *Bordetella pertussis* Disease and Infection. *The Journal of infectious diseases*. 2017,216(1):117-124.
278. Roberts R, Moreno G, Bottero D, Gaillard ME, Fingerhann M, Graieb A, Rumbo M, Hozbor D. Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. *Vaccine*. 2008,26(36):4639-4646.
279. Asensio CJA, Gaillard ME, Moreno G, Bottero D, Zurita E, Rumbo M, van der Ley P, van der Ark A, Hozbor D. Outer membrane vesicles obtained from *Bordetella pertussis* Tohama expressing the lipid A deacylase PagL as a novel acellular vaccine candidate. *Vaccine*. 2011,29(8):1649-1656.
280. Alvarez Hayes J, Erben E, Lamberti Y, Principi G, Maschi F, Ayala M, Rodriguez ME. *Bordetella pertussis* iron regulated proteins as potential vaccine components. *Vaccine*. 2013,31(35):3543-3548.
281. Alvarez Hayes J, Erben E, Lamberti Y, Ayala M, Maschi F, Carbone C, Gatti B, Parisi G, Rodriguez ME. Identification of a new protective antigen of *Bordetella pertussis*. *Vaccine*. 2011,29(47):8731-8739.
282. Celentano LP, Massari M, Paramatti D, Salmaso S, Tozzi AE. Resurgence of pertussis in Europe. *Pediatr Infect Dis J*. 2005,24(9):761-765.
283. Pertussis--United States, 2001-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2005,54(50):1283-1286.
284. Cherry JD. Epidemiological, clinical, and laboratory aspects of pertussis in adults. *Clin Infect Dis*. 1999,28 Suppl 2:S112-117.
285. Wheeler JG, Simmons AL. Pertussis update. *Pediatr Infect Dis J*. 2005,24(9):829-830.
286. Edwards K, Freeman DM. Adolescent and adult pertussis: disease burden and prevention. *Curr Opin Pediatr*. 2006,18(1):77-80.
287. De Serres G, Shadmani R, Duval B, Boulianne N, Dery P, Douville Fradet M, Rochette L, Halperin SA. Morbidity of pertussis in adolescents and adults. *J Infect Dis*. 2000,182(1):174-179.
288. Kowalzik F, Barbosa AP, Fernandes VR, Carvalho PR, Avila-Aguero ML, Goh DY, Goh A, de Miguel JG, Moraga F, Roca J, Campins M, Huang M, Quian J, Riley N, Beck D, Verstraeten T. Prospective multinational study of pertussis infection in hospitalized infants and their household contacts. *Pediatr Infect Dis J*. 2007,26(3):238-242.
289. Senanayake S. Pertussis in Australia today - a disease of adolescents and adults that can kill infants. *Aust Fam Physician*. 2007,36(1-2):51-56.
290. von Konig CH, Halperin S, Riffelmann M, Guiso N. Pertussis of adults and infants. *Lancet Infect Dis*. 2002,2(12):744-750.
291. Fine PE, Clarkson JA. The recurrence of whooping cough: possible implications for assessment of vaccine efficacy. *Lancet*. 1982,1(8273):666-669.
292. Bouchez V, Guiso N. *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, vaccines and cycles of whooping cough. *Pathogens and disease*. 2015,73(7).
293. Warfel JM, Zimmerman LI, Merkel TJ. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013.
294. Fabricius G, Aispuro PM, Bergero P, Bottero D, Gabrielli M, Hozbor D. Pertussis epidemiology in Argentina: TRENDS after the introduction of maternal immunisation. *Epidemiology & Infection*. 2018:1-9.
295. Cotter P MJ, Groisman E. *Bordetella* Principles of bacterial pathogenesis. London, United Kingdom: Academic Press, Ltd. 2001:619-674.
296. Luker KE, Tyler AN, Marshall GR, Goldman WE. Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in pertussis. *Mol Microbiol*. 1995,16(4):733-743.

297. Brickman TJ, Armstrong SK. Impact of alcaligin siderophore utilization on in vivo growth of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 2007,75(11):5305-5312.
298. Brickman TJ, Hanawa T, Anderson MT, Suhadolc RJ, Armstrong SK. Differential expression of *Bordetella pertussis* iron transport system genes during infection. *Mol Microbiol*. 2008,70(1):3-14.
299. Brickman TJ, Vanderpool CK, Armstrong SK. Heme transport contributes to in vivo fitness of *Bordetella pertussis* during primary infection in mice. *Infect Immun*. 2006,74(3):1741-1744.
300. Gorringer AR, Woods G, Robinson A. Growth and siderophore production by *Bordetella pertussis* under iron-restricted conditions. *FEMS Microbiol Lett*. 1990,54(1-3):101-105.
301. Menozzi FD, Gantiez C, Locht C. Identification and purification of transferrin- and lactoferrin-binding proteins of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun*. 1991,59(11):3982-3988.
302. Ng AW, Bidani A, Heming TA. Innate host defense of the lung: effects of lung-lining fluid pH. *Lung*. 2004,182(5):297-317.
303. Fischer H, Widdicombe JH. Mechanisms of acid and base secretion by the airway epithelium. *J Membr Biol*. 2006,211(3):139-150.
304. Bosch A, Serra D, Prieto C, Schmitt J, Naumann D, Yantorno O. Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006,71(5):736-747.
305. Serra D, Bosch A, Russo DM, Rodriguez ME, Zorreguieta A, Schmitt J, Naumann D, Yantorno O. Continuous nondestructive monitoring of *Bordetella pertussis* biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy and other corroborative techniques. *Anal Bioanal Chem*. 2007,387(5):1759-1767.
306. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002,15(2):167-193.
307. Mishra M, Parise G, Jackson KD, Wozniak DJ, Deora R. The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*. *J Bacteriol*. 2005,187(4):1474-1484.
308. Conover MS, Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Deora R. The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Mol Microbiol*. 2010,77(6):1439-1455.
309. Serra DO, Conover MS, Arnal L, Sloan GP, Rodriguez ME, Yantorno OM, Deora R. FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS ONE*. 2011,6(12):e28811.
310. Cattelan N, Jennings-Gee J, Dubey P, Yantorno OM, Deora R. Hyperbiofilm Formation by *Bordetella pertussis* Strains Correlates with Enhanced Virulence Traits. *Infect Immun*. 2017.
311. Arnal L, Grunert T, Cattelan N, De Gouw D, Villalba MI, Serra DO, Mooi FR, Ehling-Schulz M, Yantorno OM. *Bordetella pertussis* isolates from argentinean whooping cough patients display enhanced biofilm formation capacity compared to Tohama I reference strain. *Frontiers in microbiology*. 2015,6.
312. Cherry JD. The epidemiology of pertussis: a comparison of the epidemiology of the disease pertussis with the epidemiology of *Bordetella pertussis* infection. *Pediatrics*. 2005,115(5):1422-1427.
313. Bassinet L, Gueirard P, Maitre B, Housset B, Gounon P, Guiso N. Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 2000,68(4):1934-1941.
314. Ewanowich CA, Melton AR, Weiss AA, Sherburne RK, Peppler MS. Invasion of HeLa 229 cells by virulent *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 1989,57(9):2698-2704.

315. Gueirard P, Bassinet L, Bonne I, Prevost MC, Guiso N. Ultrastructural analysis of the interactions between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* and human tracheal epithelial cells. *Microb Pathog.* 2005,38(1):41-46.
316. Hellwig SM, Hazenbos WL, van de Winkel JG, Mooi FR. Evidence for an intracellular niche for *Bordetella pertussis* in broncho-alveolar lavage cells of mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999,26(3-4):203-207.
317. Bromberg K, Tannis G, Steiner P. Detection of *Bordetella pertussis* associated with the alveolar macrophages of children with human immunodeficiency virus infection. *Infect Immun.* 1991,59(12):4715-4719.
318. Mills KH. Immunity to *Bordetella pertussis*. *Microbes Infect.* 2001,3(8):655-677.
319. Lamberti Y, Perez Vidakovics ML, van der Pol LW, Rodriguez ME. Cholesterol-rich domains are involved in *Bordetella pertussis* phagocytosis and intracellular survival in neutrophils. *Microb Pathog.* 2008,44(6):501-511.
320. Eby JC, Gray MC, Hewlett EL. Cyclic AMP-mediated Suppression of Neutrophil Extracellular Trap Formation and Apoptosis by the *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin. *Infect Immun.* 2014:IAI. 02487-02414.
321. Vidakovics ML, Lamberti Y, Serra D, Berbers GA, van der Pol WL, Rodriguez ME. Iron stress increases *Bordetella pertussis* mucin-binding capacity and attachment to respiratory epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007,51(2):414-421.
322. Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovics ML, Harvill ET, Rodriguez ME. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun.* 2010,78(3):907-913.
323. Guidi-Rontani C. The alveolar macrophage: the Trojan horse of *Bacillus anthracis*. *Trends Microbiol.* 2002,10(9):405-409.
324. Nguyen L, Pieters J. The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Trends Cell Biol.* 2005,15(5):269-276.
325. Sato Y, Izumiya K, Sato H, Cowell J, Manclark C. Aerosol infection of mice with *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1980,29(1):261-266.
326. Fedele G, Cassone A, Ausiello CM. T-cell immune responses to *Bordetella pertussis* infection and vaccination. *Pathog Dis.* 2015,73(7).
327. Higgs R, Higgins SC, Ross PJ, Mills KHG. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunology.* 2012,5:485.
328. Belcher CE, Drenkow J, Kehoe B, Gingeras TR, McNamara N, Lemjabbar H, Basbaum C, Relman DA. The transcriptional responses of respiratory epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000,97(25):13847-13852.
329. Bassinet L, Fitting C, Housset B, Cavaillon JM, Guiso N. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin induces interleukin-6 secretion by human tracheal epithelial cells. *Infect Immun.* 2004,72(9):5530-5533.
330. Khelef N, DeShazer D, Friedman RL, Guiso N. *In vivo* and *in vitro* analysis of *Bordetella pertussis* catalase and Fe-superoxide dismutase mutants. *FEMS Microbiol Lett.* 1996,142(2-3):231-235.
331. Byrne P, McGuirk P, Todryk S, Mills KH. Depletion of NK cells results in disseminating lethal infection with *Bordetella pertussis* associated with a reduction of antigen-specific Th1 and enhancement of Th2, but not Tr1 cells. *Eur J Immunol.* 2004,34(9):2579-2588.
332. McGuirk P, Mahon BP, Griffin F, Mills KH. Compartmentalization of T cell responses following respiratory infection with *Bordetella pertussis*: hyporesponsiveness of lung T cells is associated with modulated expression of the co-stimulatory molecule CD28. *Eur J Immunol.* 1998,28(1):153-163.
333. McWilliam AS, Napoli S, Marsh AM, Pemper FL, Nelson DJ, Pimm CL, Stumbles PA, Wells TN, Holt PG. Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the

- inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. *J Exp Med*. 1996,184(6):2429-2432.
334. Vandebriel RJ, Hellwig SM, Vermeulen JP, Hoekman JH, Dormans JA, Roholl PJ, Mooi FR. Association of *Bordetella pertussis* with host immune cells in the mouse lung. *Microb Pathog*. 2003,35(1):19-29.
335. Cundell DR, Kanthakumar K, Taylor GW, Goldman WE, Flak T, Cole PJ, Wilson R. Effect of tracheal cytotoxin from *Bordetella pertussis* on human neutrophil function in vitro. *Infect Immun*. 1994,62(2):639-643.
336. Ross PJ, Lavelle EC, Mills KH, Boyd AP. 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*. 2004,72(3):1568-1579.
337. Boschwitz JS, Batanghari JW, Kedem H, Relman DA. *Bordetella pertussis* infection of human monocytes inhibits antigen-dependent CD4 T cell proliferation. *J Infect Dis*. 1997,176(3):678-686.
338. Hickey FB, Brereton CF, Mills KH. 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*. 2008,84(1):234-243.
339. Mills KH, Barnard A, Watkins J, Redhead K. Cell-mediated immunity to *Bordetella pertussis*: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. *Infect Immun*. 1993,61(2):399-410.
340. Leef M, Elkins KL, Barbic J, Shahin RD. Protective Immunity to *Bordetella pertussis* Requires Both B Cells and Cd4(+) T Cells for Key Functions Other than Specific Antibody Production. *J Exp Med*. 2000,191(11):1841-1852.
341. Liew FY. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nat Rev Immunol*. 2002,2(1):55-60.
342. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989,7:145-173.
343. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986,136(7):2348-2357.
344. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005,6(11):1133-1141.
345. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*. 2008,28(4):454-467.
346. Mahon BP, Sheahan BJ, Griffin F, Murphy G, Mills KH. Atypical disease after *Bordetella pertussis* respiratory infection of mice with targeted disruptions of interferon-gamma receptor or immunoglobulin mu chain genes. *J Exp Med*. 1997,186(11):1843-1851.
347. Peppoloni S, Nencioni L, Di Tommaso A, Tagliabue A, Parronchi P, Romagnani S, Rappuoli R, De Magistris MT. Lymphokine secretion and cytotoxic activity of human CD4+ T-cell clones against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 1991,59(10):3768-3773.
348. Barbic J, Leef MF, Burns DL, Shahin RD. Role of gamma interferon in natural clearance of *Bordetella pertussis* infection. *Infect Immun*. 1997,65(12):4904-4908.
349. Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KH. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol*. 2006,177(11):7980-7989.
350. Dunne A, Ross PJ, Pospisilova E, Masin J, Meaney A, Sutton CE, Iwakura Y, Tschopp J, Sebo P, Mills KH. Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against *Bordetella pertussis*. *J Immunol*. 2010,185(3):1711-1719.

351. Warfel JM, Merkel TJ. The baboon model of pertussis: effective use and lessons for pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2014,13(10):1241-1252.
352. Fedele G, Bianco M, Ausiello CM. The virulence factors of *Bordetella pertussis*: talented modulators of host immune response. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013,61(6):445-457.
353. Silva M. Classical Labeling of Bacterial Pathogens According to Their Lifestyle in the Host: Inconsistencies and Alternatives. *Frontiers in Microbiology*. 2012,3(71).
354. Garzoni C, Kelley WL. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol*. 2009,17(2):59-65.
355. Medina E, Goldmann O, Toppel AW, Chhatwal GS. Survival of *Streptococcus pyogenes* within host phagocytic cells: a pathogenic mechanism for persistence and systemic invasion. *The Journal of infectious diseases*. 2003,187(4):597-603.
356. Bergmann S, Lang A, Rohde M, Agarwal V, Rennemeier C, Grashoff C, Preissner KT, Hammerschmidt S. Integrin-linked kinase is required for vitronectin-mediated internalization of *Streptococcus pneumoniae* by host cells. *J Cell Sci*. 2009,122(2):256-267.
357. Russell BH, Liu Q, Jenkins SA, Tuvim MJ, Dickey BF, Xu Y. *In vivo* demonstration and quantification of intracellular *Bacillus anthracis* in lung epithelial cells. *Infect Immun*. 2008,76(9):3975-3983.
358. Allen L. Intracellular niches for extracellular bacteria: lessons from *Helicobacter pylori*. *J Leukoc Biol*. 1999,66(5):753-756.
359. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*. 2010,8(1):26.
360. Lan R, Reeves PR. *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella*. *Microb Infect*. 2002,4(11):1125-1132.
361. Barnich N, Carvalho FA, Glasser A-L, Darcha C, Jantscheff P, Allez M, Peeters H, Bommelaer G, Desreumaux P, Colombel J-F. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *The Journal of clinical investigation*. 2007,117(6):1566-1574.
362. Hunstad DA, Justice SS. Intracellular lifestyles and immune evasion strategies of uropathogenic *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol*. 2010,64:203-221.

Capítulo 2

Materiales y métodos

2. Materiales y métodos

2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas y plásmidos utilizados en este estudio se detallan en la **Tabla 2.1**. Las cepas de *Bordetella pertussis* fueron cultivadas en placas de agar Bordet Gengou (ABG) (Difco Laboratories, EE. UU.), suplementada con 15% v/v de sangre desfibrinada de carnero (Laboratorio Argentino, Caseros, Argentina) durante 72 h a 37 °C. Al cabo de este tiempo se repicó en una nueva placa ABG y se cultivó a 37 °C durante 24 h. Las cepas de *Escherichia coli* fueron cultivadas en agar Luria-Bertani (LB) o en caldo LB. Para realizar ensayos de infección con *B. pertussis* se extrajo un inóculo del cultivo en medio sólido ABG para iniciar cultivos en medio líquido Stainer-Scholte (SS) [1] con una densidad celular inicial equivalente a DO₆₅₀ (densidad óptica a 650 nm) 0,2 y se cultivó a 37 °C y 160 rpm durante 16 h.

Tabla 2.1. Descripción de las cepas y plásmidos utilizados en este estudio

Cepa	Descripción	Referencia
<i>B. pertussis</i> Tohama	Genotipo salvaje, Cex ^R	Instituto Pasteur, Francia
<i>B. pertussis</i> $\Delta bfrDE$	Cepa mutante por eliminación en <i>bfrD</i> (ORF BP0856) y <i>bfrE</i> (ORF BP0857), derivada de Tohama	Este estudio
<i>B. pertussis</i> $\Delta irp1-3$	Cepa mutante por eliminación en <i>irp1-3</i> (ORF BP1152), derivada de Tohama	Este estudio
<i>B. pertussis</i> $\Delta bfrDE \Delta irp1-3$	Cepa mutante por eliminación en <i>bfrD</i> (ORF BP0856), <i>bfrE</i> (ORF BP0857) e <i>irp1-3</i> (ORF BP1152), derivada de Tohama	Este estudio
<i>B. pertussis</i> $\Delta mgtC$	Cepa mutante por eliminación en <i>mgtC</i> (ORF BP0414), derivada de Tohama	Este estudio
<i>E. coli</i> DH5 α	Cepa de laboratorio	Stratagene
<i>E. coli</i> SM10(λ pir)	Cepa donadora utilizada en conjugación	[2]

Plásmido	Descripción	Referencia
pSS4245	Plásmido de intercambio alélico Amp ^R , Km ^R , Sm ^R	[3]
pSS4245Δ <i>bfrDE</i>	Plásmido para eliminar <i>bfrDE</i> , derivado de pSS4245	Este estudio
pSS4245Δ <i>irp1-3</i>	Plásmido para eliminar <i>irp1-3</i> , derivado de pSS4245	Este estudio
pSS4245Δ <i>mgtC</i>	Plásmido para eliminar <i>mgtC</i> , derivado de pSS4245	Este estudio
pBBR1MCS	Plásmido de complementación, Cm ^R	[4]
pBBR- <i>bfrDE</i>	Plásmido de complementación de <i>bfrDE</i> , derivado de pBBR1MCS	Este estudio
pBBR- <i>mgtC</i>	Plásmido de complementación de <i>mgtC</i> , derivado de pBBR1MCS	Este estudio

R: Resistente. Amp: ampicilina Cex: cefalexina. Cm: cloranfenicol. Km: kanamicina. Sm: estreptomycinina

2.1.1. Cultivo en limitación de hierro y detección de sideróforos

Para cultivar *B. pertussis* bajo limitación de hierro se iniciaron cultivos en medio SS usando como inóculo bacterias crecidas en ABG. Los cultivos se incubaron a 37 °C y 160 rpm durante 16 h, las bacterias fueron recuperadas por centrifugación (10.000 × *g*, 15 min) y lavadas con solución salina estéril libre de hierro. Volúmenes iguales de la suspensión bacteriana fueron utilizados para inocular SS (SS, 36 μM FeSO₄·7H₂O) y medio SS libre de hierro (SS-Fe, sin el agregado de FeSO₄·7H₂O), preparado como se describió previamente [5]. Las bacterias fueron cultivadas durante 20 h (37 °C, 160 rpm) y los cultivos repicados dos veces en el medio de cultivo respectivo. Para confirmar la limitación en hierro de *B. pertussis* se empleó el ensayo de cromo azurol S (CAS) para detectar la presencia de sideróforos en el sobrenadante de cultivo según fue descrito por Schwyn y Neilands [6]. Brevemente, muestras de cultivos de *B. pertussis* en medio SS-Fe y SS fueron centrifugadas para remover las células y al sobrenadante se le adicionó un volumen equivalente de solución CAS. El cambio de color de azul a pardo-anaranjado indica la presencia de sideróforos, mientras que en ausencia de estos últimos la solución permanece azul. El sobrenadante de *B. pertussis* cultivada en exceso de hierro (medio SS) fue empleado como control negativo.

En determinados experimentos se adicionó (+)-bitartrato de L-(-)-Norepinefrina monohidrato (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EE. UU.) en una concentración final de 1 μM a cultivos SS de *B. pertussis* con exceso o limitación en hierro.

2.1.2. Cultivo en pH ligeramente ácido

Se estudió el crecimiento de *B. pertussis* en medios de cultivo con distintos valores de pH utilizando un medio SS modificado (SS-MES) en el cual el *buffer* Tris presente en el medio SS fue reemplazando por 50 mM de ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES) (Sigma-Aldrich) con capacidad *buffer* adecuada para trabajar a pH ligeramente ácido. El medio SS-MES se ajustó a pH 7,6, 6,0 o 5,0 con NaOH. Para cada ensayo, las bacterias fueron cultivadas hasta una DO_{650} de 1 en SS, lavadas una vez en solución salina e inoculadas en el medio SS-MES correspondiente con una DO_{650} inicial de 0,2. Los cultivos de bacterias en SS-MES a pH 7,6, 6,0 y pH 5,0 se realizaron a 37 °C en condiciones de agitación (160 rpm). Alícuotas del cultivo fueron tomadas a diferentes intervalos de tiempo para determinar el pH del medio y cuantificar la DO_{650} como medida del crecimiento bacteriano.

2.1.3. Cultivo en limitación de magnesio

Para evaluar el crecimiento de *B. pertussis* en condiciones limitantes de magnesio se utilizó medio SS con MgCl_2 500 μM (SS, exceso de magnesio) o con MgCl_2 10 μM (SS-Mg, limitación de magnesio). Las bacterias fueron cultivadas en ABG y se utilizaron para inocular SS-Mg con una DO_{650} inicial de 0,2. Los cultivos SS-Mg se incubaron a 37 °C en condiciones de agitación (160 rpm) durante 16 h. Estos cultivos se utilizaron para inocular medio SS y SS-Mg con una DO_{650} inicial de 0,2 y se incubaron a 37 °C en condiciones de agitación (160 rpm). Alícuotas del cultivo fueron tomadas a diferentes intervalos de tiempo y se cuantificó su DO_{650} como medida del crecimiento bacteriano.

2.2. Células y condiciones de cultivo

La línea celular monocítica humana THP-1 (ATCC TIB-202, Rockville, EE. UU.) se cultivó en medio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, EE. UU.) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (Gibco) (RPMI-SFB) a 37 °C en una atmósfera humidificada

de aire con CO₂ al 5% (v/v). La línea celular 16HBE14o- fue derivada de células epiteliales bronquiales normales inmortalizadas por transfección con el genoma del virus SV40 defectivo en el origen de replicación [7] (cedidas gentilmente por el Dr. Dieter Gruenert, Universidad de San Francisco, California, a través del Dr. Pablo Baldi, IDEHU, UBA). Las células 16HBE14o- fueron cultivadas según fue descrito por Cozens y col. [7], en botellas de cultivo tratadas con fibronectina, colágeno y seroalbúmina bovina (FN/C/BSA) en medio MEM suplementado con 10% (v/v) de SFB a 37 °C en una atmósfera humidificada de aire con CO₂ al 5% (v/v).

2.3. Anticuerpos y sueros

Los siguientes anticuerpos fueron utilizados para tinciones de microscopía confocal: fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con Cy3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, EE. UU.), fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC (Jackson ImmunoResearch) y suero de conejo anti-*B. pertussis* obtenido según se describe según Hellwig y col. [8]. Para citometría de flujo se utilizaron los anticuerpos monoclonales (mAc) anti-HLA-DR humano conjugados con FITC y su respectivo control de isotipo (BD Biosciences, San Jose, EE. UU.). Para detectar proteínas mediante inmunoblot se utilizaron sueros de ratón anti-rAfuA y anti-rIRP1-3 según fue descrito por Alvarez Hayes y col. [9, 10] y sueros anti-rPRN1 según fue descrito por Lamberti [11].

2.4. Infección de células

La línea celular monocítica humana THP-1 fue utilizada como modelo de infección de macrófagos humanos. Para ensayos de infección se sembraron en placas de 24 pocillos 4×10⁵ células THP-1 por pocillo en RPMI-SFB suplementado con 100 nM de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Sigma-Aldrich) y se incubó durante 24 h para la diferenciación a macrófagos. Luego las células se lavaron con *buffer* fosfato salino estéril (PBS) y se infectaron con *B. pertussis* en RPMI 1640 suplementado con seroalbúmina bovina al 0,2% (p/v) (BSA) (Sigma-Aldrich) con una multiplicidad de infección (R_ib/c) de 100 bacterias por célula. La concentración bacteriana se estimó mediante medidas de DO₆₅₀ y se cuantificó adicionalmente mediante recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC). Para facilitar la interacción bacteriana con células THP-1, las placas se

centrifugaron durante 5 minutos a $640 \times g$, temperatura ambiente. Después de 2 h a 37°C en 5% (v/v) de CO_2 , las células infectadas se lavaron con PBS para eliminar las bacterias no adherentes y se agregó medio fresco RPMI-SFB suplementado con $100 \mu\text{g/ml}$ de sulfato de polimixina B (Sigma-Aldrich), un antibiótico que no puede penetrar las células de los mamíferos [12], para inactivar a las bacterias extracelulares restantes. Después de 1 h a 37°C , las células fueron lavadas con PBS y se procesaron para determinar las bacterias intracelulares viables (3 h después de la infección) o se incubaron con medio RPMI-SFB suplementado con polimixina B $5 \mu\text{g/ml}$ durante 21 h o 45 h (24 h y 48 h post infección, respectivamente). En experimentos control se evaluó la actividad bactericida del antibiótico. Brevemente, muestras de 4×10^7 bacterias fueron incubadas con 1 ml de polimixina B ($100 \mu\text{g/ml}$), durante 1 h a 37°C , lavadas con PBS y sembradas en placas ABG. El tratamiento determinó una disminución del 99,9999% de UFC en todas las cepas de *B. pertussis* utilizadas en este estudio. A su vez, se examinó el número de UFC en los sobrenadantes de cultivo no detectándose bacterias viables en ningún momento de la infección. En los tiempos seleccionados después de la infección, las células se lavaron con PBS y se lisaron con agua estéril. En algunos casos, en vez de ser lisadas con agua, las células THP-1 fueron separadas de la placa de cultivo por incubación con EDTA 5 mM en PBS y la muestra se dividió en dos alícuotas. Una de ellas se utilizó para determinar el número de células THP-1 viables mediante tinción con azul de tripán y la otra alícuota fue centrifugada a $800 \times g$ y las células fueron lisadas por incubación con saponina 0,1 % (p/v) en agua destilada. Se realizaron diluciones seriadas del lisado y se cultivaron en placas ABG a 37°C durante 5 días para enumerar UFC. En el caso de la lisis de las células THP-1 con agua, los resultados se enumeraron como UFC/ml mientras que en la lisis con saponina y recuento de células viables se expresó como UFC/célula. La viabilidad de las células THP-1 infectadas se determinó en los diferentes tiempos post infección por tinción vital con azul de tripán. No se observó muerte celular significativa en ninguno de los diferentes ensayos de infección realizados en este estudio.

En determinados experimentos las células THP-1 fueron infectadas en condiciones proinflamatorias por estimulación con interferón gamma ($\text{IFN-}\gamma$). Brevemente, se sembraron en placas de 24 pocillos 4×10^5 células THP-1 por pocillo en RPMI-SFB suplementado con 100 nM de PMA y se incubó durante 24 h para la diferenciación a macrófagos. Posteriormente, el medio de cultivo fue reemplazado por RPMI-SFB (control) o RPMI-SFB suplementado con $\text{IFN-}\gamma$ humano recombinante

(Thermo Scientific, Waltham, EE.UU.) en una concentración final de 150 U/ml y las células fueron incubadas por 24 h. Luego, las células fueron infectadas con *B. pertussis* como se describió previamente. El IFN- γ se mantuvo durante todo el tiempo de infección.

En determinados experimentos, previo a la infección las células THP-1 fueron tratadas con bafilomicina A1 (BAF) (Sigma-Aldrich), un inhibidor de la v-ATPasa vacuolar [13], con el fin de neutralizar el pH vesicular. Para ello, 1 h antes de la infección las células THP-1 diferenciadas con PMA fueron incubadas con 50 nM de BAF en medio RPMI-SFB. La BAF se mantuvo durante todo el ensayo. En experimentos control se determinó el efecto de la BAF sobre la acidificación vesicular de células THP-1 tratadas y sin tratar con este inhibidor mediante la incubación con el marcador LysoTracker Red DND-99 (LysoTracker) (Molecular Probes, Invitrogen, California, EE. UU.). Luego del tratamiento con BAF no se encontraron vesículas marcadas con LysoTracker según se determinó por microscopía confocal, indicando que la incubación con BAF evita de manera eficiente la acidificación vesicular. La BAF no afectó la viabilidad celular ni tampoco la viabilidad de las bacterias según se determinó por tinción vital con azul de tripán y recuento de UFC, respectivamente.

La línea celular 16HBE14o- fue utilizada como modelo de infección de células del epitelio respiratorio humano. Cuando el cultivo alcanzó un 80% de confluencia, las células fueron removidas por tratamiento con tripsina 0,25% (p/v) y EDTA 0,1% (p/v) (Tripsina-EDTA) durante 5 min a 37 °C y cultivadas en placas de 24 pocillos previamente tratadas fibronectina, colágeno y seroalbúmina bovina (FN/C/BSA) en una concentración de 5×10^4 células por pocillo. Las células 16HBE14o- fueron incubadas por 48 h en las placas multipocillo y posteriormente infectadas con *B. pertussis* de manera similar a lo realizado con células THP-1, con modificaciones. Brevemente, las células 16HBE14o- fueron incubadas con *B. pertussis* en MEM suplementado con BSA al 0,2% (p/v) con una multiplicidad de infección (R_ib/c) de 30 bacterias por célula. Después de 3 h a 37 °C en 5% (v/v) de CO₂, las células infectadas se lavaron con PBS para eliminar las bacterias no adherentes y se agregó medio fresco MEM-SFB suplementado con 100 μ g/ml de sulfato de polimixina B (Sigma-Aldrich) para inactivar a las bacterias extracelulares restantes. Después de 1 h a 37 °C, las células fueron lavadas con PBS y tratadas para determinar las bacterias intracelulares viables (4 h después de la infección) o se incubaron con medio MEM-SFB suplementado con polimixina B 5 μ g/ml durante 20 h o 41 h (24 h y 48 h post infección, respectivamente). En los tiempos seleccionados después de la infección, las

células fueron separadas de la placa de cultivo por incubación con tripsina-EDTA durante 5 min a 37 °C y las células fueron lisadas por incubación con saponina 0,1 % (p/v) en agua destilada. Se realizaron diluciones seriadas del lisado y se cultivaron en placas ABG a 37 °C durante 5 días para enumerar UFC. La viabilidad de las células infectadas 16HBE14o- se determinó en los diferentes tiempos post infección por tinción vital con azul de tripán. No se observó muerte celular significativa en ninguno de los diferentes ensayos de infección realizados en este estudio.

2.5. Cuantificación de adhesión y fagocitosis o internalización

El número de bacterias extracelulares e intracelulares a las 2 h después de la infección, en el caso de células THP-1, o a las 3 h post infección, para la infección de células 16HBE14o-, se determinó mediante tinción de inmunofluorescencia como fue descrito por Rodríguez y col. [14]. Con este fin, muestras de células THP-1 ó 16HBE14o- infectadas fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% (p/v) y el número de bacterias adheridas e internalizadas fue estimado mediante microcopia de fluorescencia. Para ello, las células infectadas se incubaron con anticuerpos policlonales de conejo anti-*B. pertussis* durante 1 h a 4 °C, seguido de la incubación con fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG conejo conjugados con Cy3 (Jackson ImmunoResearch) durante 1 h a 4 °C. Para evitar el pegado inespecífico todas las incubaciones fueron realizadas en presencia de 10% (v/v) de suero normal humano inactivado por calor. Posteriormente, las células se permeabilizaron mediante incubación con PBS que contenía saponina al 0,1% (p/v) (Sigma-Aldrich) durante 30 min a temperatura ambiente, y las bacterias intracelulares y extracelulares fueron teñidas con anticuerpos policlonales de conejo anti-*B. pertussis* en presencia de saponina al 0,1% (p/v). Después de tres etapas de lavado las células se incubaron con fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC (Jackson ImmunoResearch) en presencia de 0,1% de saponina durante 1 h a temperatura ambiente. Los núcleos de las células eucariotas fueron teñidos por incubación con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 1 µg/ml durante 5 min a temperatura ambiente y posteriormente lavadas con PBS. Las muestras se analizaron mediante microscopía de fluorescencia con un microscopio de escaneo láser confocal (modelo TCS SP5; Leica, Alemania). El número de bacterias

extracelulares (rojas y verdes) e intracelulares (verdes solamente) se evaluaron mediante el examen de al menos 50 células eucariotas.

2.6. Análisis de colocalización por microscopía confocal

Los estudios de colocalización se realizaron como se describió anteriormente [15], con modificaciones menores. Brevemente, las células THP-1 diferenciadas a macrófagos con PMA se infectaron con *B. pertussis* (R_{ib/c} 100) como se describió anteriormente. Después de 2 h de incubación a 37 °C con 5% (v/v) de CO₂, las bacterias no adherentes se eliminaron mediante tres etapas de lavado con PBS. Las bacterias extracelulares se inactivaron con polimixina B (100 µg/ml) durante 1 h y las células infectadas se procesaron para la tinción de organelas ácidas con 75 nM LysoTracker o se incubaron con medio RPMI-SFB suplementado con 5 µg/ml de polimixina B durante 21 h o 45 h. Las células luego se incubaron con LysoTracker 75 nM en RPMI-SFB durante 15 min a 37 °C con 5% (v/v) de CO₂ antes de la fijación con PFA. Las muestras fijadas se lavaron dos veces con PBS y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente con NH₄Cl 50 mM en PBS. Después de tres etapas de lavado, las células THP-1 se incubaron durante 30 min con saponina al 0,1% (p/v) y BSA al 0,2% (p/v) en PBS. A continuación, las células se incubaron durante 1 h a 4 °C con suero de conejo anti-*B. pertussis* en presencia de saponina al 0,1% (p/v) y BSA al 0,2% (p/v). Después de tres etapas de lavado, las células se incubaron por 1 h con fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC (Jackson ImmunoResearch). Las muestras se analizaron utilizando un microscopio de escaneo láser confocal (Leica TCS SP5). El porcentaje de fagosomas que contenían bacterias que colocalizaban con LysoTracker se calculó mediante el análisis de al menos 50 fagosomas por muestra.

2.7. Determinación de bacterias intracelulares viables por hibridación fluorescente *in situ*

Se determinó la viabilidad de las bacterias intracelulares mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y microscopía. Esta técnica se basa en la detección de secuencias de ARN específicas que están presentes solamente en microorganismos viables [16-18]. Las bacterias contienen un gran número de copias de ARN 16S ribosomal 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 [19]. En

este estudio se utilizaron sondas de ADN complementarias al ARNr 16S para la determinación de bacterias intracelulares viables. Para ello, muestras de macrófagos infectados fueron fijadas con PFA al 4% (p/v) durante 10 minutos. La hibridación con sondas de oligonucleótidos fluorescentes se realizó según fue descrito por Neef y col. [20]. Se utilizaron las sondas de ADN BET42a (5'-GCCTTCCCACTTCGTTT-3') y EUB338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') conjugadas al fluoróforo Alexa 488 que reconocen el ARNr 16S de las bacterias pertenecientes a la subclase de β -proteobacterias y eubacterias, respectivamente [21], categorías que incluyen a *B. pertussis*. Como control negativo se utilizaron sondas complementarias a EUB338 y a BET42a conjugadas a Alexa 488 denominadas non-EUB338 y non-BET42a, respectivamente. Las sondas BET42a y EUB338 fueron utilizadas juntas para aumentar la sensibilidad de detección. Las sondas fueron preparadas en una concentración final de 10 nM en *buffer* de hibridación (NaCl 90 mM, Tris/HCl 20 mM pH 7,4, SDS 0,01% (p/v) y formamida 35% (v/v)). Luego de lavar con agua bidestilada y filtrada, las células fueron incubadas con las sondas durante 1,5 h a 46 °C en cámara húmeda saturada en *buffer* de hibridación. Posteriormente las células fueron incubadas con *buffer* de lavado (NaCl 80 mM, Tris/HCl 20 mM pH 7,4, SDS 0,01% (p/v) y EDTA 5 mM pH 8) durante 30 minutos a 48 °C. Luego de un lavado con PBS las células fueron lavadas con agua bidestilada filtrada y colocadas sobre un portaobjeto para la determinación del número de bacterias viables mediante microscopia confocal (Leica TCS SP5). En experimentos control con bacterias muertas por incubación con polimixina B se demostró que la marcación con estas sondas no genera señal detectable. Asimismo, no se detectó señal en bacterias viables utilizando las sondas non-EUB88 y non-BET42a.

2.8. Aislamiento de *B. pertussis* intracelular

El aislamiento de bacterias intracelulares se realizó siguiendo un protocolo previamente optimizado por nuestro grupo basado en la lisis de la célula infectada y posterior separación de las bacterias mediante centrifugación en un gradiente de sacarosa. Para ello, células THP-1 infectadas con *B. pertussis* fueron suspendidas en sacarosa 0,3 M / imidazol 3mM / HCl pH 7,4 suplementado con inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) en una concentración aproximada de 5×10^7 células/ml. Las células eucariotas fueron lisadas por sonicación en un Branson Sonifier 250 (cinco veces durante 3 seg a

baja potencia) para liberar las bacterias intracelulares. Los núcleos y las células intactas se eliminaron posteriormente mediante centrifugación a $505 \times g$ durante 5 minutos a 4°C sobre una solución de sacarosa 0,8 M. El sobrenadante se diluyó cinco veces en imidazol 3 mM / HCl pH 7,4 con inhibidor de proteasas, y se agregó en la parte superior de un gradiente de sacarosa discontinuo compuesto de tres capas: capa inferior (sacarosa 1M), compuesta de 1 ml de solución de sacarosa 1 M / imidazol 3 mM / HCl pH 7,4; capa intermedia (sacarosa 0,8 M) compuesta de 1 ml de solución de sacarosa 0,8 M / imidazol 3 mM / HCl pH 7,4 ; y capa superior (sacarosa 0,4 M) compuesta de 1 ml de solución de sacarosa 0,4 M / imidazol 3 mM / HCl pH 7,4. El gradiente, preparado en un tubo SW40Ti (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, EE. UU.), se centrifugó posteriormente a $3340 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . Las velocidades de aceleración y desaceleración se establecieron en ocho y uno, respectivamente. La banda resultante en la interfaz de las capas 0,8 M y 1 M, enriquecida en bacterias *B. pertussis*, fue aspirada y diluida 1:1 con *buffer* imidazol 3 mM / HCl pH 7,4. Posteriormente se centrifugaron a $15.000 \times g$ durante 10 min a 4°C . Las bacterias se recuperaron del precipitado y se almacenaron a -70°C . Luego, fueron liofilizadas y procesadas para su análisis proteómico. Un total de tres replicados biológicos independientes pertenecientes a bacterias recuperadas de células THP-1 a las 3 h post infección y 48 h post infección fueron obtenidos.

2.9. Análisis proteómico de bacterias aisladas de macrófagos humanos

Bacterias intracelulares recuperadas de células THP-1 a las 3 h y 48 h post infección, y bacterias incubadas durante 3 h en RPMI 1640-BSA al 0,2% (p/v) en ausencia de células THP-1 (bacterias extracelulares, control) fueron sometidas a análisis proteómico mediante nano-LC MS/MS. Para ello, se añadieron 30 μl de urea 8 M / tiourea 2 M (UT) en agua a cada muestra y las proteínas se solubilizaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a $20.000 \times g$ a 20°C durante 1 h y el sobrenadante se transfirió a un nuevo vial. La concentración de proteína total se midió usando un ensayo de Bradford (Bio-Rad, München, Alemania) con BSA como estándar. Cuatro μg de proteínas en *buffer* UT se diluyeron hasta una concentración final de urea 1 M / tiourea 0,25 M en bicarbonato de amonio (ABC) 20 mM. Posteriormente, las proteínas fueron reducidas con ditioneitol 25 mM (DTT), alquiladas con yodoacetamida 100 mM en ABC 20 mM y posteriormente digeridas proteolíticamente con 4 μl de tripsina

(0,25 µg/µl) (Promega, Madison, EE. UU.) durante 16 h en un baño de agua a 37 °C. La digestión se detuvo por adición de ácido trifluoroacético (TFA, Merck, Darmstadt, Alemania) en una concentración final del 0,1% (v/v). El material insoluble se eliminó por centrifugación a $16.000 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 1,5 ml y los péptidos se purificaron y desalaron usando columnas C18-ZipTip (Merck Millipore, Billerica, EE. UU.). El análisis por nano-LC MS/MS se realizó utilizando un sistema Proxeon Nano-LC (Proxeon, Odense, Dinamarca) conectado a un LTQ-Orbitrap-Velos MS (Thermo Electron, Bremen, Alemania) equipado con una fuente nano-ESI. Para la separación por LC se utilizó una columna Acclaim PepMap100 con un capilar de 15 cm de longitud de fase estacionaria (C18, 3 mm, 100 Å, Dionex, Sunnyvale, EE. UU.). Los solventes utilizados para la cromatografía fueron acetonitrilo 2% y ácido acético 0,1% (v/v) en agua de grado HPLC (Solvente A) y ácido acético 0,1% (v/v) en acetonitrilo (Solvente B). La tasa de flujo aplicada fue de 300 nl/min y el gradiente en el solvente varió de 100% de solvente A (15 min) a 60% de solvente B (290 min). El MS fue operado en modo dependiente de datos para poder cambiar automáticamente entre el modo Orbitrap-MS y el modo adquisición de MS/MS por disociación inducida por colisión (CID). La exploración completa por MS (de m/z 300 a 1.700) se adquirió en el Orbitrap con resolución $R = 30.000$ en m/z 400. Fueron aislados secuencialmente hasta 20 de los iones más intensos para CID en la trampa de iones lineal. Los iones seleccionados se excluyeron dinámicamente durante los siguientes 60 seg. Otras condiciones utilizadas de MS fueron: voltaje de electrospray de 1,5 kV, sin vaina ni flujo de gas auxiliar, umbral de selección de iones 500 para MS/MS, valor Q de activación de 0,25 y tiempo de activación de 30 ms.

2.10. Análisis de los datos de proteómica global por MS

Para la identificación de proteínas, los datos crudos se procesaron con el software Sorcerer™ v3.5 (Sage-N Research, Inc. Milpitas, EE. UU.). Después del procesamiento, se buscaron todos los espectros de MS en tándem utilizando la herramienta de búsqueda SEQUEST® v.27, rev.11 (ThermoFinnigan, San Jose, EE. UU.) utilizando una base de datos FASTA de *B. pertussis* Tohama digerida *in silico* con tripsina. La secuencia anotada del genoma de *B. pertussis* Tohama (número de acceso de GenBank: *B. pertussis* Tohama I, NC_002929) fue obtenida a través del sitio web del sistema Integrated Microbial

Genomes (IMG) (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi>) [22]. Las búsquedas se realizaron con una tolerancia de precursor iónico de 20 ppm, tolerancia de masa iónica del fragmento de 1 Da, y oxidación de metionina especificada como modificación variable. Se permitió que los péptidos identificados contengan hasta 2 sitios de corte con tripsina no realizados previendo que la efectividad de la enzima pudo no haber sido del 100%. Las identificaciones de péptidos se aceptaron si superaban el umbral específico de la herramienta de búsqueda de la base de datos. Las identificaciones por SEQUEST® requirieron al menos puntajes de ΔC_n mayor a 0,10 y puntuaciones de XCorr mayores a 2,2; 3,8 y 3,8 para péptidos con carga doble, triple y cuádruple, respectivamente. Las proteínas que contenían péptidos similares y no podían diferenciarse solamente por el análisis en tándem de MS se agruparon para satisfacer los principios de parsimonia. El software Scaffold 3.0 (Proteome Software, Portland, EE. UU.) fue utilizado para validar las identificaciones de proteínas derivadas a partir de resultados de identificación de MS en tándem. Las identificaciones peptídicas asignadas por SEQUEST® se verificaron con el programa de búsqueda de bases de datos X!Tandem [23]. Se aceptaron las identificaciones de péptidos y proteínas si se podía establecer un péptido con una probabilidad superior al 95%, tal como especifica el algoritmo Peptide Prophet [24]. Las probabilidades de identificación de proteínas fueron asignadas por el algoritmo Protein Prophet [24]. Las identificaciones de proteínas se aceptaron si alcanzaban una probabilidad superior al 99% y si se habían identificados al menos dos péptidos únicos correspondientes a la proteína analizada. Estos criterios establecen típicamente una tasa de descubrimiento falso menor al 0,01%. Todos los datos proteómicos fueron depositados en el Consorcio ProteomeXchange [25, 26] a través del repositorio PRIDE con el identificador del conjunto de datos PXD002997.

La abundancia relativa de las proteínas entre las diferentes muestras fue estimada sobre la base de recuentos espectrales. El conteo espectral es una medida de frecuencia que se correlaciona con la abundancia de proteínas [27]. Para reducir la tasa de falso descubrimiento, se utilizaron en los cálculos finales solamente las proteínas que estaban presentes en al menos dos o más replicados biológicos [28]. Para evaluar si existían diferencias significativas en la abundancia de proteínas, los recuentos espectrales totales de las diferentes muestras fueron previamente normalizados, permitiendo esta operación comparar las abundancias relativas de diferentes muestras aun cuando existan diferencias en la cantidad de proteínas totales presentes en cada muestra. Se utilizó una prueba *t* de

dos grupos para determinar diferencias estadísticamente significativas en la abundancia relativa de cada proteína entre los datos normalizados de cada condición (p -valor $< 0,01$). Los p -valores se ajustaron posteriormente para la corrección de pruebas múltiples con el fin de controlar la tasa de falso descubrimiento (TFD) utilizando un punto de corte de 0,05 siguiendo el procedimiento de Benjamini-Hochberg (BH) [29]. Las proteínas con un valor $p < 0,01$, un valor q (valor p corregido por BH) $< 0,05$ y un cambio absoluto mayor a 1,5 se consideraron significativamente reguladas. Las proteínas que mostraron un p -valor $< 0,01$ y un cambio absoluto mayor a 1,5 entre dos condiciones, pero un valor $q > 0,05$ se definieron como proteínas con una tendencia en la regulación. La prueba t para dos grupos y las correcciones para pruebas múltiples se realizaron utilizando el software Genedata Analyst v8.2 (Genedata AG, Basilea, Suiza). Las proteínas que carecían de datos de recuento espectral para una condición en una comparación de a pares se consideraron significativamente modificadas y se definieron como "ON-OFF". Proteínas de baja abundancia con menos de cuatro conteos espectrales totales en cualquier condición fueron excluidas del análisis cuantitativo.

La clasificación MultiFun, desarrollada para *Escherichia coli* [30], fue ligeramente modificada como se describe en Alvarez Hayes y col. [31] y utilizada para clasificar las proteínas de *B. pertussis*, basándose en la identificación de su correspondiente ortólogo en *E. coli*. Dado que *B. pertussis* tiene factores de virulencia que son controlados por el sistema de dos componentes BvgAS, ausentes en *E. coli*, se incluyó en el análisis la categoría "Factores de Virulencia" [31]. Las categorías restantes incluyeron "Metabolismo" (MultiFun categoría 1), "Transferencia de información" (Cat. 2), "Regulación" (Cat. 3), "Transporte" (Cat. 4), "Procesos celulares" (Cat. 5), "Estructura celular" (Cat. 6) e "Hipotéticas y conservadas hipotéticas" (sin homólogo en *E. coli* o función desconocida). Las proteínas con una función hipotética que sólo ha sido asignada por homología a otros genomas sin evidencia biológica se incluyeron en la clasificación MultiFun de acuerdo con su respectiva función predicha. Las proteínas que tienen múltiples funciones celulares fueron asignadas a la primera categoría relevante siguiendo el orden en que se encuentran las categorías funcionales enumeradas arriba (factores de virulencia, metabolismo, transferencia de información, etc.) y no fueron asignados a ninguna categoría posterior.

Los diagramas de análisis de componente principal (ACP) se crearon utilizando el software Genedata Analyst v8.2 (Genedata AG, Basilea, Suiza) que analiza la mediana

de los datos normalizados para cada punto de muestreo (control, 3 h y 48 h post infección) y tres réplicas biológicas teniendo en cuenta únicamente las proteínas que se detectaron en todas las réplicas. Los mapas tipo árbol de Voronoi se crearon con el software Paver (DECODON GmbH, Greifswald, Alemania) [32] sobre la base de datos de *B. pertussis* Tohama de la base de datos SEED versión 2.0 [33].

2.11. Adquisición de datos de monitoreo de reacción única (SRM)

Estudios de proteómica dirigida (SRM) fueron realizados para verificar la abundancia relativa de una serie de proteínas identificadas durante el análisis proteómico. Para el análisis por SRM se utilizaron las mismas muestras que fueron utilizadas para la proteómica global nano-LC MS/MS. Los péptidos fueron resuspendidos en un *buffer* con acetonitrilo 2% (v/v) (ACN) y ácido acético 0,1% (v/v) en agua grado HPLC. El análisis por SRM se realizó con dos replicados biológicos independientes de cada condición y con dos replicados técnicos de cada muestra. Al igual que en el análisis proteómico global, los péptidos se separaron en un sistema Proxeon nano-LC (Proxeon, Odense, Dinamarca) con una columna Acclaim PepMap100 con un capilar de 15 cm de longitud de fase estacionaria (Dionex, Sunnyvale, EE. UU.), utilizando una velocidad de flujo de 300 nl/min y empleando un gradiente no lineal desde 5% a 90% (v/v) en 33 min (0 min-5% ACN / 3-5 / 26-35 / 29-45 / 31-90 / 33-90 / 36-0). Los péptidos separados se ionizaron aplicando electrospray. La fragmentación de los precursores analizados en el primer cuadrupolo se realizó utilizando la disociación inducida por colisión mediante la aplicación de energías de colisión de acuerdo con los valores predeterminados por el equipo. Las transiciones se analizaron con un espectrómetro de masas triple cuadrupolo TSQ Vantage (Thermo Electron, Alemania) operado en modo SRM por el software Xcalibur 2.1 (ThermoScientific, Alemania). Fueron elegidas las transiciones disponibles de los espectros MS/MS del análisis global. Se incluyeron péptidos proteotípicos adicionales derivados de la digestión *in silico* con tripsina de las proteínas analizadas. Los análisis por SRM se ajustaron a una resolución de MS para MS1 de 0,7 en ancho completo a la mitad del máximo (FWHM), tiempo de ciclo de 2,5 seg y un voltaje de desconexión de 1 V. Al menos cuatro transiciones para cada péptido y al menos dos péptidos proteotípicos para cada proteína fueron registrados, a excepción de MgtC que se analizó un solo péptido. En la **Tabla 2.2** se indican la secuencia de los péptidos analizados para cada proteína.

Tabla 2.2. Péptidos seleccionados para el análisis por SRM

Gen	Locus	Péptido
<i>bfrD</i>	BP0856	GGAGGSINLVTK
<i>bfrD</i>	BP0856	GTIDGNWVLGENTALR
<i>bfrD</i>	BP0856	LIQDQGASDLEAVLR
<i>cyaA</i>	BP0760	ASALGVDYYDNVR
<i>cyaA</i>	BP0760	GEGYVFYENR
<i>cyaA</i>	BP0760	IGLGILADLGAGR
<i>cyaA</i>	BP0760	ITGDAQANVLR
<i>fhaB</i>	BP1879	GQVDLHDLAAR
<i>fhaB</i>	BP1879	LAGTLEVYGK
<i>gdhA</i>	BP1857	LDTYASQFGLR
<i>gdhA</i>	BP1857	LSNSAASVFTGK
<i>gdhA</i>	BP1857	VSVSGSGNVAQYAIEK
<i>groEL</i>	BP3495	GVNVLANAVK
<i>groEL</i>	BP3495	GYLSPYFINSPEK
<i>maeB</i>	BP1120	AIAELAQAQNDVAR
<i>maeB</i>	BP1120	FNDTWNGYYQLR
<i>maeB</i>	BP1120	LQAYPDSTLK
<i>maeB</i>	BP1120	YVEEVIGR
<i>mgtC</i>	BP0414	LGNEGEIR
<i>ppsA</i>	BP1436	ATGQVLVTGR
<i>ppsA</i>	BP1436	VPGGFATTAQAFR
<i>ptxA</i>	BP3783	SVASIVGTLVR
<i>ptxA</i>	BP3783	YTEVYLEHR

2.12. Análisis de datos de SRM

La configuración y validación de transiciones y energía de colisión, así como el cálculo del área de pico se realizó con el programa Skyline v3.5 [34]. La identificación de péptidos en las diferentes muestras se validó por el tiempo de retención y el patrón de transición del pico. Además, se creó una biblioteca espectral de las medidas de proteómica global dependientes de datos de *B. pertussis* en el programa Skyline para verificar los espectros SRM. Para ello, se adquirieron todos los péptidos posibles para cada una de las proteínas, pero solo se usaron aquellos que dieron patrones de pico distintos en todas las

réplicas para la cuantificación relativa. La cuantificación final entre el control (bacterias extracelulares) y las muestras de bacterias intracelulares aisladas a las 3 h y 48 h post infección se llevó a cabo a nivel de proteína promediando las relaciones de área de los péptidos pertenecientes a cada proteína. Para normalizar los datos se utilizaron las áreas promedio de las proteínas *housekeeping* MaeB (BP1120) y GdhA (BP1857) y los resultados finales se presentaron como proporciones relacionadas con el control (bacterias extracelulares).

2.13. Construcción de cepas mutantes

Para generar cepas mutantes de *B. pertussis* por eliminación de genes se utilizó una estrategia de mutagénesis por intercambio alélico descrita por Inatsuka y col. [3]. Esta estrategia involucra dos recombinaciones homólogas entre un vector y el genoma de *B. pertussis* que finaliza con la eliminación del gen de interés. Para ello, en primer lugar, se realiza una construcción de ADN que contiene un alelo truncado del gen de interés, generado en un único marco de lectura, junto a regiones adyacentes homólogas al genoma de *B. pertussis* a ambos extremos del mismo (**Figura 2.1**). Las regiones homólogas adyacentes se incluyen para proveer una secuencia de nucleótidos que permite realizar la primera recombinación homóloga entre el plásmido y el genoma de *B. pertussis*. Esta construcción es ligada al plásmido suicida pSS4245, que no puede duplicar en *Bordetella*. El plásmido pSS4245 contiene genes de resistencia para los antibióticos ampicilina, kanamicina y estreptomycin permitiendo la selección de bacterias que hayan integrado el plásmido en la primera recombinación homóloga. Además, contiene un gen que codifica para la enzima de restricción I-SceI bajo el control del promotor de la toxina pertussis, que asegura la expresión de esta nucleasa únicamente en bacterias en fase virulenta, es decir, cultivadas en ausencia de moduladores como MgSO₄. Asimismo, el plásmido contiene un sitio de corte para la enzima I-SceI que está ausente en el genoma de *B. pertussis* (**Figura 2.1**). La expresión de la nucleasa I-SceI y el corte del genoma en el sitio presente en el plásmido integrado es utilizado para inducir una segunda recombinación homóloga.

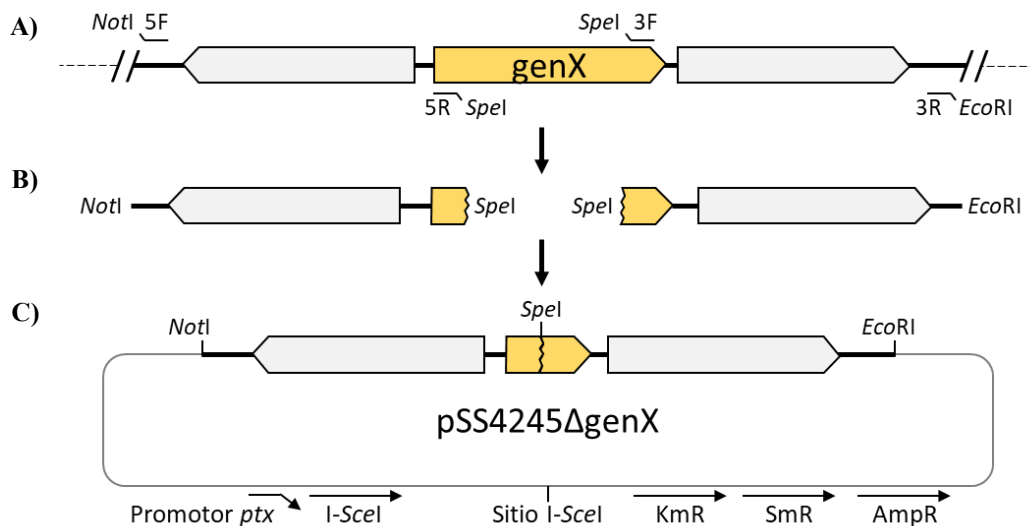


Figura 2.1: Estrategia de construcción de un vector de intercambio alélico para realizar mutagénesis en *B. pertussis* **A)** Región genómica que contiene el gen a eliminar en la cepa salvaje. Se muestran los cebadores utilizados para amplificar por PCR las regiones homólogas adyacentes al gen de interés y generar la construcción para la eliminación (5F y 5R, región corriente arriba; 3F y 3R, región corriente abajo). Se indican los sitios de enzimas de restricción presentes en los cebadores. **B)** Amplificaciones por PCR de las regiones homólogas adyacentes al gen de interés. **C)** Plásmido de intercambio alélico pSS4245. Este plásmido contiene la construcción para realizar la mutagénesis, un sitio de restricción de la endonucleasa *I-SceI*, el gen que codifica para la endonucleasa *I-SceI* bajo el promotor de la toxina pertussis (*ptx*) y los genes de resistencia a los antibióticos kanamicina (Km^R), estreptomicina (Sm^R) y ampicilina (Amp^R). El gen Sm^R es expresado por *B. pertussis* y no por *E. coli*.

El plásmido pSS4245 con la construcción para realizar la mutagénesis es introducido en *E. coli* SM10(λ pir) (cepa donante) y transferido a *B. pertussis* (cepa receptora) mediante conjugación bajo condiciones de cultivo moduladoras (en presencia de $MgSO_4$ 50 mM), para mantener la fase avirulenta y así evitar la producción de la endonucleasa *I-SceI*. Las bacterias que integran el plásmido por recombinación entre las regiones homólogas del mismo y el genoma son seleccionadas en un medio de cultivo con ampicilina 30 μ g/ml, estreptomicina 100 μ g/ml y kanamicina 40 μ g/ml (**Figura 2.2-I**). El gen que codifica la resistencia a estreptomicina solamente es expresado por *B. pertussis*, permitiendo eliminar las bacterias *E. coli* usadas como cepa parental en la conjugación. Los clones transconjugantes de *B. pertussis* obtenidos luego de esta primera recombinación son merodiploides: contienen una copia salvaje y una copia mutante del gen a eliminar en su genoma (**Figura 2.2-II**). La segunda recombinación homóloga, que involucra la eliminación del plásmido integrado en el genoma junto con una copia del gen, ya sea el salvaje o mutante, se induce al cultivar los clones transconjugantes en ABG sin $MgSO_4$ (condiciones no moduladoras) que inducen la fase virulenta. Este pasaje a fase

virulenta activa la expresión de la endonucleasa *I-SceI*, que corta al genoma en un sitio de restricción presente únicamente en la secuencia del plásmido integrado (**Figura 2.2-III**). Esta rotura de doble hebra del ADN genómico activa mecanismos de reparación que inducen una segunda recombinación homóloga, generando clones con la copia del alelo salvaje o la copia mutante por eliminación, con la consiguiente pérdida del plásmido junto con la otra copia del alelo (**Figura 2.2-IV**). Mediante PCR se analizan los clones obtenidos para identificar aquellos que den amplificaciones correspondientes a una cepa mutante por eliminación.

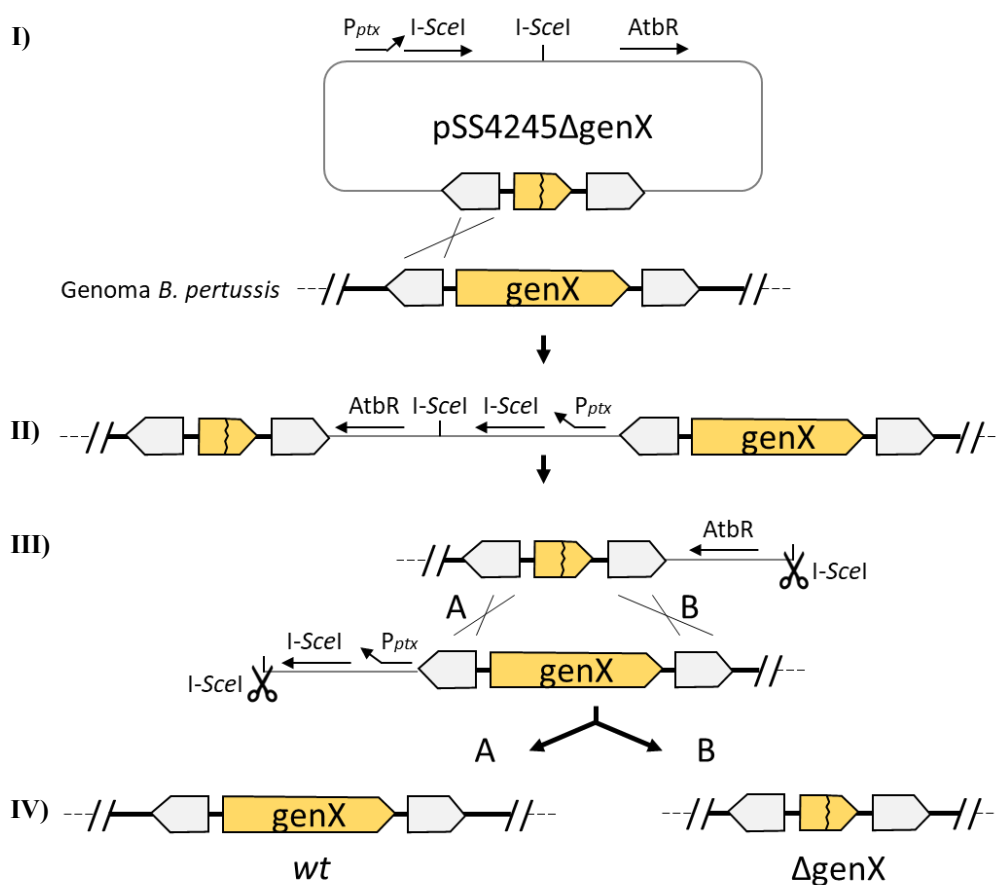


Figura 2.2: Esquema de las recombinaciones homólogas realizadas para obtener una cepa mutante. I) Primera recombinación entre las regiones homólogas del plásmido pSS4245 y el genoma de *B. pertussis*. **II)** La integración del plásmido en el genoma de *B. pertussis* genera una cepa merodiploide que contiene una copia del gen salvaje y una copia mutante. **III)** Al subcultivar los clones merodiploides en medio sin modulador de fase se induce la expresión de la nucleasa *I-SceI*, que corta el genoma de *B. pertussis* en el sitio *I-SceI* codificado en el plásmido pSS4245 integrado. Se produce entonces la segunda recombinación homóloga, existiendo dos posibilidades, A y B. **IV)** Esquema del genoma después de la segunda recombinación homóloga. La recombinación A da una cepa tipo salvaje (*wt*) mientras que la recombinación B da una cepa tipo mutante (Δ genX). Atb^R: genes de resistencia a los antibióticos kanamicina, ampicilina y estreptomicina. P_{ptx}: promotor de la toxina pertussis.

Las amplificaciones mediante PCR de los fragmentos de ADN correspondientes a las regiones adyacentes al gen a eliminar se realizaron utilizando ADN polimerasa de alta fidelidad Q5 (New England Biolabs, Massachusetts, EE. UU.) y ADN genómico de *B. pertussis* Tohama como molde. La región corriente arriba adyacente del gen a eliminar fue amplificada usando los cebadores 5F y 5R correspondientes y la región corriente abajo utilizando los cebadores 3F y 3R (**Tabla 2.3**). Los cebadores utilizados contienen en su secuencia un sitio de reconocimiento de una enzima de restricción para facilitar los pasos posteriores (**Tabla 2.3**). Los productos de PCR de aproximadamente 750 pb fueron escindidos por las respectivas enzimas de restricción (New England Biolabs) y ligados utilizando la enzima ADN ligasa T4 (New England Biolabs). Este producto fue posteriormente utilizado en una ligación con el plásmido de intercambio alélico pSS4245. El plásmido resultante posee un inserto que contiene una versión truncada del gen a eliminar generada en un único marco de lectura y sin marcadores de selección junto con las regiones circundantes corriente arriba y corriente abajo del gen (**Figura 2.1C**). El plásmido pSS4245 resultante fue introducido en la cepa *E. coli* SM10(λ pir) (cepa donante) y transferido a *B. pertussis* Tohama (cepa receptora) mediante conjugación, como se describe en Inatsuka y col. [3]. Como resultado de dos eventos de recombinación posteriores, se obtuvo una cepa que contiene una eliminación cromosómica del gen de interés. Los clones mutantes son seleccionados mediante PCR con los cebadores 5F y 3R correspondientes, que permiten distinguir según el tamaño de la amplificación obtenida entre clones salvajes o mutantes por eliminación del gen de interés. La eliminación del gen y las secuencias de sus regiones adyacentes en la cepa mutante se confirmaron mediante secuenciación de ADN.

Tabla 2.3: Cebadores utilizados para construir cepas mutantes. Los sitios de enzimas restricción agregados se encuentran subrayados.

Cebador	Secuencia	Sitio de restricción
<i>bfrDE-5F</i>	CT <u>GCGGCCG</u> CCGTGTACTTCGACGATCCGG	<i>NotI</i>
<i>bfrDE-5R</i>	GAACTAGTCATGGGAATCCGCTATCGTC	<i>SpeI</i>
<i>bfrDE-3F</i>	CTACTAGT <u>TATTGAGCGCAGCCGCGC</u>	<i>SpeI</i>
<i>bfrDE-3R</i>	GAGAATTCGTTCAACGAGACGATCCGCG	<i>EcoRI</i>
<i>irp1-3-5F</i>	AAACAATTGGGAAATCCAGCAGCGC	<i>MfeI</i>
<i>irp1-3-5R</i>	AAAGGATCCCATCATGTACGAGTCC	<i>BamHI</i>
<i>irp1-3-3F</i>	AAAGGATCCGTA <u>CTGATCGTGCGTG</u>	<i>BamHI</i>
<i>irp1-3-3R</i>	AAACAATTGGCCACCACCAGCAGG	<i>MfeI</i>
<i>mgtC-5F</i>	CT <u>GCGGCCG</u> CCCTTCGGCAATCAGCGTCATG	<i>NotI</i>
<i>mgtC-5R</i>	GAACTAGTCATGGCTGCGTGCTCCCGG	<i>SpeI</i>
<i>mgtC-3F</i>	CTACTAGTAAGCGGGTCGTCGCGCAGC	<i>SpeI</i>
<i>mgtC-3R</i>	GAGGATCC <u>CCTGGAAATCCTGGTCGATC</u>	<i>BamHI</i>

2.14. Construcción de cepas complementadas

Para la complementación de las mutaciones realizadas se introdujo un plásmido con una copia salvaje del gen de interés en las cepas mutantes por eliminación. Para ello, se amplificó por PCR el gen correspondiente junto con sus propias secuencias promotoras y terminadoras de la transcripción utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad Q5 (New England Biolabs) y ADN genómico de *B. pertussis* Tohama como molde. Para la amplificación por PCR se utilizaron los cebadores CF y CR que contienen en su secuencia un sitio de reconocimiento de una enzima de restricción para facilitar los pasos posteriores (Tabla 2.4). El producto de PCR se escindió con las enzimas de restricción correspondientes (New England Biolabs) y fue ligado con el vector pBBR1MCS (Cm^R) [4] utilizando la ADN ligasa T4 (New England Biolabs). El plásmido resultante fue introducido en *E. coli* SM10(λpir) (cepa donante) y posteriormente transferido a la cepa *B. pertussis* mutante en el gen de interés (cepa receptora) mediante conjugación, como fue descrito previamente. Se seleccionaron transconjugantes de *B. pertussis* en placas ABG suplementadas con cloranfenicol 20 µg/ml y cefalexina 100 µg/ml. La identidad del inserto presente en los plásmidos construidos fue confirmada mediante secuenciación de ADN. Las cepas mutantes de *B. pertussis* también fueron transformadas con el vector pBBR1MCS como control.

Tabla 2.4: Cebadores utilizados para construir plásmidos de complementación. Los sitios de enzimas restricción agregados se encuentran subrayados.

Cebador	Secuencia	Sitio de restricción
<i>bfrDE</i> -CF	CT <u>ACTAGT</u> GCGCCGCTTCAGCGATACC	<i>SpeI</i>
<i>bfrDE</i> -CR	GAAAGCTTGTCTTCCGCCCGGGTGGC	<i>HindIII</i>
<i>irp1-3</i> -CF	CT <u>ACTAGT</u> CCAGCGAAGCTGGCTGAAGG	<i>SpeI</i>
<i>irp1-3</i> -CR	GAAAGCTT <u>CAGGGT</u> GAAACGTAGGCAGG	<i>HindIII</i>
<i>mgtC</i> -CF	CT <u>ACTAGT</u> CGGCGTCTCCAACGCAGGC	<i>SpeI</i>
<i>mgtC</i> -CR	GAAAGCTTCCGAGCAGATCATCGCTGCC	<i>HindIII</i>

2.15. Extracción de ARN y RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)

Se extrajo ARN total a partir de muestras de *B. pertussis* obtenidas en la fase de crecimiento exponencial utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen, Valencia, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, incluido un tratamiento con ADNasa I (Promega, Madison, EE. UU.). La calidad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa y fotométricamente mediante NanoDrop2000 (Thermo Scientific). La síntesis de ADNc se realizó con la transcriptasa inversa M-MLV (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada síntesis de ADNc, se utilizó 1 µg de ARN total y 10 µM de hexámeros aleatorios (Qiagen). Se incluyó una reacción control sin la transcriptasa inversa M-MLV para confirmar la ausencia de ADN genómico en las muestras de ARN utilizadas para la síntesis de ADNc. Se realizaron análisis cuantitativos de PCR en tiempo real (RT-qPCR) en un sistema qPCR Mx3000P (Stratagene, San Diego, EE. UU.) con SYBR GreenPCR Master Mix (Roche, Mannheim, Alemania) y 0,5 µM de cada cebador directo e inverso. Las secuencias de los cebadores usados se especifican en la **Tabla 2.5**. El ciclo de PCR comprendió una preincubación de 10 minutos a 95 °C, seguida de 40 ciclos de una PCR de dos pasos que consiste en una etapa de desnaturalización a 94 °C durante 15 seg y una fase combinada de hibridación y extensión a 60 °C durante 60 seg. Los amplicones resultantes se examinaron mediante curvas de fusión y electroforesis en gel de agarosa. El nivel de expresión relativa de cada gen se calculó mediante el método del ciclo límite ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) según fue descrito por Livak y Schmittgen [35]. El gen *recA* o el gen *rpoD* fueron usados como genes de referencia para la normalización de los niveles de expresión.

Tabla 2.5: Cebadores utilizados para RT-qPCR

Gen	ORF	Cebador directo (RTF)	Cebador inverso (RTR)
<i>afuA</i>	BP1605	CCGTCAAGCTGCTGGAGTA	CACCGGGTACTCGTAGTTGG
<i>bfrD</i>	BP0856	AGGAACCAGGATTTACCG	CACCCAGTTGCCGTCTATG
<i>bfrE</i>	BP0857	CAGGTAGAGGGCGAAGCG	GGGCGTATCCAGCAAGGG
<i>irp1-3</i>	BP1152	GCACTATGGCGACAACGTC	GCCGAAGTGGTTCATCTTGT
<i>mgtC</i>	BP0414	ATCAAGCTGGGCAACGAG	GCGATGCGCTTTTCCAG
<i>mgtE</i>	BP2806	TCGCTGGAGGTGGTGTG	GCACTTCGGTATCGGGCT
<i>recA</i>	BP2546	GACGACAAAACCAGCAAGG	CGTAGACCTCGATCACGC
<i>rpoD</i>	BP2184	ATGGGCATCCGCTTACG	CTTCGTCCAACACCCAC

2.16. Inmunoblot

Para los ensayos de inmunoblot se obtuvieron muestras proteicas a partir de suspensiones bacterianas de *B. pertussis* cultivadas en medio SS. Cantidades equivalentes de bacterias fueron incubadas en *buffer* Laemmli (Tris 60 mM / HCl pH 6,8, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v), azul de bromofenol 0,01% (p/v)) por 5 min a 100 °C, centrifugadas $15.000 \times g$ por 10 min y posteriormente separadas mediante SDS-PAGE. Las proteínas fueron transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Immobilon PVDF Millipore, Bedford, MA, EE. UU.) o teñidas con Coomassie Blue R-250 como fue descrito por Brunelle y Green [36] para utilizar como control de carga del inmunoblot. Las membranas fueron incubadas con antisueros de ratón anti-rAfuA, anti-rIRP1-3 o anti-rPrn1. La detección inmunoquímica se realizó empleando anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research) y NBT/BCIP (Bio-Rad, Hercules, EE. UU.) como sustrato de reacción.

2.17. Citometría de flujo

El nivel de expresión de receptores en la superficie de las células THP-1 fue determinado mediante citometría de flujo utilizando el equipo FACScalibur (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, EE. UU.). Las células THP-1 fueron separadas de la placa de cultivo por incubación con EDTA 5 mM en PBS, fijadas por tratamiento con paraformaldehído (PFA) al 4% (p/v) y teñidas con mAc. Para evitar la unión inespecífica

de los mAc todas las incubaciones fueron realizadas en presencia de suero humano inactivado por calor al 25% (v/v). Los datos fueron procesados utilizando el software FlowJo (LLC, Oregon, EE. UU.).

2.18. Análisis estadístico

La comparación de medias para dos grupos independientes fue realizada con la prueba *t* de Student con un grado de significación (p) de 0,05. La comparación estadística para más de dos grupos fue realizada con 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 (p) de 0,05.

2.19. Referencias

1. Stainer DW, Scholte MJ. A Simple Chemically Defined Medium for the Production of Phase I *Bordetella pertussis*. *Microbiology*. 1970,63(2):211-220.
2. Simon R, Priefer U, Puhler A. A Broad Host Range Mobilization System for *In Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat Biotech*. 1983,1(9):784-791.
3. Inatsuka CS, Xu Q, Vujkovic-Cvijin I, Wong S, Stibitz S, Miller JF, Cotter PA. Pertactin is required for *Bordetella* species to resist neutrophil-mediated clearance. *Infect Immun*. 2010,78(7):2901-2909.
4. Kovach ME, Phillips RW, Elzer PH, Roop RM, 2nd, Peterson KM. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *BioTechniques*. 1994,16(5):800-802.
5. Vidakovics ML, Paba J, Lamberti Y, Ricart CA, de Sousa MV, Rodriguez ME. Profiling the *Bordetella pertussis* proteome during iron starvation. *J Proteome Res*. 2007,6(7):2518-2528.
6. Schwyn B, Neilands J. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem*. 1987,160(1):47-56.
7. Cozens AL, Yezzi MJ, Kunzelmann K, Ohrui T, Chin L, Eng K, Finkbeiner WE, Widdicombe JH, Gruenert DC. CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994,10(1):38-47.
8. Hellwig SM, van Oirschot HF, Hazenbos WL, van Spriel AB, Mooi FR, van De Winkel JG. Targeting to Fcγ receptors, but not CR3 (CD11b/CD18), increases clearance of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis*. 2001,183(6):871-879.
9. Alvarez Hayes J, Erben E, Lamberti Y, Principi G, Maschi F, Ayala M, Rodriguez ME. *Bordetella pertussis* iron regulated proteins as potential vaccine components. *Vaccine*. 2013,31(35):3543-3548.
10. Alvarez Hayes J, Erben E, Lamberti Y, Ayala M, Maschi F, Carbone C, Gatti B, Parisi G, Rodriguez ME. Identification of a new protective antigen of *Bordetella pertussis*. *Vaccine*. 2011,29(47):8731-8739.
11. Lamberti Y, Estudio de la interacción de *Bordetella pertussis* con células del hospedador. 2010, Facultad de Ciencias Exactas.
12. Lee CK, Roberts AL, Finn TM, Knapp S, Mekalanos JJ. A new assay for invasion of HeLa 229 cells by *Bordetella pertussis*: effects of inhibitors, phenotypic modulation, and genetic alterations. *Infect Immun*. 1990,58(8):2516-2522.
13. Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H (+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem*. 1991,266(26):17707-17712.
14. Rodriguez ME, Hellwig SM, Hozbor DF, Leusen J, van der Pol WL, van de Winkel JG. Fc receptor-mediated immunity against *Bordetella pertussis*. *J Immunol*. 2001,167(11):6545-6551.
15. Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovics ML, Harvill ET, Rodriguez ME. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun*. 2010,78(3):907-913.
16. Forsgren J, Samuelson A, Ahlin A, Jonasson J, Rynnel-Dagöö B, Lindberg A. *Haemophilus influenzae* resides and multiplies intracellularly in human adenoid tissue as demonstrated by in situ hybridization and bacterial viability assay. *Infect Immun*. 1994,62(2):673-679.
17. Harmsen HJM, Gibson GR, Elfferich P, Raangs GC, Wildeboer-Veloo ACM, Argaiz A, Roberfroid MB, Welling GW. Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 2000,183(1):125-129.

18. Garcia-Armisen T, Servais P. Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization. *J Microbiol Methods*. 2004,58(2):269-279.
19. Keer JT, Birch L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J Microbiol Methods*. 2003,53(2):175-183.
20. Neef A, Zaglauer A, Meier H, Amann R, Lemmer H, Schleifer K-H. Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of *Paracoccus spp.* in methanol-fed biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 1996,62(12):4329-4339.
21. Manz W, Szewzyk U, Ericsson P, Amann R, Schleifer K, Stenström T. *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*. 1993,59(7):2293-2298.
22. Markowitz VM, Szeto E, Palaniappan K, Grechkin Y, Chu K, Chen I-MA, Dubchak I, Anderson I, Lykidis A, Mavromatis K. The integrated microbial genomes (IMG) system in 2007: data content and analysis tool extensions. *Nucleic Acids Res*. 2007,36(suppl_1):D528-D533.
23. Craig R, Beavis RC. A method for reducing the time required to match protein sequences with tandem mass spectra. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2003,17(20):2310-2316.
24. Shteynberg D, Deutsch EW, Lam H, Eng JK, Sun Z, Tasman N, Mendoza L, Moritz RL, Aebersold R, Nesvizhskii AI. iProphet: multi-level integrative analysis of shotgun proteomic data improves peptide and protein identification rates and error estimates. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2011,10(12):M111. 007690.
25. Vizcaino JA, Côté RG, Csordas A, Dianas JA, Fabregat A, Foster JM, Griss J, Alpi E, Birim M, Contell J. The PRoteomics IDentifications (PRIDE) database and associated tools: status in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2012,41(D1):D1063-D1069.
26. Vizcaino JA, Deutsch EW, Wang R, Csordas A, Reisinger F, Rios D, Dianas JA, Sun Z, Farrah T, Bandeira N. ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nat Biotechnol*. 2014,32(3):223-226.
27. Liu H, Sadygov RG, Yates JR. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem*. 2004,76(14):4193-4201.
28. Kruh NA, Troudt J, Izzo A, Prenni J, Dobos KM. Portrait of a pathogen: the *Mycobacterium tuberculosis* proteome in vivo. *PLoS ONE*. 2010,5(11):e13938.
29. Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res*. 2001,125(1):279-284.
30. Serres MH, Riley M. MultiFun, a multifunctional classification scheme for *Escherichia coli* K-12 gene products. *Microb Comp Genomics*. 2000,5(4):205-222.
31. Alvarez Hayes J, Lamberti Y, Surmann K, Schmidt F, Volker U, Rodriguez ME. Shotgun proteome analysis of *Bordetella pertussis* reveals a distinct influence of iron availability on the bacterial metabolism, virulence, and defense response. *Proteomics*. 2015,15(13):2258-2266.
32. Bernhardt J, Michalik S, Wollscheid B, Völker U, Schmidt F. Proteomics approaches for the analysis of enriched microbial subpopulations and visualization of complex functional information. *Curr Opin Biotechnol*. 2013,24(1):112-119.
33. Overbeek R, Begley T, Butler RM, Choudhuri JV, Chuang H-Y, Cohoon M, de Crécy-Lagard V, Diaz N, Disz T, Edwards R. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res*. 2005,33(17):5691-5702.
34. MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, Kern R, Tabb DL, Liebler DC, MacCoss MJ. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics*. 2010,26(7):966-968.
35. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001,25(4):402-408.

36. Brunelle JL, Green R, Coomassie blue staining, in *Methods Enzymol.* 2014, Elsevier. p. 161-167.

Capítulo 3

Estudio del proteoma de *Bordetella pertussis* durante su adaptación al entorno intracelular en macrófagos humanos

3. Estudio del proteoma de *Bordetella pertussis* durante su adaptación al entorno intracelular en macrófagos humanos

3.1 Introducción

Las interacciones huésped-patógeno reflejan el complejo equilibrio que ocurre entre las defensas del huésped y los mecanismos de virulencia del patógeno [1]. La comprensión de estas interacciones proporciona información sobre los procesos metabólicos y los eventos reguladores críticos de la célula huésped, así como también acerca de los mecanismos de patogénesis empleados por los microorganismos infecciosos para subvertir la respuesta de la célula huésped [2]. Una mejor comprensión de esta intrincada interacción es necesaria para definir nuevos blancos terapéuticos y optimizar el desarrollo de vacunas contra enfermedades infecciosas [1, 3]. Dado que las proteínas son las principales responsables de las funciones biológicas de las células, una forma de evaluar las interacciones huésped-patógeno es a través del estudio de los cambios en la expresión de proteínas tanto en el huésped como en el patógeno mediante técnicas de proteómica [2]. La proteómica es el análisis sistemático de proteínas, particularmente sus interacciones, modificaciones, localización y funciones [2], y representa una herramienta poderosa para investigar las bases moleculares de la virulencia y la patogénesis [1].

Tradicionalmente, se ha estudiado el papel de las proteínas del hospedador y los factores bacterianos en esta interacción de manera individual [3]. Sin embargo, a pesar que estos estudios proporcionan elementos importantes en relación al papel de componentes particulares, esta visión reduccionista tiene claras limitaciones debido tanto a redundancias funcionales como a la posible participación de cientos o miles de genes en diferentes etapas de la interacción huésped-patógeno [4]. Debido a los avances significativos en el desarrollo de técnicas ómicas estos estudios ahora pueden realizarse a escala de genoma completo. En este sentido, el análisis transcriptómico y proteómico de la respuesta del huésped a las infecciones se pueden realizar de manera rutinaria utilizando tanto modelos animales como muestras de origen humano [3]. Por otro lado, el análisis de la respuesta de los patógeno es mucho más desafiante debido a la disponibilidad limitada de material del microorganismo en los entornos de infección y a la cantidad abrumadora de ARN y proteínas provenientes del huésped [4, 5]. Por lo tanto,

muchos estudios ómicos de respuestas de adaptación de patógenos han sido realizados mediante el uso de sistemas *in vitro* en los que estos patógenos están expuestos, en ausencia de células del huésped, a desafíos ambientales, como variaciones de temperatura, estrés oxidativo o limitación de nutrientes, que se especula imitan las condiciones desfavorables que los patógenos encuentran *in vivo* [3, 6]. Sin embargo, incluso si estos estudios *in vitro* proporcionan una comprensión exhaustiva de la fisiología de los patógenos y sus respuestas de adaptación, en el mejor de los casos sólo reflejan parcialmente la situación que éstos experimentan durante su encuentro con células huésped [4]. Una conclusión emergente de estos estudios realizados con diversos patógenos, ya sean bacterias, levaduras o parásitos protozoarios, es que las condiciones de laboratorio que imitan el encuentro con células hospedadoras humanas o animales sólo lo hacen de una manera limitada [3]. Los resultados obtenidos demuestran claramente la complejidad de la respuesta adaptativa de los patógenos al entorno del huésped y la dificultad de imitar dicho comportamiento *in vitro* [7]. Esta observación no es sorprendente dado que existe una diversidad de factores que contribuyen a la interacción entre el huésped y el patógeno, y este conjunto de factores no puede capturarse completamente *in vitro*. Por lo tanto, actualmente hay cada vez más esfuerzos para enfrentar los desafíos asociados con el análisis de muestras de patógenos aislados de entornos de infección.

Con respecto a *B. pertussis*, recientemente nuestro grupo ha realizado estudios que indican que esta bacteria, históricamente considerada un patógeno extracelular, es capaz de invadir y persistir dentro de las células del huésped [8-10]. Se encontró que los macrófagos podrían ser el principal nicho de persistencia intracelular de *B. pertussis* y, dado que este tipo celular presenta la mayor vida media entre los tipos celulares analizados [11], podría constituir un reservorio que permitiría el establecimiento de infecciones crónicas o persistentes [12]. Asimismo, la persistencia intracelular de *B. pertussis* aumentaría las posibilidades de diseminación de este patógeno a nuevos sitios de infección en el huésped. En este sentido, se ha encontrado que numerosos patógenos de difícil erradicación son capaces de sobrevivir dentro de células del hospedador, constituyendo éste uno de los principales mecanismos de persistencia [13]. La existencia de estadios intracelulares tiene consecuencias directas en el tipo de inmunidad que las vacunas deben inducir para ser protectoras. Por ejemplo, la incorporación de inmunógenos y/o adyuvantes capaces de establecer una respuesta inmune celular,

necesaria para eliminar infecciones intracelulares, deben considerarse para el diseño de mejores formulaciones vacunales. Para que un patógeno pueda establecer una infección intracelular exitosa debe ser capaz de evadir los mecanismos de defensa ejercidos por las células del hospedador [14]. En particular, las células inmunes son células especializadas en la eliminación de microorganismos patógenos, a través de la activación de una serie de mecanismos de defensa que incluyen: la generación de intermediarios reactivos de oxígeno y/o nitrógeno, la fusión fagolisosomal, la producción de péptidos antimicrobianos, el secuestro de nutrientes e incluso la muerte celular programada [14]. Los patógenos intracelulares cuentan con una serie de mecanismos de evasión que les permite sobrevivir en este ambiente. Estos mecanismos están mediados por cambios tanto en la abundancia como en la actividad de proteínas clave. Los enfoques ómicos aplicados al estudio de la interacción huésped-patógeno indican que una característica común de la adaptación de los patógenos bacterianos a la vida intracelular es la respuesta a factores de estrés, como el estrés oxidativo y la baja disponibilidad de oxígeno, el aumento de sistemas de adquisición de nutrientes específicos, cambios en la utilización de rutas metabólicas y la expresión diferencial de factores de virulencia [15-20]. Asimismo, se ha encontrado que los patógenos intracelulares son capaces de modular la respuesta de la célula infectada favoreciendo su persistencia. En este sentido, la existencia de una fase intracelular de *B. pertussis* depende en parte de la capacidad de este patógeno de realizar ajustes fenotípicos que le permitan sobrevivir a las condiciones encontradas en la célula hospedadora y/o modular la respuesta de ésta a través de, por ejemplo, la expresión de proteínas inmunomodulatorias. Por este motivo, se decidió estudiar los cambios producidos en el proteoma de esta bacteria durante la transición del medio extracelular al intracelular en macrófagos humanos en la convicción de que el estudio del proteoma de *B. pertussis* intracelular podría proporcionar información relevante acerca de la patogénesis de esta bacteria y eventuales blancos terapéuticos.

El principal desafío en el análisis del proteoma de patógenos bacterianos en estadio intracelular es la detección de las proteínas bacterianas en relación al abrumador fondo de proteínas del huésped, debido al menor tamaño de las bacterias [3]. Por este motivo, es necesario separar los patógenos bacterianos de las células huésped para facilitar el posterior procesamiento y análisis de las muestras bacterianas purificadas [3]. En primer lugar, se debe realizar una lisis de la célula infectada por un método que no afecte al patógeno intracelular, como puede ser lisis por presión osmótica [21, 22],

sonicación [23-25] o detergentes [26]. Posteriormente, se debe separar al patógeno de los restos celulares o proteínas del huésped. Hasta ahora, principalmente tres protocolos de aislamiento han sido utilizados: centrifugación diferencial, separación inmunomagnética, y separación por citometría de flujo. El método más ampliamente utilizado es la separación de bacterias u otros patógenos de los restos celulares del huésped mediante centrifugación diferencial después de la lisis de las células infectadas [21-26]. El segundo método para aislar patógenos de la célula hospedadora es la separación inmunomagnética. Este método consiste en el aislamiento del patógeno, o sus proteínas, presentes en un muestra a través de la unión de anticuerpos específicos que se encuentran conjugados a partículas magnetizadas [27]. Posteriormente se aplica un campo magnético para atraer las partículas y así separar las muestras provenientes del patógeno de los restos de la célula huésped. Esta metodología fue usada por Twine y col. para aislar *Francisella tularensis* provenientes del bazo de ratones infectados y su posterior estudio proteómico [7]. El tercer método para aislar los patógenos intracelulares de las células del huésped es mediante citometría de flujo. Esta metodología proporciona un método para separar una mezcla heterogénea de células en dos o más poblaciones, una célula a la vez, en función de la dispersión de luz específica y las características fluorescentes de cada célula. Como requisito previo para esta metodología es necesario expresar un marcador de fluorescencia en el patógeno, como por ejemplo la proteína verde fluorescente (GFP), para facilitar la separación del patógeno de los restos celulares del huésped [3]. Esta metodología fue aplicada para el aislamiento y posterior estudio preteómico tanto de patógenos bacterianos [20, 28] como protozoarios [29]. Si bien es un método ampliamente utilizado, existen precauciones en su uso debido a la pérdida de sensibilidad de lectura debido a la extinción de la fluorescencia de GFP después de la internalización de los patógenos en la célula huésped [30]. En este estudio se eligió el método de separación de bacterias intracelulares por centrifugación diferencial debido a su bajo costo, rapidez y a que ha sido utilizado exitosamente para analizar el proteoma en estadio intracelular de varios patógenos [22, 31-35].

Además de seleccionar una estrategia de aislamiento del patógeno intracelular adecuada, también es crucial la elección de la metodología de trabajo para el análisis del proteoma [3]. Existen principalmente dos metodologías utilizadas para el análisis proteómico: electroforesis en geles de poliacrilamida de dos dimensiones (2D-GE) o análisis global (*shotgun*) independiente de gel mediante cromatografía líquida (LC)

acoplado a espectrometría de masas en tándem (MS/MS). La proteómica 2D-GE se basa en la separación de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de dos dimensiones. Una vez separadas, las proteínas son teñidas y cuantificadas, posteriormente son digeridas utilizando enzimas proteolíticas y los péptidos resultantes se extraen para la identificación proteica por MS. Los inconvenientes asociados con la proteómica 2D-GE incluyen un rango dinámico acotado, un poder de resolución insuficiente para separar por completo todas las proteínas dentro de una muestra, y el requerimiento de cantidades elevadas de muestra [36]. Por este motivo, la proteómica 2D-GE sólo puede aplicarse con éxito si se puede aislar un mínimo de 10^8 bacterias aproximadamente. Sin embargo, en el caso de estudios de interacción huésped-patógeno, a menudo sólo se puede obtener un número limitado de bacterias después de la infección de las células huésped. En tales casos, las metodologías de análisis global basados en nano-LC-MS/MS independientes de gel son ampliamente preferidas debido a su mayor sensibilidad, que permiten el análisis de 500 a 600 proteínas utilizando tan solo 10^6 células [20]. Este tipo de proteómica consiste en digerir enzimáticamente una muestra proteica por completo y separar los péptidos resultantes mediante nano cromatografía líquida capilar (nano-LC), que luego son cuantificados e identificados mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) [37]. A diferencia de la proteómica 2D-GE, en esta metodología no son las proteínas las que se separan e identifican. En cambio, las proteínas son escindidas en péptidos utilizando enzimas proteolíticas y, posteriormente, estos péptidos se separan y se someten a un análisis de espectrometría de masas [37]. La espectrometría de masas de estos péptidos permite la identificación y cuantificación de las proteínas de la muestra inicial. Se pueden aplicar varias estrategias para cuantificar las proteínas identificadas por los métodos LC-MS/MS independientes de gel, que pueden dividirse principalmente en metodologías sin etiquetas o basados en etiquetas. La primera metodología implica el recuento espectral y la cuantificación basada en la intensidad de los iones derivados de los péptidos [38], mientras que la última emplea el etiquetado de los péptidos con isótopos estables para crear una etiqueta de masa específica que puede ser reconocida por un espectrómetro de masas que proporciona la base para la cuantificación [39]. Estas etiquetas de masa se pueden introducir en las muestras de proteínas o péptidos por métodos químicos o enzimáticos, introducirse metabólicamente, o proporcionarlos en forma de estándares de péptidos sintéticos. Las metodologías de etiquetado más ampliamente utilizadas son las etiquetas de afinidad codificadas por isótopos (ICAT) [40], etiquetas isobáricas para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ) [41], y el

marcado metabólico mediante etiquetado isotópico estable por aminoácidos en cultivo celular (SILAC) [42]. Por otro lado, las metodologías de cuantificación sin etiquetas correlacionan directamente la intensidad de señal de espectrometría de masa de péptidos proteolíticos intactos o el número de eventos de secuenciación peptídica (recuento espectral) con la cantidad de proteína relativa o absoluta [39]. La gran ventaja de los métodos proteómicos basados en etiquetas, particularmente iTRAQ, en comparación con otros métodos de cuantificación, es la capacidad de un análisis múltiple y simultáneo de varias muestras dentro de una única ejecución LC-MS/MS. De este modo, se disminuye significativamente tanto el tiempo del instrumento necesario para el análisis como también las variaciones durante la preparación de la muestra, la cromatografía y la adquisición de MS. Sin embargo, los reactivos utilizados para etiquetar son costosos, permite un análisis de 8 muestras en simultaneo como máximo, y se debe introducir un paso adicional para etiquetar la muestra proteica, un requisito que aumenta la concentración de muestra necesaria para el análisis [43]. La proteómica sin etiquetas por otro lado tiene un costo menor y no se necesitan pasos adicionales para la preparación de la muestra. Por este motivo, tiene un requerimiento de cantidad de muestra menor que los métodos basados en etiquetas. Además, se encontró que ofrece una mayor cobertura de proteoma y un rango dinámico mayor que los métodos basados en etiquetas [44]. Sin embargo, como todas las muestras deben manejarse por separado hasta el análisis final del LC-MS/MS, todos los pasos desde la preparación de la muestra hasta la adquisición del espectro MS pueden introducir variaciones, que pueden sesgar el análisis cuantitativo.

En este capítulo se describe el primer análisis completo del proteoma de *B. pertussis* intracelular y los cambios que ocurren durante el establecimiento de la infección utilizando proteómica nano-LC-MS/MS sin etiquetas. Se decidió utilizar esta metodología debido a que es un método altamente sensible que requiere poca cantidad de muestra para ser realizado. Estos datos proporcionan una primera visión de los cambios en los niveles de proteínas que ocurren mientras *B. pertussis* transita desde el medio extracelular y se adapta para su supervivencia dentro de macrófagos.

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. *B. pertussis* es capaz de sobrevivir dentro de las células THP-1

Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que *B. pertussis* es capaz de sobrevivir en macrófagos humanos permaneciendo en compartimentos no acídicos con características de endosomas tempranos que favorecen su sobrevivencia y eventual replicación intracelular [10]. La existencia de una fase intracelular de *B. pertussis* depende de la capacidad de este patógeno de realizar ajustes fenotípicos que le permitan sobrevivir a las condiciones encontradas en la célula hospedadora y establecer de esta manera un estilo de vida intracelular. En este contexto, se llevó a cabo el estudio de la adaptación del proteoma bacteriano durante la infección intracelular de macrófagos humanos en un intento por caracterizar esta fase de la patogénesis de *B. pertussis*. Dado que trabajar con macrófagos humanos derivados de monocitos primarios limita la cantidad de muestra disponible, se evaluó la posibilidad de realizar estos estudios utilizando la línea celular THP-1 [45]. Esta línea celular de leucemia monocítica humana se diferencia a macrófagos mediante el tratamiento con ésteres de forbol [46]. A diferencia de otras líneas celulares mieloides humanas, como HL-60 ó U937, las células THP-1 diferenciadas son las que comparten mayores semejanzas con los macrófagos primarios [47], razón por la cual esta línea celular es frecuentemente utilizada como modelo de estudio de la interacción macrófago-patógeno [48-52]. En este contexto se eligió trabajar con células THP-1 diferenciadas a macrófagos por tratamiento con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, un éster de forbol) y se evaluó si la infección con *B. pertussis* reflejaba lo observado con macrófagos primarios, en lo que se refiere a tráfico intracelular y sobrevivencia bacteriana [10]. Las células THP-1 fueron diferenciadas con PMA y posteriormente infectadas con *B. pertussis* en ensayos de protección a polimixina B y se evaluó el número de bacterias intracelulares por recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) y microscopía confocal a las 3, 24 y 48 horas post infección. Dado que la polimixina B no puede penetrar las células eucariotas [53], y por lo tanto es incapaz de inactivar las bacterias que fueron internalizadas por las células THP-1, este tipo de ensayos permite evaluar la viabilidad de las bacterias intracelulares a lo largo del tiempo de infección. La **Figura 3.1** muestra que a lo largo de la infección se recuperó un número menor de *B. pertussis* vivas por célula mediante recuento de UFC. Sin embargo, una fracción importante de bacterias vivas fue recuperada 48 h post infección (**Figura 3.1**),

sugiriendo que una proporción significativa de las bacterias internalizadas fueron capaces de evadir la actividad celular bactericida de los macrófagos THP-1.

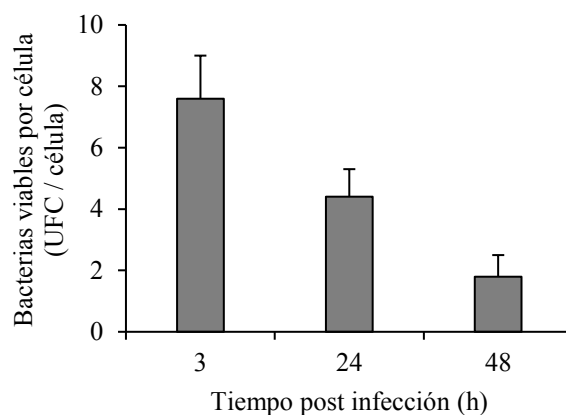


Figura 3.1: Persistencia intracelular de *B. pertussis* en macrófagos THP-1. *B. pertussis* fue incubada con macrófagos humanos THP-1 (R_{b/c} 150) por 2 h a 37 °C. Después de tres lavados, las células fueron incubadas durante 1 h con polimixina B 100 µg/ml para inactivar las bacterias extracelulares. Posteriormente las muestras fueron incubadas durante 0, 21 o 45 h en RPMI-SFB 10% polimixina B (5 µg/ml) y el número de UFC determinado a los distintos tiempos. El número de bacterias viables por célula fue calculado dividiendo el número de UFC por el número de macrófagos viables. Los datos representan la media ± DE de tres experimentos independientes.

En trabajos previos realizados por nuestro grupo con macrófagos primarios se observó mediante microscopía confocal que, si bien un porcentaje mayoritario de los macrófagos resolvía la infección eliminando completamente las bacterias internalizadas, un porcentaje de los mismos no lograba eliminar las bacterias, observándose un incremento de bacterias a lo largo del tiempo en dicha población [10]. Para evaluar si el mismo patrón se observaba en las células THP-1, la proporción de macrófagos infectados y la distribución de las bacterias dentro de los mismos fueron evaluadas por doble tinción inmunofluorescente y microscopía confocal. La **Figura 3.2** muestra que a las 3 h post infección la mayoría de los macrófagos contenían entre 1 y 10 bacterias internalizadas. A las 24 h post infección se observó un incremento en el número de células no infectadas y una disminución en el número de macrófagos conteniendo más de 10 bacterias, indicando que algunos de los macrófagos pudieron eliminar las bacterias intracelulares fagocitadas. Sin embargo, a las 48 h post infección se observó un aumento en el porcentaje de macrófagos infectados con más de 10 bacterias, a expensas de la fracción de macrófagos conteniendo 1 a 10 bacterias, sugiriendo que algunas de las bacterias que sobrevivieron a

tiempos largos podrían haber sido capaces de duplicar dentro de las células THP-1, un resultado similar al encontrado en macrófagos primarios [10].

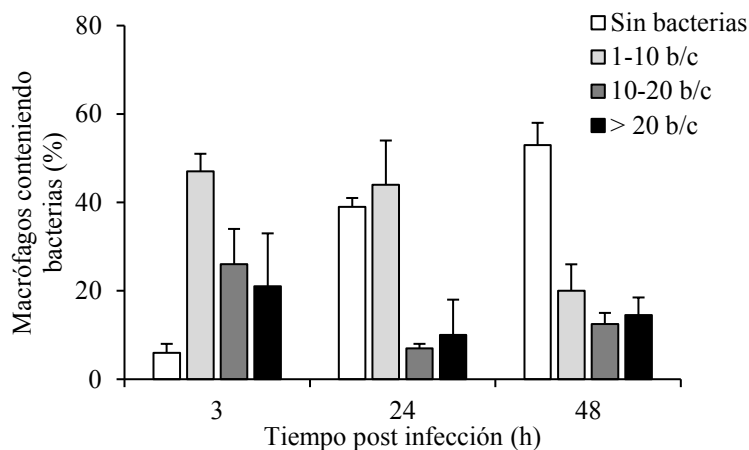


Figura 3.2: Cuantificación de la carga bacteriana de macrófagos a diferentes tiempos post-infección. Macrófagos THP-1 fueron incubados con *B. pertussis* (R_ib/c 150) a 37 °C por 2 h, lavados e incubados con polimixina B para inactivar bacterias extracelulares. A diferentes tiempos post infección las células fueron fijadas y el número de bacteria intracelulares por macrófago (b/c) fue evaluado mediante doble marcación fluorescente. El número de bacterias intracelulares fue determinado mediante microscopía de fluorescencia analizando 100 macrófagos por muestra. Los datos representan la media ± DE de tres experimentos independientes.

Para continuar la caracterización de la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en macrófagos THP-1 se estudió el tráfico intracelular de las bacterias y su localización a diferentes tiempos post infección mediante microscopía confocal utilizando el marcador de compartimientos lisosomales LysoTracker. Los resultados mostraron que el 71% de las bacterias internalizadas por los macrófagos colocalizaban con LysoTracker luego de 3 h de infección (**Figura 3.3**). A las 24 h el número de bacterias colocalizando con este marcador alcanzó en promedio el 85%, demostrando que la mayoría de los fagosomas bacterianos se fusionaron con lisosomas en este estadio de la infección (**Figura 3.3**). Sin embargo, al analizar lo que ocurre a las 48 h post infección, se observó que la mayoría de los fagosomas que contenían a *B. pertussis* eran LysoTracker negativos; sólo el 40 % de las bacterias colocalizaban con LysoTracker (**Figura 3.3**). Esta disminución en la colocalización con compartimientos lisosomales coincide con el aumento en el porcentaje de macrófagos infectados con más de 10 bacterias (**Figura 3.2**), sugiriendo que aquellas bacterias que inicialmente escaparon de la fusión con lisosomas y sobrevivieron

probablemente se duplicaron permaneciendo en compartimientos no ácidos. Este resultado es similar al encontrado previamente en macrófagos primarios [10].

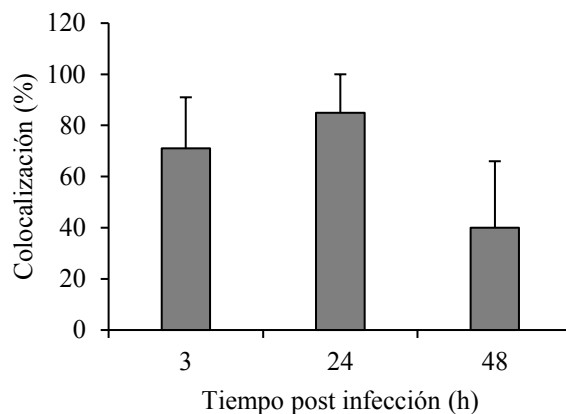


Figura 3.3: Colocalización de *B. pertussis* con el marcador acidotrópico LysoTracker a distintos tiempos post infección. Bacterias *B. pertussis* fueron incubadas con macrófagos THP-1 (R_ib/c 150) por 2 h a 37 °C. Los macrófagos infectados con *B. pertussis* fueron lavados e incubados con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares. Muestras de células tomadas a las 3, 24 y 48 h post infección fueron incubadas con LysoTracker. Las bacterias intracelulares fueron marcadas con un fluoróforo verde antes del análisis por microscopía confocal. Las barras indican el porcentaje de fagosomas positivos para LysoTracker. Los datos representan la media \pm DE de tres experimentos independientes

Para confirmar esta hipótesis, se investigó la viabilidad bacteriana mediante microscopía confocal utilizando una tinción por hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en las muestras de macrófagos infectados. Esta metodología de tinción se basa en la hibridación de una sonda de ADN marcada fluorescentemente con complementariedad al ARN ribosómico bacteriano. Dado que la actividad metabólica de la célula, y por ende su viabilidad, está relacionada con el número de ribosomas que contiene, en esta técnica la intensidad de fluorescencia obtenida es proporcional al número de ribosomas por célula y, por lo tanto, la fluorescencia detectada está relacionada con la viabilidad bacteriana. La ventaja de usar una sonda fluorescente que solo marcará a bacterias viables es que, además de confirmar la viabilidad de bacterias intracelulares, nos permite conocer la localización intracelular de las bacterias vivas. En experimentos control pudimos confirmar que *B. pertussis* inactivada con polimixina B no se marcan mediante esta técnica. Asimismo, muestras de macrófagos THP-1 no infectados no mostraron tinción por FISH, indicando la especificidad de la sonda utilizada. Muestras de macrófagos THP-

1 infectados con *B. pertussis* fueron sometidos a tinción con FISH y LysoTracker para evaluar la localización de las bacterias viables. La tinción por FISH y el análisis por microscopía confocal evidenciaron la presencia de bacterias intracelulares metabólicamente activas en todos los tiempos analizados (**Figura 3.4**). La ausencia de colocalización a las 48 h post infección de las bacterias FISH positivas con el marcador de lisosomas LysoTracker sugiere que *B. pertussis* sobrevivió en compartimentos no ácidos (**Figura 3.4**). Cabe destacar que a las 48 h post infección un alto porcentaje de macrófagos contenía más de 20 bacterias FISH positivas que no colocalizaban con LysoTracker, sugiriendo que al igual que en macrófagos primarios, *B. pertussis* es capaz de sobrevivir y eventualmente duplicar en células THP-1 en compartimentos no ácidos. Estos resultados indican que las células THP-1 pueden ser utilizadas como un modelo de infección de *B. pertussis* en macrófagos humanos.

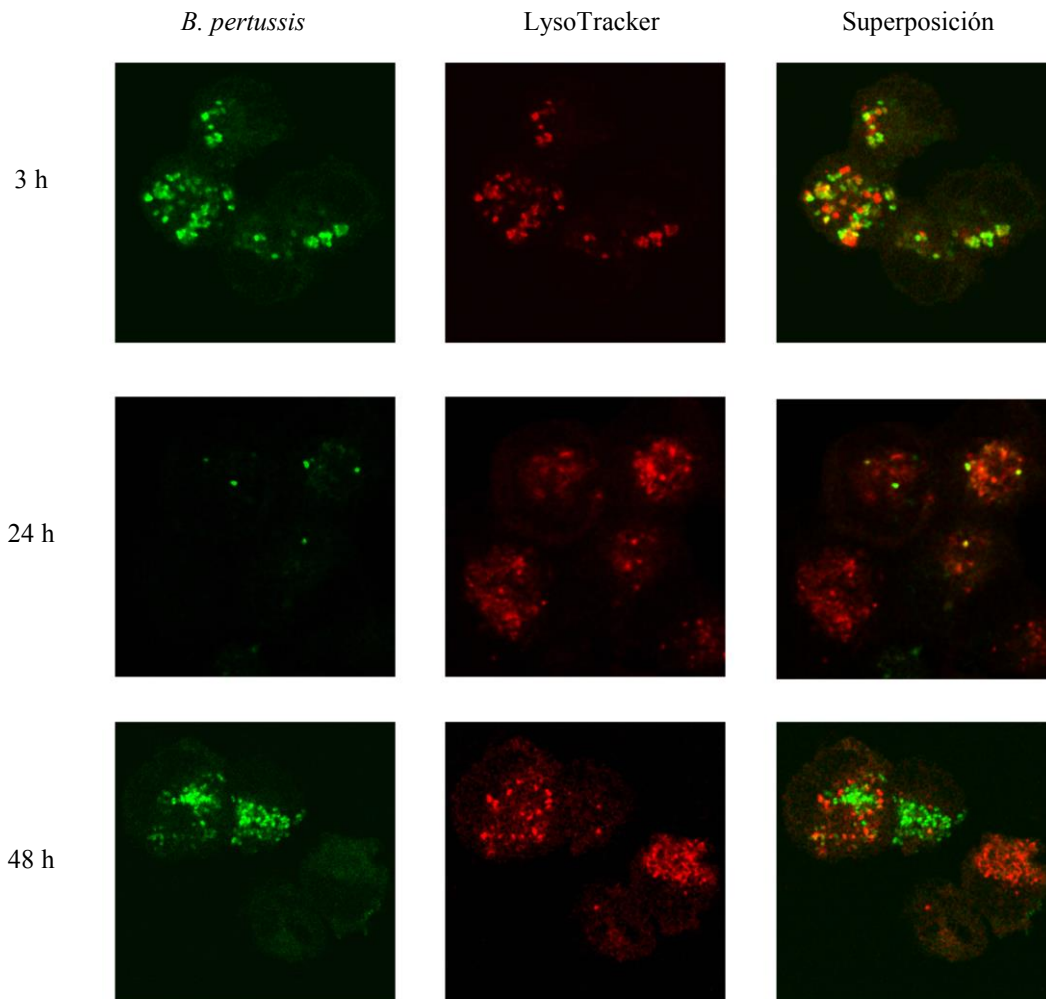


Figura 3.4. Colocalización de *B. pertussis* metabólicamente activas con el marcador acidotrópico LysoTracker. Macrófagos THP-1 fueron incubados con *B. pertussis* (R_b/c 150) por 2 h a 37 °C, lavados e incubados con polimixina B antes de la tinción con LysoTracker a las 3, 24 y 48 h post infección. Las bacterias viables intracelulares fueron marcadas de verde con una tinción fluorescente *in situ* (FISH). Se muestran imágenes representativas de microscopía confocal de macrófagos después de 3, 24 y 48 h post infección.

3.2.2. Adaptación del proteoma de *B. pertussis* durante su estadio intracelular

Para estudiar los cambios en el proteoma de *B. pertussis* durante su estadio intracelular se infectaron macrófagos THP-1 y se recuperaron bacterias intracelulares a las 3 h y 48 h post infección. El aislamiento de bacterias intracelulares se realizó siguiendo un protocolo optimizado por nuestro grupo, que involucra la lisis diferencial de la célula huésped por sonicación y la recuperación de las bacterias intracelulares del lisado por centrifugación diferencial en un gradiente de sacarosa. Como control se cultivaron bacterias solas (en ausencia de macrófagos THP-1) durante 3 h en el medio de cultivo

empleado para el cultivo celular (bacterias extracelulares). El proteoma de estas tres muestras se estudió por LC-MS/MS libre de etiquetas. En total se realizaron 3 replicados biológicos independientes de cada uno de los tiempos analizados y de la muestra control. La primera muestra de bacterias intracelulares fue tomada a las 3 h post infección con el fin de evaluar la adaptación temprana de *B. pertussis* al microambiente encontrado en el macrófago. El segundo tiempo seleccionado para recuperar bacterias intracelulares fue 48 h post infección, un tiempo en el cual la infección ya está establecida y la mayoría de las bacterias intracelulares están vivas residiendo en compartimentos no ácidos. Nuestra hipótesis es que en este punto el proteoma bacteriano debería reflejar la adaptación a largo plazo al ambiente intracelular. Un total de 762 proteínas de *B. pertussis* fueron identificadas en las tres muestras analizadas (control, 3 h y 48 h post infección), que representa un 20% de todas las proteínas codificadas por el genoma de *B. pertussis* [54] (**Tabla Anexa 1**). El gráfico en la **Figura 3.5** muestra las categorías funcionales de las proteínas identificadas de acuerdo a la clasificación MultiFun [55], un sistema de categorización de proteínas según su función celular. Entre estas 762 se encontraron proteínas relacionadas fundamentalmente con funciones de mantenimiento (*housekeeping*); biosíntesis y metabolismo de aminoácidos, carbohidratos, lípidos, proteínas y nucleótidos; y con funciones relacionadas con la producción de energía y transferencia de la información.

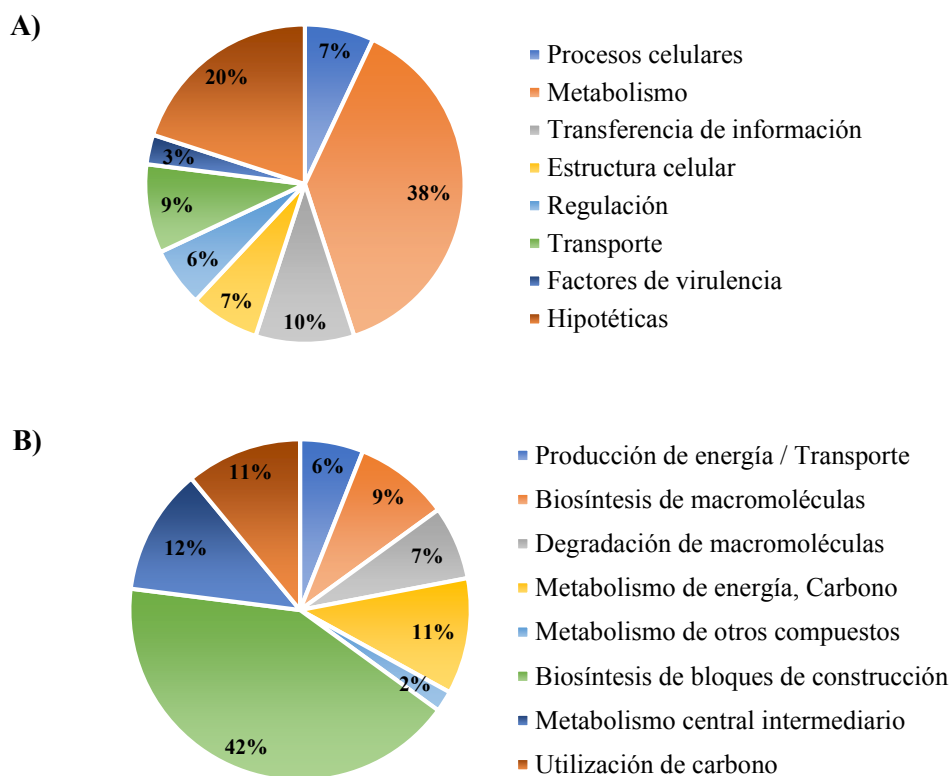


Figura 3.5. Clasificación de las proteínas identificadas de *B. pertussis* en categorías funcionales. **A)** Proteínas identificadas en bacterias control (*B. pertussis* creciendo en medio de cultivo celular por 3 h) y en bacterias intracelulares (*B. pertussis* aislada a las 3 y 48 h post infección de células THP-1) fueron clasificadas de acuerdo a su función celular. **B)** Proteínas pertenecientes a la categoría “Metabolismo” fueron clasificadas posteriormente en subcategorías de acuerdo a la clasificación MultiFun.

Para evaluar la respuesta global de *B. pertussis* al entorno intracelular, se llevó a cabo un análisis de componente principal (ACP) de los tres replicados biológicos de cada tipo de muestra evaluada (control, 3 h y 48 h post infección). Los análisis por componente principal mostraron que los perfiles proteicos de los tres replicados biológicos se agruparon de acuerdo a los tiempos de muestreo, indicando la reproducibilidad de los distintos replicados biológicos (**Figura 3.6**). El gráfico de los primeros dos componentes principales muestra una separación clara entre las bacterias intracelulares de las bacterias extracelulares (control) a lo largo del primer componente principal (PC1), mientras que la separación de las bacterias intracelulares recuperadas a 3 y 48 h post infección a través del segundo componente principal (PC2) indica una respuesta significativamente diferente a lo largo del tiempo de infección intracelular, lo que refleja una adaptación a este ambiente (**Figura 3.6**).

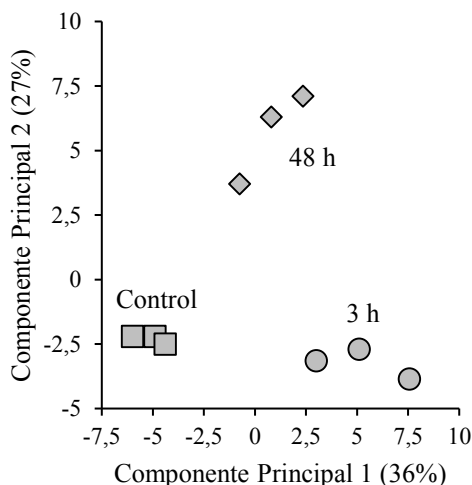


Figura 3.6. Análisis de componente principal de las muestras del proteoma de *B. pertussis*.

Se utilizó ACP para analizar a los datos proteómicos de bacterias control (Control, cuadrados), bacterias intracelulares recuperadas a las 3 h post infección (3 h, círculos) y bacterias intracelulares recuperadas a las 48 h post infección (48 h, diamantes). Se muestra un gráfico de dos dimensiones de ACP. Cada punto representa un replicado biológico independiente.

Para continuar el estudio, se analizó el número de proteínas con abundancia incrementada, disminuida o sin cambios entre los tres grupos de muestras bacterianas (**Tabla 3.1**). La abundancia relativa de las proteínas entre las diferentes muestras se estimó sobre la base de recuentos espectrales. Para comparar estadísticamente la abundancia relativa entre muestras se utilizó un Test *t* pareado con un p-valor de corte de 0,01. Los p-valores obtenidos se ajustaron para controlar la tasa de falso descubrimiento (TFD, error de tipo I) utilizando un valor de corte de 0,05 siguiendo el procedimiento de Benjamini-Hochberg [56]. Las variaciones del proteoma de la bacteria a lo largo del período intracelular indican que *B. pertussis* experimenta un cambio significativo en el fenotipo durante su adaptación a este entorno. Dentro de las proteínas detectadas, un 24% y un 29% presentaron cambios en su abundancia a las 3 y 48 h post infección, respectivamente, comparado con bacterias control. Sin embargo, solo el 8% de las proteínas bacterianas cambian su nivel entre las 3 y 48 h post infección, sugiriendo que la adaptación de *B. pertussis* al entorno intracelular es rápida y que la mayoría de los cambios ocurren durante las primeras horas post infección.

Tabla 3.1: Cambios en la abundancia relativa de proteínas presentes en el proteoma de *B. pertussis* intracelular.

Muestras comparadas	Sin cambios	Aumentadas	Disminuidas
Bacterias intracelulares (3 h p.i.) vs control	577	59 (7,7%)	126 (16,5%)
Bacterias intracelulares (48 h p.i.) vs control	543	65 (8,5%)	154 (20,2%)
Bacterias intracelulares (48 h p.i.) vs bacterias intracelulares (3 h p.i.)	698	18 (2,3%)	46 (6,0%)

Para visualizar de forma global el proceso de adaptación al ambiente intracelular en la **Figura 3.7** se muestran los datos del proteoma graficados en un mapa de árbol tipo Voronoi. Este tipo de gráficos permiten la visualización de rutas metabólicas en forma de polígonos, con la adición de un código de color para identificar aquellas rutas inducidas (rojo) o inhibidas (azul), en comparación a una muestra control [57]. En la **Figura 3.7A** cada polígono indica el promedio de los cambios en las proteínas de una ruta metabólica determinada, mientras que en la **Figura 3.7B** cada polígono representa a una proteína de la ruta metabólica indicada en el panel A. Los ejemplos más prominentes de reducción en la cantidad de proteínas después de la internalización corresponden al metabolismo de nucleótidos y de aminoácidos, con la excepción del metabolismo del glutamato (**Figura 3.7**). Se observó un aumento en el número de proteínas relacionadas con el metabolismo de ARN, biosíntesis de proteínas, reparación y replicación del ADN y de respuesta a estrés en las muestras intracelulares comparadas con el control (**Figura 3.7**). Las proteínas que mostraron diferente abundancia y sus niveles relativos se muestran en la **Tabla Anexa 2**.

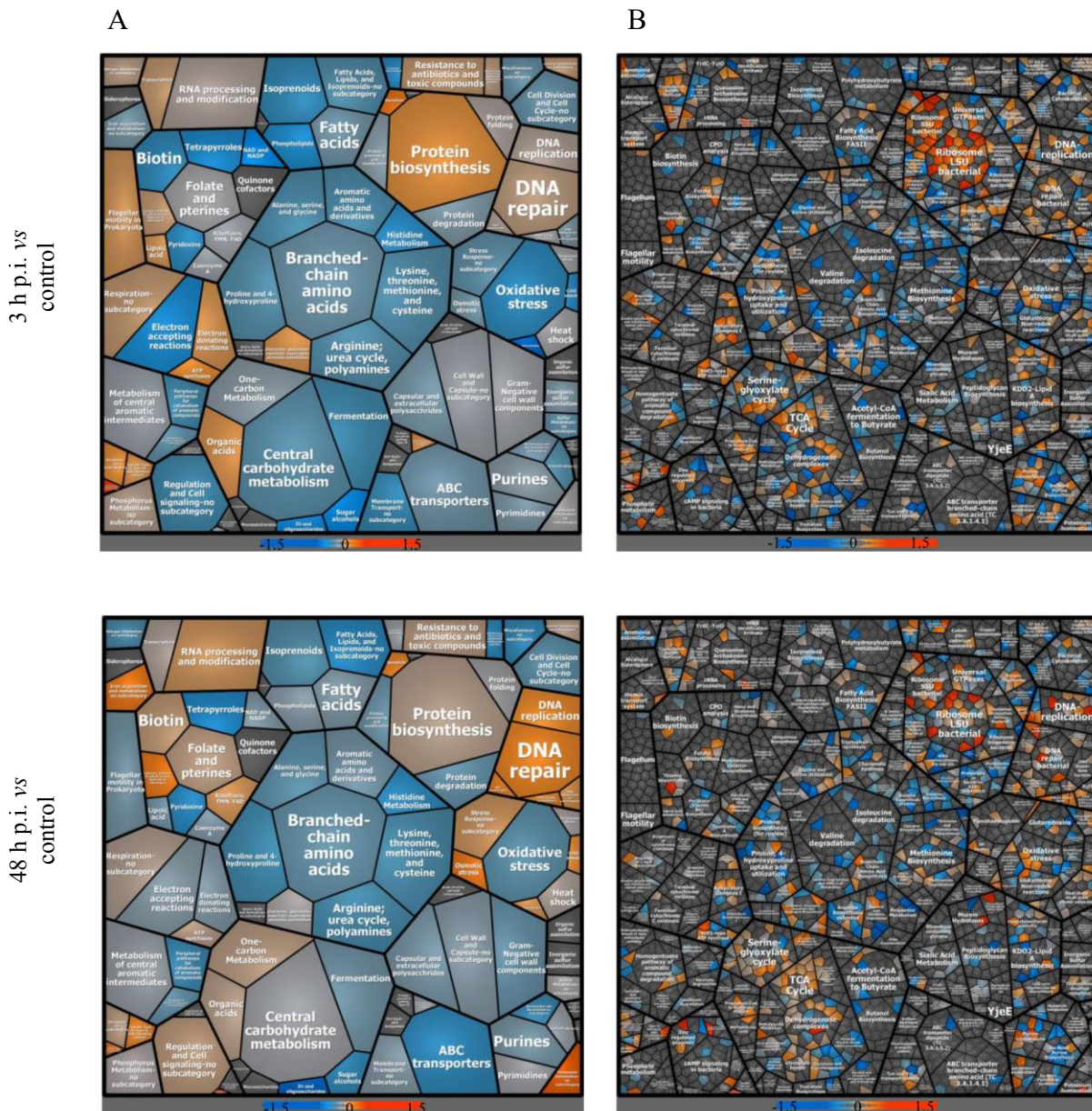


Figura 3.7. Análisis del proteoma de *B. pertussis* por mapa tipo árbol de Voronoi. Los datos de proteómica fueron graficados en un mapa tipo árbol de Voronoi, que permiten la visualización de rutas metabólicas en forma de polígonos, con la adición de un código de color para identificar aquellas rutas inducidas o inhibidas en comparación a una muestra control. Los fragmentos azulados indican niveles proteicos menores en bacterias internalizadas comparadas con el control, los fragmentos rojizos indican niveles proteicos mayores en respuesta a la internalización en comparación con el control. Los fragmentos gris claro indican proteínas que no cambiaron en su abundancia durante la infección y los fragmentos gris oscuro muestran proteínas que no fueron detectadas en este estudio. **A)** Promedio de los cambios en las proteínas de una ruta metabólica determinada **B)** Proteínas individuales de una ruta metabólica determinada. Se muestran los valores medios de tres muestras biológicas independientes.

Para poder validar los datos de proteómica global, se cuantificaron los cambios en la abundancia de un total de ocho proteínas mediante un método de Monitoreo de Reacciones Seleccionado (*Selected Reaction Monitoring*, SRM) [58]. SRM es un método analítico de espectrometría de masas que permite la cuantificación de moléculas pequeñas, como metabolitos [59, 60], y que fue adaptado para la cuantificación de proteínas y péptidos en muestras biológicas complejas [61, 62]. Estudios recientes han posicionado a esta técnica como una alternativa al inmunoblot [63-65]. El análisis por SRM confirmó en términos generales la abundancia relativa de las ocho proteínas seleccionadas, confirmando la precisión del análisis proteómico global presentado previamente (**Figura 3.8**).

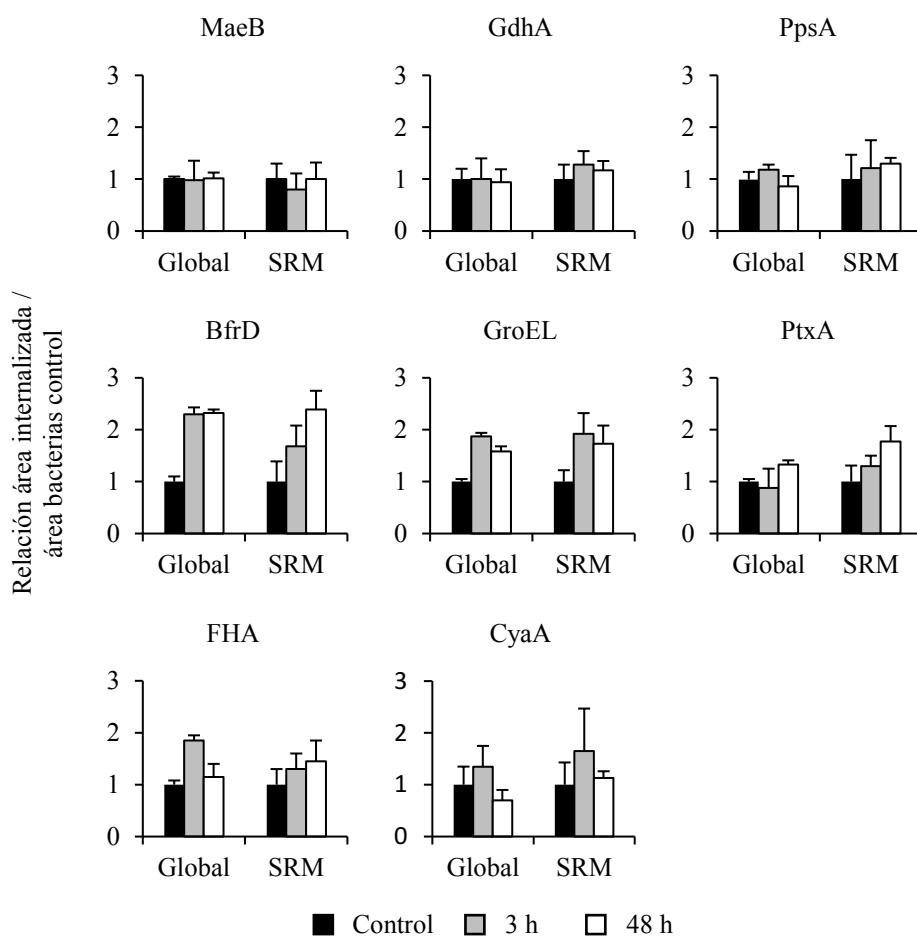


Figura 3.8. Verificación de los resultados de proteómica global por SRM. Se analizaron mediante SRM proteínas seleccionadas de *B. pertussis* identificadas en bacterias control (Control), bacterias intracelulares recuperadas a las 3 h post infección (3 h) y bacterias intracelulares recuperadas a las 48 h post infección (48 h) y su nivel de abundancia fue comparado con los niveles detectados por proteómica LC-MS/MS (Global). Dos replicados independientes con dos replicados técnicos fueron utilizados para el análisis por SRM. Los valores están expresados como la proporción relativa al control. Los datos representan el nivel relativo de proteína \pm DE.

3.2.3. Análisis de proteínas de *B. pertussis* que muestran regulación diferencial en el ambiente intracelular

A continuación, se analizan las proteínas de *B. pertussis* que mostraron una regulación diferencial en el estadio intracelular. Para facilitar este estudio, las proteínas fueron analizadas según su agrupación en categorías MultiFun [55], con modificaciones.

3.2.3.1. Respuesta a estrés

Varias proteínas asociadas con la respuesta bacteriana a condiciones de estrés mostraron un aumento moderado pero significativo durante la infección intracelular. Se encontró que la chaperona GroEL y la cochaperona GroES aumentaron significativamente sus respectivos niveles a las 3 h post infección y permanecieron elevados aún a las 48 h post infección. Por otra parte, la chaperona ClpB permaneció sin cambios durante las primeras 3 h post infección comparado con bacterias control pero mostró un incremento significativo a las 48 h post infección. Las condiciones de estrés tienden a desnaturalizar y agregar a las proteínas. Las chaperonas juegan un rol relevante en la sobrevivencia bajo estas condiciones evitando el efecto perjudicial de la acumulación de proteínas mal plegadas. Mientras que la expresión de GroEL es particularmente importante ya que previene la desnaturalización y el agregado de proteínas [66], ClpB es capaz de desagregar y reactivar proteínas fuertemente agregadas en conjunto con el sistema de chaperona DnaK [67, 68]. Estudios previos demostraron que la actividad de ClpB es crucial para la sobrevivencia transitoria de *E. coli* en condiciones de calor extremo [69]. Otros estudios muestran que ClpB está involucrada en la resistencia al estrés en varias especies bacterianas, como *Staphylococcus aureus* [70], *Helicobacter pylori* [71], *Campylobacter jejuni* [72] y *Brucella suis* [73]. Cabe destacar que ClpB es requerida para la sobrevivencia intracelular de *Porphyromonas gingivalis* [74] y *Staphylococcus aureus* [70], y que es expresada en el estadio intracelular por *Piscirickettsia salmoni* [75]. Por otra parte, se ha sugerido que la chaperona GroEL y la cochaperona GroES, además de los roles que cumplen en el plegado de proteínas, estarían involucradas en otras actividades en bacterias patógenas intracelulares. En particular, se ha encontrado que estas proteínas pueden intervenir varios procesos de la célula huésped, como el tráfico de organelas, las vías de señalización celular y la organización de microfilamentos de actina [76]. Estos resultados sugieren que la inducción de proteínas de estrés en patógenos intracelulares

podría no sólo ayudar a sobrellevar las condiciones ambientales desfavorables encontradas dentro de la célula hospedadora sino también influenciar la interacción huésped-patógeno, favoreciendo el establecimiento de infecciones intracelulares [77]. Otros estudios serán necesarios para determinar si GroEL/GroES y ClpB cumplen otras funciones además del rol de prevenir la acumulación de proteínas mal plegadas, que pudieran ser relevantes para la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis*.

Los estudios de proteómica también indican que la proteína Hfq, un factor central de la regulación postranscripcional en bacterias, aumenta su abundancia en bacterias intracelulares alcanzando un aumento significativo a las 48 h post infección. Hfq es una chaperona que facilita el apareamiento de bases nucleotídicas entre los ARN mensajeros y los ARN no codificantes en respuesta al estrés y otras señales ambientales, generando la activación transcripcional, la represión y/o la degradación de los ARN mensajeros [78], según el caso. Estudios previos demostraron que Hfq se induce en bacterias expuestas a condiciones extremas como golpes de calor [79], estrés osmótico, la presencia de etanol y en la fase estacionaria de crecimiento [80]. Asimismo, Hfq está involucrada en la regulación de varios procesos biológicos, incluyendo la resistencia al estrés y la virulencia [80-88]. En *B. pertussis*, la falta de Hfq resulta en una reducción de la expresión de proteínas de respuesta a estrés, como GroEL, y varios factores de virulencia, incluyendo el sistema de secreción de tipo III (SST3), el autotransportador Vag8 y el factor de colonización traqueal (Tcf) [81]. Además, estudios previos mostraron que la ausencia del gen *hfq* resulta en una capacidad reducida de *B. pertussis* para sobrevivir en la línea celular de macrófagos murinos RAW 246.7 [82], sugiriendo un rol relevante de este factor de regulación postranscripcional en la sobrevivencia intracelular de este patógeno. El incremento en la abundancia de Hfq en *B. pertussis* intracelular en el presente estudio parece confirmar que esta proteína tiene un rol en la respuesta coordinada a los cambios ambientales que ocurren durante la adaptación de esta bacteria al ambiente intracelular. Asimismo, sugieren que la adaptación de *B. pertussis* a este ambiente involucra mecanismos de regulación post transcripcionales en los que intervienen ARN pequeños.

El estrés oxidativo se encuentra entre las condiciones que las bacterias tienen que enfrenar durante la infección intracelular de células inmunes [89]. El estudio del proteoma de *B. pertussis* no mostró cambios en la abundancia relativa de proteínas involucradas en la detoxificación de metabolitos del oxígeno, como las enzimas catalasa (KatA), superóxido dismutasa (SodA/SodB), porfobilinogeno deaminasa (HemC) y alquil

hidroperóxido reductasa (AhpC). Esto concuerda con resultados previos que sugieren que *Bordetella* es capaz de modular la respuesta oxidativa de los macrófagos a través de la acción de la toxina adenilato ciclasa (CyaA) [90-92]. A su vez se ha encontrado que la catalasa y la superóxido dismutasa no son esenciales para la supervivencia intracelular de *B. pertussis* [93, 94].

Finalmente, el análisis proteómico mostró la inducción de la respuesta SOS durante el período intracelular, evidenciada por el incremento de BP2506 (RecN), una proteína involucrada en la reparación del ADN, en bacterias intracelulares. Los niveles de esta proteína se observaron aumentados a las 48 h post infección comparado con las bacterias recuperadas a las 3 h post infección. También se observó un incremento en UvrC, una subunidad de una posible endonucleasa también implicada en la reparación del ADN, en tiempos tempranos de infección. Cabe destacar que el nivel de UvrC permaneció elevado durante todo el periodo de infección.

3.2.3.2. Metabolismo

Con respecto al metabolismo, se encontró una alteración en el nivel de varias proteínas involucradas en el metabolismo de nitrógeno y carbono en las bacterias intracelulares respecto a las extracelulares. Se observó un aumento significativo del precursor de cadena pequeña de la enzima glutamato sintasa (GltD) en bacterias intracelulares a las 3 h post infección comparadas con las bacterias control. Asimismo, se observó un aumento en el nivel de GltB, el precursor de cadena pesada de la enzima glutamato sintasa, aunque este incremento no fue estadísticamente significativo. GltBD cataliza la conversión reversible de dos moléculas de glutamato en alfa-cetoglutarato y glutamina. También se encontró un aumento a las 48 h post infección en la abundancia de la enzima NAD(P)⁺ glutamato deshidrogenasa (GdhA, BP1857). Esta enzima estaría involucrada en la deaminación NAD(P)⁺ dependiente del glutamato a alfa-cetoglutarato. Los niveles incrementados de la enzima glutamato sintasa (GltBD) y la enzima glutamato deshidrogenasa (GdhA) en bacterias intracelulares sugieren que *B. pertussis* dirige su flujo de carbono de glutamato hacia la formación de alfa-cetoglutarato, que subsecuentemente puede ser derivado al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para generar ATP mediante fosforilación oxidativa. En este sentido, también se encontró un incremento de enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, como succinato deshidrogenasa (SdhB), dihipropilamida acetiltransferasa (OdhB), y aconitato hidratasa

(AcnA), y el incremento de varias proteínas del sistema del complejo de la ATP sintasa, que avalarían la hipótesis que *B. pertussis* en su estadio intracelular dirige su metabolismo hacia la formación de alfacetoglutarato para obtener energía. También se encontró un aumento en la enzima glutamato-amonio ligasa adenililtransferasa (GlnE) en bacterias intracelulares, que regula negativamente la actividad de la glutamina sintetasa, una enzima involucrada en la conversión de glutamato en glutamina. El aumento de GlnE sugiere que la síntesis de glutamina se encuentra inhibida, lo que probablemente contribuya al incremento del flujo hacia la formación de glutamato, que posteriormente podría ser convertido en alfacetoglutarato para ser ingresado al TCA.

En general, estos cambios en los niveles de enzimas claves sugieren que el glutamato podría ser una fuente energética de *B. pertussis* en el ambiente intracelular, que concuerda con la inhabilidad de esta bacteria de obtener energía de carbohidratos [54, 95] y el requerimiento del glutamato para el crecimiento *in vitro* de la misma [95]. Se observaron también cambios significativos en los niveles de varios transportadores de aminoácidos ABC tanto conocidos como hipotéticos en bacterias intracelulares. De estos resultados, sin embargo, no se puede obtener una conclusión precisa en lo que se refiere a los mecanismos de incorporación de aminoácidos durante la fase intracelular, debido a que no está descrita la especificidad de sustrato de la mayoría de estos transportadores.

El análisis comparativo del proteoma también indicó que ocurre un aumento en los niveles de factores necesarios para la traducción de ARNm a proteínas en las bacterias intracelulares a tiempos cortos de infección y que los mismos permanecieron elevados durante todo el proceso infeccioso. Se encontró un aumento en varias subunidades ribosomales, como las proteínas ribosomales de la subunidad 30S (RpsI) y las proteínas ribosomales de la subunidad 50S (RplJ, RpmA, RplD, RpmC y RplR, entre otras). Además, se observó un incremento en el factor de iniciación de la transcripción IF-2 (InfB), a tiempos cortos post infección, y su nivel se encontró también elevado a tiempos tardíos de infección. Otros estudios mostraron un incremento en las proteínas involucradas en la traducción durante la replicación intracelular de *Francisella tularensis* [96] y de *Listeria monocytogenes* [97] dentro de macrófagos. En este sentido, el incremento en varias proteínas involucradas en la traducción apoya la hipótesis que *B. pertussis* intracelular se encuentra metabólicamente activa y con capacidad de sintetizar proteínas, afirmando nuestros resultados previos que sugieren que este patógeno sería capaz de duplicar dentro de macrófagos humanos.

3.2.3.3. Virulencia

La expresión de factores de virulencia en *B. pertussis* está controlada por el sistema de dos componentes BvgAS [98]. Como se mencionó en la Introducción de esta Tesis (**Capítulo 1**), ha sido demostrado que factores externos, como la temperatura y algunas señales químicas [99], regulan la actividad de este sistema que produce al menos tres fases fenotípicas distintas: la fase Bvg⁺, caracterizada por la expresión de adhesinas y toxinas; la fase Bvg⁻ o fase avirulenta, caracterizada por la expresión de los genes Bvg reprimidos (*vrg*) y la ausencia de adhesinas y toxinas; y la fase Bvg-intermedia (Bvgⁱ), en la cual se expresa solo una parte de los factores de virulencia y un conjunto de factores específicos de esta fase [100]. Además de la regulación por BvgAS, la expresión de los factores de virulencia de *B. pertussis* también se encuentran regulados por modificaciones post transcripcionales [82]. En este trabajo se observó que *B. pertussis* intracelular expresa la mayoría de los factores de virulencia característicos de la fase Bvg⁺, tanto a las 3 h como a las 48 h post infección, como FHA, Ptx, CyaA, entre otros. El nivel de abundancia de los factores de virulencia en bacterias intracelulares a lo largo del tiempo fue similar a los encontrados en las bacterias extracelulares, e incluso significativamente mayor en el caso de BrkA, a sugiriendo que *B. pertussis* se encontraría en fase virulenta en su estadio intracelular en macrófagos.

El único aumento significativo se observó en BrkA en las bacterias intracelulares a tiempos cortos post infección. Este factor de virulencia se encuentra regulado por el sistema BvgAS [101] y está involucrado en la evasión de la muerte por el sistema del complemento del sistema inmune del huésped [102]. Otros factores de virulencia también controlados por BvgAS, como la hemaglutinina filamentosa (FHA) y el autotransportador Vag8, exhibieron el mismo patrón de incremento, pero en ambos casos este aumento no fue estadísticamente significativo. Cabe destacar que Vag8 también se ha descrito como involucrado en la resistencia al complemento [102]. Por otro lado, *B. pertussis* es capaz de unir a través de FHA a la proteína C4BP, un factor producido por el huésped que inhibe la activación del complemento [103]. Los macrófagos poseen la capacidad de producir todas las proteínas necesarias para formar un sistema de complemento totalmente funcional [104] y recientemente se ha demostrado que este sistema puede activarse intracelularmente, a través de un mecanismo denominado complosoma [105], que podría formar parte de la respuesta bactericida de la célula hospedadora [106]. Al respecto, se ha demostrado que la activación intracelular del

sistema de complemento en células infectadas con *Staphylococcus aureus* produce una disminución en la viabilidad de las bacterias internalizadas [107]. En este sentido, *B. pertussis* podría utilizar simultáneamente los factores de virulencia BrkA, Vag8 y FHA para evadir la muerte por la activación intracelular del sistema del complemento en macrófagos favoreciendo así su persistencia en este tipo celular.

Las dos principales toxinas de *B. pertussis*, la toxina pertussis (PT) y la toxina adenilato ciclasa (CyaA), fueron encontradas en niveles similares tanto en bacterias control como en las muestras de bacterias intracelulares a las 3 h y 48 h post infección. La presencia de ambas toxinas a lo largo de todo el período infeccioso sugiere que las condiciones del entorno intracelular inducen a *B. pertussis* a mantener su expresión e indica que ambas toxinas podrían ser relevantes para su persistencia intracelular. En efecto, estudios que se llevaron a cabo dentro del grupo en paralelo con este estudio reveló que tanto PT como CyaA están involucradas en la modulación de los genes de defensa del macrófago que posibilita la sobrevida intracelular [108]. Se observó que la ausencia de PT o CyaA resulta en una disminución en la persistencia de este patógeno en macrófagos humanos, resaltando la importancia de estas toxinas en la modulación de la respuesta bactericida e inflamatoria del huésped [108]. Dado que la contribución de estas toxinas en la persistencia de *B. pertussis* en macrófagos THP-1 ya fue demostrada por nuestro grupo [108], en este trabajo de Tesis no se profundizó su estudio.

3.2.3.4. Regulación

Del análisis proteómico resulta evidente que durante la transición del ambiente extracelular al intracelular se producen cambios significativos en los niveles de determinadas proteínas. Los factores de transcripción son elementos claves en la regulación de la expresión proteica y en la adaptación de los microorganismos a nuevas condiciones ambientales. En este estudio se encontraron cambios en el nivel de abundancia de varios reguladores transcripcionales en *B. pertussis* intracelular comparado con las bacterias extracelulares. A tiempos cortos post infección se observaron aumentos significativos en la abundancia de BP0744, un posible regulador transcripcional; BP2004, un posible regulador de respuesta; BP1092, una probable histidina quinasa de un sistema de dos componentes; BP3798, una proteína regulatoria de la familia AraC; y BP3702, un regulador transcripcional de la familia GntR. Estos reguladores transcripcionales

permanecieron elevados incluso a las 48 h post infección. Se encontró que el nivel de los reguladores transcripcionales BP1456, de la familia LysR, y BP3222, un regulador de respuesta, aumentaron significativamente a las 48 h post infección sugiriendo que podrían estar involucrado en la modificación de la expresión génica de *B. pertussis* a tiempos tardíos post infección. Los miembros de las familias de reguladores transcripcionales AraC, GntR y LysR controlan una serie de genes diversos en otras bacterias, incluyendo genes involucrados en virulencia, metabolismo y adaptación a la célula huésped [109-112]. A pesar de que el rol de estos reguladores en *B. pertussis* no ha sido dilucidado, los niveles aumentados en bacterias intracelulares sugieren que pueden desempeñar una función en la adaptación y sobrevivencia de esta bacteria dentro de macrófagos. Como la respuesta eficiente a las señales ambientales es crucial para que los patógenos establezcan una infección exitosa, la caracterización de estos factores de transcripción seguramente revelará nuevos mecanismos involucrados en la persistencia intracelular de *B. pertussis*.

Además de los cambios en factores de transcripción, se encontró que *B. pertussis* regula en su estadio intracelular proteínas relacionadas con el metabolismo del diguanilato cíclico (c-di-GMP). Este nucleótido dicíclico está involucrado en la transducción de señales en bacterias actuando como segundo mensajero en diversos aspectos relacionados con la movilidad, la virulencia, la formación de biofilm y la progresión del ciclo celular bacteriano [113]. Las proteínas que regulan los niveles del c-di-GMP contienen dominios GGDEF y/o EAL, que están involucrados en la síntesis (GGDEF) o la degradación (EAL) de este metabolito [114]. El genoma de *B. pertussis* contiene genes que codifican para varias proteínas con dominios relacionados con el metabolismo del c-di-GMP [115]. Dentro de ellas, en este estudio se encontró que la expresión de las proteínas BP1592, con dominios GGDEF-EAL, y BP1492, que contiene un dominio GGDEF, aumenta en bacterias intracelulares, y la expresión de éstas permanece elevada incluso a las 48 h post infección. Se observó además que la expresión de la proteína BP1092, que es el sensor histidina quinasa de un posible sistema de dos componentes y que contiene además dominios GGDEF-EAL, aumenta significativamente en bacterias intracelulares tanto a las 3 h como 48 h post infección. Cabe destacar que BP1092 es la proteína con mayor aumento de expresión a las 48 h post infección en comparación con las bacterias control. Esta combinación de dominios proteicos encontrados en la proteína BP1092 es interesante ya que indicaría

de un sensor de un sistema de dos componentes que podría responder a los niveles de c-di-GMP intracelulares y regular la expresión génica en respuesta a señales ambientales. Dado que las proteínas nombradas anteriormente tienen tanto motivos de síntesis como de degradación de c-di-GMP, es difícil predecir si el aumento de éstas en la fase intracelular de *B. pertussis* estaría elevando o disminuyendo los niveles de este metabolito. Sin embargo, se puede especular que el segundo mensajero c-di-GMP está involucrado en la regulación de los mecanismos que posibilitan la vida intracelular de esta bacteria.

3.2.3.5. Metabolismo de hierro y magnesio

Para poder multiplicarse, los patógenos deben ser capaces de captar los nutrientes que limitan su crecimiento en el ambiente del huésped, adaptándose a la abundancia y a las fuentes de nutrientes encontradas a medida que avanza la infección. Dentro de los nutrientes de mayor relevancia para la supervivencia y multiplicación de los microorganismos se encuentra el hierro. Los mamíferos han desarrollado un mecanismo de defensa conocido como inmunidad nutricional, que consiste en el secuestro activo de nutrientes, entre los que se encuentra el hierro, limitando su disponibilidad para los microorganismos invasores [116]. Los microorganismos que pueden sobrevivir y multiplicarse en el hospedador son los que han adquirido sistemas de captura de hierro de alta afinidad que les permiten incorporar este nutriente a partir de distintas fuentes. Por este motivo, estos sistemas se consideran esenciales para la patogenicidad bacteriana [117, 118]. De todos los sistemas de captura de hierro de alta afinidad descritos en *B. pertussis*, en el proteoma de bacterias intracelulares sólo se identificaron los transportadores BfrD, BfrE, IRP1-3 y AfuA. Los resultados de proteómica indican que el nivel de BfrD se encuentran incrementado a las 3 h post infección en comparación con el nivel en bacterias extracelulares y que el nivel de este receptor se mantuvo elevado durante todo el periodo de infección (**Tabla Anexa 2**). También se observó que el receptor BfrE aumenta su abundancia en bacterias intracelulares, sin embargo, esta proteína se detectó en niveles muy bajos y sólo en un replicado biológico en las muestras de bacterias control. Dado que uno de los criterios seleccionados para la cuantificación de abundancia fue incluir solamente las proteínas que estaban presentes en al menos dos o más replicados biológico, BfrE fue excluido del análisis proteómico presentado en la **Tabla Anexa 1** (ver **Materiales y métodos**, Sección 2.10). Cabe destacar, sin embargo, que se identificó a

BfrE en cada uno de los replicados biológicos de bacterias intracelulares recuperadas tanto a las 3 como a las 48 h post infección sugiriendo que, al igual que BfrD, el nivel de este receptor se encuentra incrementado significativamente en bacterias intracelulares (**Tabla 3.2**). Se ha demostrado en *B. bronchiseptica* que BfrD y BfrE están involucrados en la obtención de hierro a través de las catecolaminas del huésped, como los neuroquímicos epinefrina y norepinefrina [119]. Estos neuroquímicos extraen hierro de transferrina o lactoferrina, y luego son capturados por BfrD y BfrE [119]. Si bien estos receptores están presentes en *B. pertussis*, no se ha podido hasta el momento verificar su funcionalidad, debido posiblemente al bajo nivel de expresión que presentan en bacterias crecidas en medios de cultivo líquido convencionales [120]. Sin embargo, teniendo en cuenta que tanto BfrD como BfrE están involucrados en la captura de hierro a través de catecolaminas y transferrina en *B. bronchiseptica* [119], que según lo demuestran estudios previos *B. pertussis* sobrevive en macrófagos en compartimientos con acceso a transferrina [10], y que las células inmunes son capaces de sintetizar catecolaminas [121-123], se puede especular que estos dos receptores podrían estar involucrados en la captura de hierro en el estadio intracelular de este patógeno. Esta hipótesis se investiga en el **Capítulo 4** de esta Tesis.

Tabla 3.2. Los receptores BfrD y BfrE aumentan su expresión en el estadio intracelular de *B. pertussis*. Se muestran valores de cuantías espectrales normalizadas (Promedio ± DE) de tres replicados biológicos.

	Control	3 h p. i.	48 h p. i.	p-valor ANOVA
BfrD	17,0 ± 1,7	39,3 ± 4,7	39,7 ± 2,0	p<0,001
BfrE	0,3 ± 0,6	2,3 ± 1,1	6,7 ± 1,5	p<0,001

En bacterias Gram-negativas, los receptores de hierro presentes en la membrana externa transportan este nutriente del medio extracelular hacia el periplasma. Una vez en esta localización, el hierro es captado por otros transportadores que son los encargados de movilizarlo hacia el citoplasma. En *B. pertussis* los únicos transportadores de hierro que transportan este metal del periplasma al citoplasma caracterizados hasta el momento son AfuA (también llamado FbpA) [124, 125] e IRP1-3 (también llamado FtrA) [126, 127]. Los sistemas de captura de hierro de membrana externa de *B. pertussis* que utilizan el sideróforo alcaligina, los xenosideróforos o los transportadores de Fe³⁺ libre convergen en el receptor periplasmático AfuA, que es parte de un sistema de transporte de la familia

ABC [124, 128]. Es importante destacar que tanto los sideróforos como los xenosideróforos son específicos de Fe^{3+} . Por otro lado, el receptor IRP1-3, que fue identificado por primera vez por nuestro grupo en un estudio del proteoma de *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro [129], forma parte de un sistema transportador periplásmico de alta afinidad de Fe^{2+} [126]. El sistema de captura IRP1-3 se induce en limitación de hierro [129] o en entornos con pH ácido [126]. Esta última condición favorece la estabilidad del estado de oxidación Fe^{2+} . Más aun, de acuerdo a Brickman y col., IRP1-3 es el único sistema de captura de hierro de alta afinidad funcional en *B. pertussis* a valores de pH 6,0 o inferiores *in vitro* [126]. Los resultados de proteómica de *B. pertussis* intracelular mostraron que esta bacteria activa la expresión del transportador IRP1-3 a las 48 hs post infección dentro de macrófagos. Como la expresión de IRP1-3 fue detectada en un único replicado biológico, fue excluido del análisis proteómico presentado en la **Tabla Anexa 1**. Considerando que *B. pertussis* sobrevive intracelularmente en endosomas tempranos en donde el pH sería cercano a 6,0 [10], nuestros resultados concuerdan con los estudios realizados por Brickman y col [126] y sugieren que IRP1-3 podría tener un rol relevante durante la adquisición de hierro en el estadio intracelular de este patógeno. Esta hipótesis se investiga en el **Capítulo 5** de esta Tesis.

Por último, se observó que la expresión de AfuA disminuye a las 3 h post infección comparado con bacterias extracelulares. A las 48 h post infección no fue posible detectar su expresión. Este resultado parece sugerir que *B. pertussis* intracelular no obtiene el hierro a partir de la captura de sideróforos, dado que la ausencia de AfuA impediría el transporte del hierro capturado por éstos hacia el citoplasma. Por este motivo, se puede especular que la captura de hierro de *B. pertussis* dentro del fagosoma estaría mediada principalmente a por BfrD, BfrE, IRP1-3 y/o algún otro receptor no identificado por este estudio proteómico. Asimismo, estos resultados indican que las condiciones de entorno encontradas por *B. pertussis* en su estadio intracelular modulan la expresión del receptor AfuA, una hipótesis que se investiga en el **Capítulo 5** de esta Tesis.

Otro factor identificado en este estudio proteómico que podría estar involucrado en la adquisición de nutrientes durante el estadio intracelular de *B. pertussis* es MgtC (BP0414). Este factor promueve la sobrevivencia intracelular de numerosos patógenos en células del hospedador al permitir la adaptación a entornos ácidos y/o limitados en magnesio [130], condiciones de entorno que podrían ser las encontradas por *B. pertussis* dentro de macrófagos. MgtC se encuentra presente en varios patógenos y estudios

basados en homología de secuencia sugieren que este gen se ha adquirido por transferencia horizontal durante la evolución de los microorganismos patógenos [131]. Esta proteína fue identificada solamente en muestras de *B. pertussis* aislada a las 48 h post infección, sugiriendo que MgtC sólo es inducido en localización intracelular y a tiempos tardíos de infección. MgtC fue excluido del análisis estadístico presentado en la **Tabla Anexa 1** dado que solamente fue identificado un péptido derivado del mismo, y una de las condiciones elegidas para el análisis estadístico es la identificación de al menos dos péptidos derivados de las proteínas estudiadas. Como la expresión de MgtC en *B. pertussis* no había sido reportada previamente se decidió caracterizar el rol de este factor en la sobrevivencia intracelular de este patógeno en el **Capítulo 6** de esta Tesis.

3.3. Conclusiones

En resumen, los resultados presentados en este capítulo describen que *B. pertussis* adapta su proteoma dentro de macrófagos humanos, confirmando la existencia de una fase intracelular de este patógeno en este tipo celular. Asimismo, indican que esta adaptación a las condiciones intracelulares eventualmente posibilita su supervivencia dentro de macrófagos humanos. Estos resultados confirman que *B. pertussis* es un patógeno intracelular facultativo y ayudan a comprender su bien conocida y poco explicada persistencia dentro de su único hospedador y nicho de persistencia, el hombre.

3.4. Referencias

1. Zhang CG, Chromy BA, McCutchen-Maloney SL. Host–pathogen interactions: a proteomic view. *Expert Rev Proteomics*. 2005,2(2):187-202.
2. Coiras M, Camafeita E, Lopez-Huertas MR, Calvo E, Lopez JA, Alcami J. Application of proteomics technology for analyzing the interactions between host cells and intracellular infectious agents. *Proteomics*. 2008,8(4):852-873.
3. Schmidt F, Völker U. Proteome analysis of host–pathogen interactions: investigation of pathogen responses to the host cell environment. *Proteomics*. 2011,11(15):3203-3211.
4. Bumann D. Pathogen proteomes during infection: A basis for infection research and novel control strategies. *Journal of proteomics*. 2010,73(11):2267-2276.
5. Cash P. Proteomics of bacterial pathogens. *Expert opinion on drug discovery*. 2008,3(5):461-473.
6. Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol*. 2002,43(3):717-731.
7. Twine SM, Mykytczuk NC, Petit MD, Shen H, Sjöstedt A, Conlan JW, Kelly JF. *In vivo* proteomic analysis of the intracellular bacterial pathogen, *Francisella tularensis*, isolated from mouse spleen. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006,345(4):1621-1633.
8. Lamberti Y, Gorgojo J, Massillo C, Rodriguez ME. *Bordetella pertussis* entry into respiratory epithelial cells and intracellular survival. *Pathog Dis*. 2013,69(3):194-204.
9. Lamberti Y, Perez Vidakovics ML, van der Pol LW, Rodriguez ME. Cholesterol-rich domains are involved in *Bordetella pertussis* phagocytosis and intracellular survival in neutrophils. *Microb Pathog*. 2008,44(6):501-511.
10. Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovics ML, Harvill ET, Rodriguez ME. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun*. 2010,78(3):907-913.
11. van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med*. 1968,128(3):415-435.
12. Paddock CD, Sanden GN, Cherry JD, Gal AA, Langston C, Tatti KM, Wu KH, Goldsmith CS, Greer PW, Montague JL, Eliason MT, Holman RC, Guarner J, Shieh WJ, Zaki SR. Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin Infect Dis*. 2008,47(3):328-338.
13. Monack DM, Mueller A, Falkow S. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nature Reviews Microbiology*. 2004,2(9):747.
14. Ernst RK, Guina T, Miller SI. How Intracellular Bacteria Survive: Surface Modifications That Promote Resistance to Host Innate Immune Responses. *The Journal of Infectious Diseases*. 1999,179(Supplement 2):S326-S330.
15. Li AH, Lam WL, Stokes RW. Characterization of genes differentially expressed within macrophages by virulent and attenuated *Mycobacterium tuberculosis* identifies candidate genes involved in intracellular growth. *Microbiology*. 2008,154(Pt 8):2291-2303.
16. Faucher SP, Porwollik S, Dozois CM, McClelland M, Daigle F. Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006,103(6):1906-1911.
17. Faucher SP, Mueller CA, Shuman HA. *Legionella pneumophila* Transcriptome during Intracellular Multiplication in Human Macrophages. *Front Microbiol*. 2011,2:60.
18. Nunez-Hernandez C, Tierrez A, Ortega AD, Pucciarelli MG, Godoy M, Eisman B, Casadesus J, Garcia-del Portillo F. Genome expression analysis of nonproliferating intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium unravels an acid pH-dependent PhoP-PhoQ response essential for dormancy. *Infect Immun*. 2013,81(1):154-165.
19. Cappelli G, Volpe E, Grassi M, Liseo B, Colizzi V, Mariani F. Profiling of *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during human macrophage infection:

- upregulation of the alternative sigma factor G, a group of transcriptional regulators, and proteins with unknown function. *Res Microbiol.* 2006,157(5):445-455.
20. Schmidt F, Scharf SS, Hildebrandt P, Burian M, Bernhardt J, Dhople V, Kalinka J, Gutjahr M, Hammer E, Volker U. Time-resolved quantitative proteome profiling of host-pathogen interactions: the response of *Staphylococcus aureus* RN1HG to internalisation by human airway epithelial cells. *Proteomics.* 2010,10(15):2801-2811.
 21. Kwaik YA, Eisenstein B, Engleberg N. Phenotypic modulation by *Legionella pneumophila* upon infection of macrophages. *Infect Immun.* 1993,61(4):1320-1329.
 22. Hanawa T, Yamamoto T, Kamiya S. *Listeria monocytogenes* can grow in macrophages without the aid of proteins induced by environmental stresses. *Infect Immun.* 1995,63(12):4595-4599.
 23. Bechah Y, El Karkouri K, Mediannikov O, Leroy Q, Pelletier N, Robert C, Médigue C, Mege J-L, Raoult D. Genomic, proteomic, and transcriptomic analysis of virulent and avirulent *Rickettsia prowazekii* reveals its adaptive mutation capabilities. *Genome Res.* 2010.
 24. Molestina RE, Klein JB, Miller RD, Pierce WH, Ramirez JA, Summersgill JT. Proteomic analysis of differentially expressed *Chlamydia pneumoniae* genes during persistent infection of HEp-2 cells. *Infect Immun.* 2002,70(6):2976-2981.
 25. Ogawa M, Renesto P, Azza S, Moinier D, Fourquet P, Gorvel JP, Raoult D. Proteome analysis of *Rickettsia felis* highlights the expression profile of intracellular bacteria. *Proteomics.* 2007,7(8):1232-1248.
 26. Fernández-Arenas E, Cabezón V, Bermejo C, Arroyo J, Nombela C, Diez-Orejas R, Gil C. Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2007,6(3):460-478.
 27. Clarke C, Davies S, Immunomagnetic cell separation, in *Metastasis research protocols.* 2001, Springer. p. 17-23.
 28. Becker D, Selbach M, Rollenhagen C, Ballmaier M, Meyer TF, Mann M, Bumann D. Robust *Salmonella* metabolism limits possibilities for new antimicrobials. *Nature.* 2006,440:303.
 29. Paape D, Lippuner C, Schmid M, Ackermann R, Barrios-Llerena ME, Zimny-Arndt U, Brinkmann V, Arndt B, Pleissner KP, Jungblut PR, Aebischer T. Transgenic, Fluorescent *Leishmania mexicana* Allow Direct Analysis of the Proteome of Intracellular Amastigotes. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2008,7(9):1688-1701.
 30. Rodriguez ME, Van der Pol WL, Van de Winkel JG. Flow cytometry-based phagocytosis assay for sensitive detection of opsonic activity of pneumococcal capsular polysaccharide antibodies in human sera. *J Immunol Methods.* 2001,252(1-2):33-44.
 31. Abshire KZ, Neidhardt FC. Analysis of proteins synthesized by *Salmonella typhimurium* during growth within a host macrophage. *J Bacteriol.* 1993,175(12):3734-3743.
 32. Buchmeier NA, Heffron F. Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. *Science.* 1990,248(4956):730-732.
 33. Burns-Keliher LL, Portteus A, Curtiss R. Specific detection of *Salmonella typhimurium* proteins synthesized intracellularly. *J Bacteriol.* 1997,179(11):3604-3612.
 34. Konkel ME, Cieplak W. Altered synthetic response of *Campylobacter jejuni* to cocultivation with human epithelial cells is associated with enhanced internalization. *Infect Immun.* 1992,60(11):4945-4949.
 35. Yamamoto T, Hanawa T, Ogata S. Induction of *Yersinia enterocolitica* stress proteins by phagocytosis with macrophage. *Microbiol Immunol.* 1994,38(4):295-300.
 36. Wilkins MR, Appel RD, Van Eyk JE, Chung MC, Görg A, Hecker M, Huber LA, Langen H, Link AJ, Paik YK. Guidelines for the next 10 years of proteomics. *Proteomics.* 2006,6(1):4-8.

37. Baggerman G, Vierstraete E, De Loof A, Schoofs L. Gel-based versus gel-free proteomics: a review. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2005,8(8):669-677.
38. Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, Mirzaei M, Mariani M, Assadourian G, Lee A, Van Sluyter SC, Haynes PA. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics*. 2011,11(4):535-553.
39. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem*. 2007,389(4):1017-1031.
40. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*. 1999,17(10):994.
41. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & cellular proteomics*. 2004,3(12):1154-1169.
42. Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & cellular proteomics*. 2002,1(5):376-386.
43. Patel VJ, Thalassinou K, Slade SE, Connolly JB, Crombie A, Murrell JC, Scrivens JH. A Comparison of Labeling and Label-Free Mass Spectrometry-Based Proteomics Approaches. *J Proteome Res*. 2009,8(7):3752-3759.
44. Li Z, Adams RM, Chourey K, Hurst GB, Hettich RL, Pan C. Systematic comparison of label-free, metabolic labeling, and isobaric chemical labeling for quantitative proteomics on LTQ Orbitrap Velos. *J Proteome Res*. 2012,11(3):1582-1590.
45. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 1980,26(2):171-176.
46. Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, Tada K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res*. 1982,42(4):1530-1536.
47. Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*. 1991,47(1):22-31.
48. Starr T, Bauler TJ, Malik-Kale P, Steele-Mortimer O. The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with *Salmonella Typhimurium*. *PLoS ONE*. 2018,13(3):e0193601-e0193601.
49. Barker KS, Liu T, Rogers PD. Coculture of THP-1 Human Mononuclear Cells with *Candida albicans* Results in Pronounced Changes in Host Gene Expression. *The Journal of Infectious Diseases*. 2005,192(5):901-912.
50. Theus S, Cave M, Eisenach K. Activated THP-1 cells: an attractive model for the assessment of intracellular growth rates of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Infect Immun*. 2004,72(2):1169-1173.
51. Murayama T, Ohara Y, Obuchi M, Khabar K, Higashi H, Mukaida N, Matsushima K. Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1-and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene. *J Virol*. 1997,71(7):5692-5695.
52. Ogunkolade B, Colomb-Valet I, Monjour L, Rhodes-Feuillette A, Abita J, Frommel D. Interactions between the human monocytic leukaemia THP-1 cell line and Old and New World species of *Leishmania*. *Acta Trop*. 1990,47(3):171-176.
53. Lee CK, Roberts AL, Finn TM, Knapp S, Mekalanos JJ. A new assay for invasion of HeLa 229 cells by *Bordetella pertussis*: effects of inhibitors, phenotypic modulation, and genetic alterations. *Infect Immun*. 1990,58(8):2516-2522.

54. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MT, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet.* 2003,35(1):32-40.
55. Serres MH, Riley M. MultiFun, a multifunctional classification scheme for *Escherichia coli* K-12 gene products. *Microb Comp Genomics.* 2000,5(4):205-222.
56. Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res.* 2001,125(1):279-284.
57. Bernhardt J, Michalik S, Wollscheid B, Völker U, Schmidt F. Proteomics approaches for the analysis of enriched microbial subpopulations and visualization of complex functional information. *Curr Opin Biotechnol.* 2013,24(1):112-119.
58. Kitteringham NR, Jenkins RE, Lane CS, Elliott VL, Park BK. Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009,877(13):1229-1239.
59. Anderson L, Hunter CL. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol Cell Proteomics.* 2006,5(4):573-588.
60. Desiderio DM, Kai M. Preparation of stable isotope-incorporated peptide internal standards for field desorption mass spectrometry quantification of peptides in biologic tissue. *Biomed Mass Spectrom.* 1983,10(8):471-479.
61. Cohen Freue GV, Borchers CH. Multiple reaction monitoring (MRM): principles and application to coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012,5(3):378.
62. Tang HY, Beer LA, Barnhart KT, Speicher DW. Rapid verification of candidate serological biomarkers using gel-based, label-free multiple reaction monitoring. *J Proteome Res.* 2011,10(9):4005-4017.
63. Maiolica A, Junger MA, Ezkurdia I, Aebersold R. Targeted proteome investigation via selected reaction monitoring mass spectrometry. *J Proteomics.* 2012,75(12):3495-3513.
64. Picotti P, Rinner O, Stallmach R, Dautel F, Farrah T, Domon B, Wenschuh H, Aebersold R. High-throughput generation of selected reaction-monitoring assays for proteins and proteomes. *Nat Methods.* 2010,7(1):43-46.
65. Aebersold R, Burlingame AL, Bradshaw RA. Western blots versus selected reaction monitoring assays: time to turn the tables? *Mol Cell Proteomics.* 2013,12(9):2381-2382.
66. Fayet O, Ziegelhoffer T, Georgopoulos C. The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bacteriol.* 1989,171(3):1379-1385.
67. Zolkiewski M. A camel passes through the eye of a needle: protein unfolding activity of Clp ATPases. *Mol Microbiol.* 2006,61(5):1094-1100.
68. Weibezahn J, Tessarz P, Schlieker C, Zahn R, Maglica Z, Lee S, Zentgraf H, Weber-Ban EU, Dougan DA, Tsai FT, Mogk A, Bukau B. Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB. *Cell.* 2004,119(5):653-665.
69. Squires CL, Pedersen S, Ross BM, Squires C. ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. *J Bacteriol.* 1991,173(14):4254-4262.
70. Frees D, Chastanet A, Qazi S, Sorensen K, Hill P, Msadek T, Ingmer H. Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 2004,54(5):1445-1462.
71. Allan E, Mullany P, Tabaqchali S. Construction and characterization of a *Helicobacter pylori* clpB mutant and role of the gene in the stress response. *J Bacteriol.* 1998,180(2):426-429.
72. Reid AN, Pandey R, Palyada K, Naikare H, Stintzi A. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in the response to acidic pH and stomach transit. *Appl Environ Microbiol.* 2008,74(5):1583-1597.

73. Ekaza E, Teyssier J, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP, Kohler S. Characterization of *Brucella suis* clpB and clpAB mutants and participation of the genes in stress responses. *J Bacteriol.* 2001,183(8):2677-2681.
74. Capestany CA, Tribble GD, Maeda K, Demuth DR, Lamont RJ. Role of the Clp system in stress tolerance, biofilm formation, and intracellular invasion in *Porphyrromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* 2008,190(4):1436-1446.
75. Isla A, Haussmann D, Vera T, Kausel G, Figueroa J. Identification of the clpB and bipA genes and an evaluation of their expression as related to intracellular survival for the bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Vet Microbiol.* 2014,173(3-4):390-394.
76. Garduno RA, Chong A, Nasrallah GK, Allan DS. The *Legionella pneumophila* Chaperonin - An Unusual Multifunctional Protein in Unusual Locations. *Front Microbiol.* 2011,2:122.
77. Goebel W, Gross R. Intracellular survival strategies of mutualistic and parasitic prokaryotes. *Trends Microbiol.* 2001,9(6):267-273.
78. Vogel J, Luisi BF. Hfq and its constellation of RNA. *Nature Reviews Microbiology.* 2011,9(8):578.
79. Tsui HC, Feng G, Winkler ME. Transcription of the mutL repair, miaA tRNA modification, hfq pleiotropic regulator, and hflA region protease genes of *Escherichia coli* K-12 from clustered Esigma32-specific promoters during heat shock. *J Bacteriol.* 1996,178(19):5719-5731.
80. Christiansen JK, Larsen MH, Ingmer H, Sogaard-Andersen L, Kallipolitis BH. The RNA-binding protein Hfq of *Listeria monocytogenes*: role in stress tolerance and virulence. *J Bacteriol.* 2004,186(11):3355-3362.
81. Bibova I, Hot D, Keidel K, Amman F, Slupek S, Cerny O, Gross R, Vecerek B. Transcriptional profiling of *Bordetella pertussis* reveals requirement of RNA chaperone Hfq for Type III secretion system functionality. *RNA Biol.* 2015,12(2):175-185.
82. Bibova I, Skopova K, Masin J, Cerny O, Hot D, Sebo P, Vecerek B. The RNA chaperone Hfq is required for virulence of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 2013,81(11):4081-4090.
83. Cui M, Wang T, Xu J, Ke Y, Du X, Yuan X, Wang Z, Gong C, Zhuang Y, Lei S, Su X, Wang X, Huang L, Zhong Z, Peng G, Yuan J, Chen Z, Wang Y. Impact of Hfq on global gene expression and intracellular survival in *Brucella melitensis*. *PLoS ONE.* 2013,8(8):e71933.
84. Ding Y, Davis BM, Waldor MK. Hfq is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates sigma expression. *Mol Microbiol.* 2004,53(1):345-354.
85. Kulesus RR, Diaz-Perez K, Slechts ES, Eto DS, Mulvey MA. Impact of the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2008,76(7):3019-3026.
86. Meibom KL, Forslund AL, Kuoppa K, Alkhuder K, Dubail I, Dupuis M, Forsberg A, Charbit A. Hfq, a novel pleiotropic regulator of virulence-associated genes in *Francisella tularensis*. *Infect Immun.* 2009,77(5):1866-1880.
87. Robertson GT, Roop RM, Jr. The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. *Mol Microbiol.* 1999,34(4):690-700.
88. Sittka A, Pfeiffer V, Tedin K, Vogel J. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol.* 2007,63(1):193-217.
89. Hassett DJ, Cohen MS. Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells. *FASEB J.* 1989,3(14):2574-2582.
90. Njamkepo E, Pinot F, Francois D, Guiso N, Polla BS, Bachelet M. Adaptive responses of human monocytes infected by *Bordetella pertussis*: the role of adenylate cyclase hemolysin. *J Cell Physiol.* 2000,183(1):91-99.

91. Pearson RD, Symes P, Conboy M, Weiss AA, Hewlett EL. Inhibition of monocyte oxidative responses by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J Immunol.* 1987,139(8):2749-2754.
92. Cerny O, Kamanova J, Masin J, Bibova I, Skopova K, Sebo P. *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin Blocks Induction of Bactericidal Nitric Oxide in Macrophages through cAMP-Dependent Activation of the SHP-1 Phosphatase. *J Immunol.* 2015,194(10):4901-4913.
93. Khelef N, DeShazer D, Friedman RL, Guiso N. *In vivo* and *in vitro* analysis of *Bordetella pertussis* catalase and Fe-superoxide dismutase mutants. *FEMS Microbiol Lett.* 1996,142(2-3):231-235.
94. Graeff-Wohlleben H, Killat S, Banemann A, Guiso N, Gross R. Cloning and characterization of an Mn-containing superoxide dismutase (SodA) of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1997,179(7):2194-2201.
95. Lane AG. Use of glutamic acid to supplement fluid medium for cultivation of *Bordetella pertussis*. *Appl Microbiol.* 1970,19(3):512-520.
96. Pavkova I, Brychta M, Straskova A, Schmidt M, Macela A, Stulik J. Comparative proteome profiling of host-pathogen interactions: insights into the adaptation mechanisms of *Francisella tularensis* in the host cell environment. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013,97(23):10103-10115.
97. Chatterjee SS, Hossain H, Otten S, Kuenne C, Kuchmina K, Machata S, Domann E, Chakraborty T, Hain T. Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 2006,74(2):1323-1338.
98. Cotter PA, Jones AM. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol.* 2003,11(8):367-373.
99. Melton AR, Weiss AA. Characterization of environmental regulators of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1993,61(3):807-815.
100. Deora R, Bootsma HJ, Miller JF, Cotter PA. Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol Microbiol.* 2001,40(3):669-683.
101. Fernandez RC, Weiss AA. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun.* 1994,62(11):4727-4738.
102. Thiriard A, Raze D, Loch C. Diversion of complement-mediated killing by *Bordetella*. *Microb Infect.* 2018.
103. Jongerius I, Schuijt TJ, Mooi FR, Pinelli E. Complement evasion by *Bordetella pertussis*: implications for improving current vaccines. *J Mol Med.* 2015,93(4):395-402.
104. Lubbers R, van Essen MF, van Kooten C, Trouw LA. Production of complement components by cells of the immune system. *Clin Exp Immunol.* 2017,188(2):183-194.
105. Arbore G, Kemper C, Kolev M. Intracellular complement – the complosome – in immune cell regulation. *Mol Immunol.* 2017,89:2-9.
106. Reichhardt MP, Meri S. Intracellular complement activation—An alarm raising mechanism? *Semin Immunol.* 2018.
107. Abu-Humaidan AH, Elvén M, Sonesson A, Garred P, Sørensen OE. Persistent Intracellular *Staphylococcus aureus* in Keratinocytes Lead to Activation of the Complement System with Subsequent Reduction in the Intracellular Bacterial Load. *Frontiers in Immunology.* 2018,9(396).
108. Valdez HA, Oviedo JM, Gorgojo JP, Lamberti Y, Rodriguez ME. *Bordetella pertussis* modulates human macrophage defense gene expression. *Pathog Dis.* 2016,74(6).
109. Frota CC, Papavinasundaram KG, Davis EO, Colston MJ. The AraC family transcriptional regulator Rv1931c plays a role in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2004,72(9):5483-5486.
110. Haine V, Sinon A, Van Steen F, Rousseau S, Dozot M, Lestrade P, Lambert C, Letesson JJ, De Bolle X. Systematic targeted mutagenesis of *Brucella melitensis* 16M reveals a

- major role for GntR regulators in the control of virulence. *Infect Immun.* 2005,73(9):5578-5586.
111. Maddocks SE, Oyston PC. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology.* 2008,154(Pt 12):3609-3623.
 112. Coburn PS, Baghdayan AS, Dolan GT, Shankar N. An AraC-type transcriptional regulator encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island contributes to pathogenesis and intracellular macrophage survival. *Infect Immun.* 2008,76(12):5668-5676.
 113. Jenal U, Reinders A, Lori C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol.* 2017,15(5):271-284.
 114. Hengge R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2009,7(4):263-273.
 115. Galperin MY. A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: Bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol.* 2005,5:35.
 116. Skaar EP. The Battle for Iron between Bacterial Pathogens and Their Vertebrate Hosts. *PLoS Path.* 2010,6(8):e1000949.
 117. Schalk IJ, Guillon L. Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways. *Amino Acids.* 2013,44(5):1267-1277.
 118. Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007,71(3):413-451.
 119. Armstrong SK, Brickman TJ, Suhadolc RJ. Involvement of multiple distinct *Bordetella* receptor proteins in the utilization of iron liberated from transferrin by host catecholamine stress hormones. *Mol Microbiol.* 2012,84(3):446-462.
 120. Brickman TJ, Suhadolc RJ, Armstrong SK. Interspecies variations in *Bordetella* catecholamine receptor gene regulation and function. *Infect Immun.* 2015,83(12):4639-4652.
 121. Marino F, Cosentino M, Bombelli R, Ferrari M, Lecchini S, Frigo G. Endogenous catecholamine synthesis, metabolism storage, and uptake in human peripheral blood mononuclear cells. *Exp Hematol.* 1999,27(3):489-495.
 122. Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang M, Sarma JV, Ward PA. Catecholamines-crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening pandora's box? *Mol Med.* 2008,14(3-4):195-204.
 123. Brown SW, Meyers RT, Brennan KM, Rumble JM, Narasimhachari N, Perozzi EF, Ryan JJ, Stewart JK, Fischer-Stenger K. Catecholamines in a macrophage cell line. *J Neuroimmunol.* 2003,135(1-2):47-55.
 124. Brickman TJ, Cummings CA, Liew SY, Relman DA, Armstrong SK. Transcriptional profiling of the iron starvation response in *Bordetella pertussis* provides new insights into siderophore utilization and virulence gene expression. *J Bacteriol.* 2011,193(18):4798-4812.
 125. Alvarez Hayes J, Erben E, Lamberti Y, Principi G, Maschi F, Ayala M, Rodriguez ME. *Bordetella pertussis* iron regulated proteins as potential vaccine components. *Vaccine.* 2013,31(35):3543-3548.
 126. Brickman TJ, Armstrong SK. Iron and pH-responsive FtrABCD ferrous iron utilization system of *Bordetella* species. *Mol Microbiol.* 2012,86(3):580-593.
 127. Alvarez Hayes J, Erben E, Lamberti Y, Ayala M, Maschi F, Carbone C, Gatti B, Parisi G, Rodriguez ME. Identification of a new protective antigen of *Bordetella pertussis*. *Vaccine.* 2011,29(47):8731-8739.
 128. Banerjee S, Weerasinghe AJ, Parker Siburt CJ, Kreulen RT, Armstrong SK, Brickman TJ, Lambert LA, Crumbliss AL. *Bordetella pertussis* FbpA binds both unchelated iron and iron siderophore complexes. *Biochemistry (Mosc).* 2014,53(24):3952-3960.

129. Vidakovics ML, Paba J, Lamberti Y, Ricart CA, de Sousa MV, Rodriguez ME. Profiling the *Bordetella pertussis* proteome during iron starvation. *J Proteome Res.* 2007,6(7):2518-2528.
130. Belon C, Blanc-Potard AB. Intramacrophage Survival for Extracellular Bacterial Pathogens: MgtC As a Key Adaptive Factor. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016,6:52.
131. Blanc-Potard AB, Lafay B. MgtC as a horizontally-acquired virulence factor of intracellular bacterial pathogens: evidence from molecular phylogeny and comparative genomics. *J Mol Evol.* 2003,57(4):479-486.

Tabla Anexa 1: Proteínas de *B. pertussis* identificadas en las muestras de bacterias extracelulares (Control) y aisladas de localización intracelular (3 h y 48 h post infección). Las proteínas con niveles modificados entre las muestras se encuentran sombreadas. Na = No detectado.

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP0003	<i>parA</i>	ParA family protein	0,91	0,52	0,66	0,78	0,52	0,67	0,86	0,45	0,67
BP0007	<i>tufA</i>	elongation factor Tu	1,55	0,01	0,08	1,11	0,28	0,45	0,72	0,05	0,26
BP0009	<i>nusG</i>	transcription antitermination protein NusG	0,97	0,80	0,90	1,09	0,87	0,92	1,12	0,78	0,88
BP0010	<i>rplK</i>	50S ribosomal protein L11	2,26	0,04	0,13	0,65	0,08	0,21	0,29	0,01	0,17
BP0011	<i>rplA</i>	50S ribosomal protein L1	1,97	0,02	0,09	1,21	0,36	0,53	0,61	0,04	0,26
BP0013	<i>rplJ</i>	50S ribosomal protein L10	2,78	0,01	0,06	1,56	0,07	0,19	0,56	0,00	0,13
BP0014	<i>rplL</i>	50S ribosomal protein L7/L12	2,41	0,00	0,03	1,18	0,74	0,83	0,49	0,05	0,26
BP0015	<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase beta subunit	2,78	0,02	0,08	1,41	0,05	0,16	0,51	0,04	0,26
BP0016	<i>rpoC</i>	DNA-directed RNA polymerase beta' subunit	1,05	0,85	0,92	0,59	0,14	0,30	0,56	0,38	0,63
BP0034	<i>glyS</i>	glycyl-tRNA synthetase beta chain	0,86	0,22	0,38	0,37	0,03	0,13	0,43	0,05	0,26
BP0038	<i>gloA</i>	lactoylglutathione lyase	0,70	0,58	0,71	2,21	0,01	0,06	3,16	0,04	0,26
BP0047	<i>metX</i>	homoserine O-acetyltransferase	2,35	0,01	0,08	OFF	na	na	OFF	na	na
BP0074	<i>htpG</i>	heat shock protein 90	0,41	0,02	0,10	0,69	0,17	0,33	1,66	0,25	0,51
BP0091	<i>bplC</i>	lipopolysaccharide biosynthesis protein	1,01	0,92	0,96	1,08	0,19	0,35	1,06	0,27	0,53
BP0101	<i>BP0101</i>	B hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0102	<i>BP0102</i>	putative penicillin-binding protein precursor	1,40	0,01	0,07	0,18	0,01	0,09	0,13	0,00	0,17
BP0103	<i>BP0103</i>	probable class IV aminotransferase	0,69	0,04	0,13	0,49	0,11	0,26	0,71	0,31	0,56
BP0112	<i>metC</i>	cystathionine beta-lyase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0113	<i>dsbA</i>	thiol:disulfide interchange protein DsbA precursor	0,55	0,03	0,10	0,84	0,73	0,83	1,51	0,13	0,37
BP0115	<i>argS</i>	arginyl-tRNA synthetase	0,24	0,08	0,21	0,18	0,00	0,04	0,77	0,92	0,96
BP0116	<i>BP0116</i>	hypothetical protein	0,56	0,03	0,10	1,11	0,65	0,78	2,00	0,01	0,22
BP0117	<i>BP0117</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0139	<i>ilvA</i>	threonine dehydratase	0,91	0,66	0,78	2,36	0,03	0,14	2,60	0,03	0,26
BP0169	<i>BP0169</i>	hypothetical protein	0,70	0,86	0,92	2,40	0,15	0,32	3,43	0,28	0,53
BP0170	<i>rhIE</i>	putative ATP-dependent RNA helicase	4,84	0,05	0,14	3,35	0,18	0,35	0,69	0,41	0,65
BP0172	<i>prfC</i>	peptide chain release factor 3	1,57	0,18	0,34	1,48	0,07	0,20	0,94	0,94	0,96
BP0174	<i>bfr</i>	bacterioferritin	0,65	0,82	0,91	2,44	0,12	0,28	3,73	0,23	0,49
BP0176	<i>BP0176</i>	pseudogene	ON	na	na	ON	na	na	0,76	0,73	0,85
BP0180	<i>metG</i>	methionyl-tRNA synthetase	0,61	0,44	0,59	0,49	0,12	0,28	0,79	0,26	0,51
BP0183	<i>BP0183</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	0,90	0,92	0,96

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP0185	<i>dcd</i>	deoxycytidine triphosphate deaminase	2,02	0,01	0,05	2,15	0,06	0,18	1,06	1,00	1,00
BP0190	<i>BP0190</i>	probable orn/arg/lys decarboxylase	0,44	0,00	0,03	0,20	na	na	0,44	na	na
BP0195	<i>gcvT</i>	aminomethyltransferase	0,90	0,21	0,36	1,36	0,05	0,16	1,51	0,02	0,25
BP0196	<i>gcvH</i>	glycine cleavage system H protein	OFF	na	na	1,13	0,03	0,13	ON	na	na
BP0197	<i>gcvP</i>	glycine dehydrogenase	1,47	0,20	0,35	0,31	0,03	0,14	0,21	0,02	0,23
BP0205	<i>BP0205</i>	hypothetical protein	1,14	0,29	0,44	0,59	0,08	0,22	0,52	0,06	0,29
BP0206	<i>thiC</i>	thiamine biosynthesis protein ThiC	2,99	0,02	0,08	6,07	0,02	0,11	2,03	0,32	0,57
BP0208	<i>BP0208</i>	putative oxidoreductase	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na
BP0215	<i>ppc</i>	phosphoenolpyruvate carboxylase	ON	na	na		na	na	OFF	na	na
BP0216	<i>sphB1</i>	autotransporter subtilisin-like protease	1,04	0,75	0,87	0,78	0,44	0,60	0,75	0,06	0,29
BP0223	<i>catC2</i>	methylmuconolactone isomerase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0225	<i>catD2</i>	3-oxoadipate enol-lactone hydrolase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0240	<i>BP0240</i>	hypothetical protein	0,47	0,18	0,34	1,02	0,97	0,98	2,18	0,25	0,50
BP0242	<i>purM</i>	phosphoribosylaminoimidazole synthetase	0,51	0,10	0,23	0,98	0,75	0,84	1,90	0,22	0,48
BP0246	<i>amiC</i>	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	OFF	na	na	5,39	0,09	0,23	ON	na	na
BP0250	<i>BP0250</i>	hypothetical protein	0,20	0,01	0,08	0,66	0,07	0,20	3,34	0,04	0,26
BP0264	<i>apt</i>	adenine phosphoribosyltransferase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0274	<i>sspA</i>	stringent starvation protein A	0,13	0,01	0,08	0,96	0,75	0,84	7,55	0,03	0,25
BP0277	<i>petA</i>	ubiquinol-cytochrome C reductase iron-sulfur subunit	1,28	0,25	0,41	0,61	0,64	0,78	0,48	0,37	0,63
BP0279	<i>BP0279</i>	hypothetical protein	0,77	0,23	0,38	0,95	0,65	0,78	1,23	0,42	0,65
BP0289	<i>ilvD</i>	dihydroxy-acid dehydratase	0,86	0,20	0,35	0,62	0,01	0,09	0,72	0,06	0,29
BP0314	<i>BP0314</i>	hypothetical protein	ON	na	na		na	na	OFF	na	na
BP0315	<i>hemL</i>	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	0,99	0,90	0,96	0,68	0,25	0,42	0,68	0,30	0,55
BP0346	<i>bhuS</i>	putative hemin transport protein	2,15	0,32	0,49	2,13	0,16	0,32	0,99	0,88	0,95
BP0360	<i>BP0360</i>	probable aldehyde dehydrogenase	ON	na	na	ON	na	na	0,78	0,54	0,74
BP0368	<i>gdhA</i>	glutamate dehydrogenase	1,01	0,92	0,96	0,97	0,84	0,90	0,96	0,97	0,98
BP0369	<i>BP0369</i>	putative endonuclease	1,10	0,48	0,63	1,07	0,14	0,30	0,98	0,84	0,93
BP0371	<i>gatB</i>	aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit B	0,23	0,04	0,13	0,27	0,01	0,09	1,17	0,70	0,84
BP0372	<i>gatA</i>	glutamyl-tRNA amidotransferase subunit A	0,63	0,42	0,58	0,60	0,18	0,35	0,95	0,34	0,58
BP0374	<i>mreB</i>	rod shape-determining protein	1,39	0,14	0,28	0,94	0,68	0,81	0,68	0,07	0,29
BP0379	<i>ldh</i>	putative L-lactate dehydrogenase	0,82	0,36	0,53	0,66	0,00	0,05	0,80	0,58	0,76
BP0383	<i>argB</i>	acetylglutamate kinase	1,23	0,84	0,92	0,35	0,04	0,15	0,28	0,58	0,76
BP0385	<i>BP0385</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	0,48	0,72	0,82	ON	na	na

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP0387	<i>BP0387</i>	hypothetical protein	1,00	0,92	0,96	1,19	0,62	0,77	1,19	0,63	0,79
BP0390	<i>BP0390</i>	putative tetrapyrrole methylase	0,80	0,56	0,69	1,08	0,26	0,43	1,36	0,12	0,35
BP0410	<i>BP0410</i>	putative universal stress protein	1,13	0,82	0,91	1,69	0,05	0,17	1,49	0,23	0,49
BP0413	<i>fusA'</i>	pseudogene	1,14	0,60	0,73	2,90	0,12	0,28	2,55	0,14	0,38
BP0421	<i>BP0421</i>	putative acyl-CoA dehydrogenase		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP0441	<i>BP0441</i>	MerR-family transcriptional regulator	1,09	0,73	0,85	OFF	na	na	OFF	na	na
BP0445	<i>aceK</i>	pseudogene	2,11	0,02	0,08	6,68	0,00	0,05	3,16	0,04	0,26
BP0451	<i>argM</i>	bifunctional N-succinyldiaminopimelate-aminotransferase/acetylornithine transaminase protein	1,12	0,48	0,63	0,91	0,55	0,70	0,81	0,42	0,65
BP0454	<i>BP0454</i>	hypothetical protein	0,51	0,05	0,15	0,72	0,17	0,33	1,40	0,22	0,48
BP0460	<i>topB</i>	DNA topoisomerase III	1,04	0,75	0,86	0,42	0,62	0,77	0,40	0,18	0,42
BP0465	<i>BP0465</i>	probable aldehyde dehydrogenase	0,23	0,00	0,02	0,32	0,04	0,15	1,41	0,04	0,26
BP0475	<i>rne</i>	ribonuclease E	1,16	0,89	0,94	1,18	0,79	0,87	1,02	0,77	0,87
BP0489	<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit B	1,27	0,46	0,61	0,60	0,32	0,49	0,47	0,10	0,34
BP0490	<i>dnaN</i>	DNA polymerase III subunit beta	0,38	0,09	0,21	0,88	0,13	0,28	2,34	0,15	0,40
BP0499	<i>BP0499</i>	hypothetical protein	0,74	0,02	0,08	0,72	0,47	0,62	0,97	0,06	0,29
BP0506	<i>BP0506</i>	phage-related hypothetical protein	1,42	0,76	0,88	1,66	0,05	0,16	1,17	0,38	0,63
BP0513	<i>BP0513</i>	phage-related hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	3,38	0,23	0,49
BP0516	<i>BP0516</i>	hypothetical protein	0,66	0,26	0,42	OFF	na	na	OFF	na	na
BP0529	<i>BP0529</i>	autotransporter	0,75	0,41	0,57	0,39	0,23	0,40	0,52	0,86	0,94
BP0532	<i>BP0532</i>	putative substrate-CoA ligase	ON	na	na	ON	na	na	3,84	0,28	0,53
BP0535	<i>BP0535</i>	probable carboxymuconolactone decarboxylase	0,85	0,93	0,96	2,45	0,08	0,21	2,89	0,02	0,22
BP0551	<i>fnt</i>	methionyl-tRNA formyltransferase	0,57	0,53	0,67	0,79	0,62	0,77	1,39	0,56	0,75
BP0558	<i>BP0558</i>	amino acid-binding periplasmic protein	0,37	0,00	0,04	0,51	0,00	0,02	1,38	0,11	0,35
BP0561	<i>BP0561</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0570	<i>BP0570</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0572	<i>BP0572</i>	putative two-component response regulator	1,25	0,18	0,33	0,95	0,70	0,82	0,76	0,28	0,53
BP0573	<i>trkA</i>	Trk system potassium uptake protein	0,43	0,14	0,28	0,95	0,86	0,91	2,19	0,06	0,29
BP0604	<i>secB</i>	export protein SecB	0,38	0,02	0,08	0,18	0,00	0,05	0,47	0,07	0,31
BP0607	<i>gpmA</i>	phosphoglyceromutase	0,11	0,00	0,02	0,36	0,00	0,05	3,16	0,04	0,26
BP0609	<i>ctpA</i>	putative carboxy-terminal processing protease precursor	2,99	0,01	0,08	0,74	0,31	0,49	0,25	0,00	0,17
BP0614	<i>BP0614</i>	pseudogene	ON	na	na	ON	na	na	1,83	0,45	0,68
BP0617	<i>BP0617</i>	TetR-family transcriptional regulator	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP0624	<i>BP0624</i>	acyl-CoA synthase	0,54	0,09	0,21	1,76	0,01	0,07	3,29	0,02	0,23
BP0627	<i>BP0627</i>	probable enoyl-CoA hydratase/isomerase	0,33	0,01	0,06	0,32	0,00	0,02	0,94	0,94	0,96
BP0628	<i>BP0628</i>	putative pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit	0,73	0,61	0,73	0,52	0,42	0,57	0,71	0,16	0,40
BP0629	<i>pdhA</i>	putative pyruvate dehydrogenase E1 component, alpha subunit	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0649	<i>BP0649</i>	hypothetical protein		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP0659	<i>BP0659</i>	probable zinc-binding dehydrogenase	0,44	0,10	0,22	0,77	0,30	0,47	1,73	0,28	0,53
BP0665	<i>BP0665</i>	thymidine diphosphoglucose 4,6-dehydratase	0,35	0,05	0,15	OFF	na	na	OFF	na	na
BP0666	<i>glmS</i>	D-fructose-6-phosphate amidotransferase	0,79	0,44	0,60	0,94	0,72	0,82	1,19	0,94	0,96
BP0670	<i>BP0670</i>	probable acyl-CoA dehydrogenase	ON	na	na	ON	na	na	2,22	0,29	0,54
BP0690	<i>BP0690</i>	hypothetical protein	0,58	0,14	0,28	1,30	0,43	0,58	2,24	0,06	0,29
BP0693	<i>BP0693</i>	HPr kinase/phosphorylase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0694	<i>rpoP</i>	nitrogen regulatory IIA protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0696	<i>rpoN</i>	pseudogene	OFF	na	na	3,81	0,01	0,08	ON	na	na
BP0697	<i>BP0697</i>	ABC transporter	0,92	0,49	0,64	0,49	0,19	0,35	0,53	0,35	0,60
BP0698	<i>BP0698</i>	hypothetical protein	1,30	0,58	0,71	0,92	0,19	0,35	0,71	0,73	0,85
BP0700	<i>BP0700</i>	probable hydrolase	0,17	0,00	0,04	0,26	0,01	0,07	1,48	0,14	0,38
BP0705	<i>BP0705</i>	pseudogene	11,14	0,01	0,07	11,90	0,00	0,01	1,07	0,64	0,80
BP0709	<i>aspS</i>	aspartyl-tRNA synthetase	0,69	0,20	0,36	0,89	0,05	0,16	1,29	0,32	0,57
BP0718	<i>BP0718</i>	carboxyvinyl-carboxyphosphonate phosphorylmutase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0744	<i>BP0744</i>	putative transcriptional regulator	ON	na	na	ON	na	na	0,71	0,73	0,85
BP0746	<i>proB</i>	gamma-glutamyl kinase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0747	<i>BP0747</i>	probable GTP-binding protein	1,11	0,27	0,43	0,57	0,23	0,40	0,51	0,17	0,42
BP0748	<i>rpmA</i>	50S ribosomal protein L27	4,31	0,01	0,06	10,51	0,00	0,05	2,44	0,13	0,37
BP0751	<i>ispB</i>	octaprenyl-diphosphate synthase	OFF	na	na	1,01	0,37	0,53	ON	na	na
BP0753	<i>hyuA</i>	putative hydantoin utilization protein A	ON	na	na	ON	na	na	1,95	0,27	0,53
BP0760	<i>cyaA</i>	bifunctional hemolysin-adenylate cyclase precursor	1,35	0,41	0,57	0,69	0,18	0,34	0,51	0,08	0,32
BP0773	<i>BP0773</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	3,16	0,04	0,26
BP0777	<i>BP0777</i>	probable Zinc-binding dehydrogenase	0,52	0,12	0,26	0,30	0,03	0,13	0,59	0,96	0,98
BP0789	<i>ilvI</i>	acetolactate synthase large subunit	0,96	0,67	0,79	1,08	0,10	0,23	1,12	0,29	0,54
BP0791	<i>ilvC</i>	ketol-acid reductoisomerase	1,49	0,06	0,17	1,49	0,10	0,23	1,00	0,97	0,98
BP0794	<i>rpsO</i>	30S ribosomal protein S15	2,79	0,04	0,13	4,96	0,02	0,11	1,78	0,29	0,54
BP0795	<i>pnp</i>	polyribonucleotide nucleotidyltransferase	1,38	0,02	0,09	1,07	0,47	0,62	0,77	0,07	0,30

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP0800	<i>BP0800</i>	probable zinc-binding dehydrogenase	0,46	0,08	0,19	0,86	0,52	0,67	1,88	0,12	0,35
BP0801	<i>tpiA</i>	triosephosphate isomerase	0,14	0,00	0,05	0,50	0,07	0,19	3,71	0,15	0,40
BP0809	<i>argH</i>	pseudogene	1,86	0,19	0,34	1,93	0,10	0,23	1,04	0,82	0,91
BP0816	<i>BP0816</i>	hypothetical protein	0,47	0,02	0,08	1,55	0,24	0,41	3,33	0,13	0,37
BP0822	<i>hyuA</i>	hydantoin utilization protein A	ON	na	na	ON	na	na	2,22	0,10	0,34
BP0827	<i>BP0827</i>	integral membrane component of multidrug efflux system	ON	na	na	ON	na	na	2,80	0,05	0,27
BP0840	<i>BP0840</i>	outer membrane porin protein precursor	1,43	0,27	0,43	2,38	0,00	0,02	1,67	0,09	0,33
BP0842	<i>nuoB</i>	NADH dehydrogenase beta subunit	2,59	0,00	0,05	1,21	0,37	0,53	0,47	0,02	0,22
BP0844	<i>nuoD</i>	NADH dehydrogenase delta subunit	1,60	0,03	0,12	1,67	0,19	0,35	1,05	0,94	0,96
BP0845	<i>nuoE</i>	ATP synthase subunit E	2,28	0,07	0,19	1,60	0,32	0,49	0,70	0,39	0,63
BP0846	<i>nuoF</i>	respiratory-chain NADH dehydrogenase, 51 kDa subunit	0,82	0,39	0,55	0,85	0,52	0,67	1,04	0,88	0,95
BP0847	<i>nuoG</i>	NADH dehydrogenase gamma subunit	1,46	0,00	0,04	0,60	0,00	0,05	0,41	0,00	0,12
BP0856	<i>bfrD</i>	probable TonB-dependent receptor for iron transport	2,30	0,00	0,03	2,31	0,00	0,01	1,01	0,90	0,95
BP0860	<i>BP0860</i>	hypothetical protein	4,43	0,06	0,16	14,14	0,01	0,09	3,19	0,05	0,26
BP0863	<i>serB</i>	phosphoserine phosphatase	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na
BP0906	<i>BP0906</i>	putative peptidase	0,13	0,00	0,03	0,33	0,02	0,11	2,59	0,35	0,60
BP0937	<i>BP0937</i>	hypothetical protein	0,91	0,52	0,66	0,57	0,23	0,40	0,63	0,89	0,95
BP0943	<i>ompA</i>	outer membrane protein A precursor	1,02	0,96	0,98	1,27	0,03	0,13	1,25	0,15	0,40
BP0944	<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A	1,26	0,19	0,34	0,57	0,16	0,32	0,45	0,09	0,34
BP0947	<i>tyrA</i>	prephenate dehydrogenase	1,23	0,20	0,35	0,83	0,41	0,57	0,67	0,41	0,64
BP0950	<i>rpsA</i>	30S ribosomal protein S1	1,94	0,01	0,07	1,05	0,79	0,87	0,54	0,01	0,22
BP0953	<i>BP0953</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na
BP0955	<i>rfaD</i>	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase	1,32	0,08	0,19	1,55	0,05	0,16	1,17	0,43	0,66
BP0958	<i>cysM</i>	cysteine synthase B	0,40	0,06	0,16	0,65	0,10	0,24	1,63	0,81	0,91
BP0959	<i>mltB</i>	membrane-bound lytic murein transglycosylase B precursor	ON	na	na	na	na	na	OFF	na	na
BP0961	<i>etfB</i>	electron transfer flavoprotein beta-subunit	0,97	0,80	0,90	1,75	0,00	0,05	1,80	0,01	0,17
BP0962	<i>etfA</i>	electron transfer flavoprotein alpha-subunit	1,21	0,23	0,39	1,15	0,79	0,88	0,95	0,74	0,85
BP0964	<i>BP0964</i>	probable acyl-CoA dehydrogenase	0,35	0,06	0,16	0,38	0,13	0,28	1,09	0,41	0,64
BP0965	<i>BP0965</i>	antioxidant protein	0,66	0,10	0,22	0,71	0,23	0,40	1,07	0,94	0,96
BP0971	<i>cysN</i>	pseudogene		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP0975	<i>rplS</i>	50S ribosomal protein L19	1,95	0,10	0,23	1,01	0,37	0,53	0,52	0,49	0,70
BP0989	<i>prlC</i>	oligopeptidase A	0,34	0,04	0,12	0,63	0,24	0,40	1,86	0,97	0,98
BP0990	<i>fold</i>	Fold bifunctional protein	1,51	0,35	0,51	1,88	0,18	0,35	1,24	0,65	0,80

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP0991	<i>BP0991</i>	two-component response regulator	0,40	0,04	0,12	0,36	0,09	0,23	0,90	0,45	0,68
BP0993	<i>aceE</i>	pyruvate dehydrogenase E1 component	1,34	0,24	0,39	1,13	0,39	0,55	0,85	0,50	0,71
BP0994	<i>aceF</i>	dihydrolipoamide acetyltransferase	1,03	0,88	0,94	1,11	0,64	0,78	1,08	0,74	0,85
BP0995	<i>lpdA</i>	dihydrolipoamide dehydrogenase	1,25	0,01	0,07	1,35	0,06	0,17	1,08	0,57	0,75
BP0999	<i>tktA</i>	transketolase	0,75	0,19	0,34	0,51	0,03	0,12	0,68	0,19	0,44
BP1000	<i>gap</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,80	0,39	0,55	0,47	0,10	0,25	0,59	0,57	0,75
BP1001	<i>pgk</i>	phosphoglycerate kinase	0,31	0,01	0,06	0,46	0,04	0,15	1,47	0,39	0,63
BP1005	<i>BP1005</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	3,02	0,38	0,63
BP1011	<i>cbpA</i>	curved DNA-binding protein	1,28	0,27	0,43	2,04	0,06	0,17	1,60	0,08	0,32
BP1038	<i>corC</i>	magnesium and cobalt efflux protein	0,78	0,40	0,56	0,76	0,53	0,68	0,98	0,32	0,57
BP1040	<i>BP1040</i>	PhoH-like protein	1,43	0,24	0,40	1,02	0,60	0,75	0,71	0,92	0,96
BP1046	<i>secD</i>	protein export protein SecD	2,59	0,02	0,08	4,32	0,01	0,08	1,67	0,85	0,93
BP1047	<i>BP1047</i>	putative secreted protein	0,91	0,52	0,66	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1052	<i>upp</i>	uracil phosphoribosyltransferase	1,40	0,55	0,69	0,59	0,45	0,60	0,42	0,50	0,71
BP1054	<i>prn</i>	pertactin precursor	0,47	0,04	0,12	0,63	0,04	0,15	1,34	0,30	0,55
BP1057	<i>BP1057</i>	hypothetical protein	2,55	0,03	0,11	2,39	0,01	0,07	0,94	0,94	0,96
BP1064	<i>maeB</i>	phosphate acetyltransferase	0,37	0,01	0,07	0,98	0,71	0,82	2,66	0,54	0,74
BP1066	<i>BP1066</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1072	<i>ppk</i>	polyphosphate kinase	2,40	0,00	0,04	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1075	<i>mrsA</i>	phosphoglucomutase/phosphomannomutase	1,47	0,00	0,04	0,92	0,60	0,75	0,63	0,15	0,40
BP1077	<i>ftsH</i>	cell division protein	0,41	0,28	0,44	1,48	0,12	0,28	3,63	0,08	0,32
BP1087	<i>BP1087</i>	hypothetical protein	1,59	0,03	0,12	2,82	0,00	0,04	1,78	0,01	0,22
BP1092	<i>BP1092</i>	probable two-component histidine kinase	9,67	0,00	0,04	37,65	0,02	0,11	3,89	0,10	0,34
BP1097	<i>livK</i>	putative amino acids binding protein	ON	na	na	ON	na	na	1,43	0,75	0,86
BP1102	<i>lysS</i>	lysyl-tRNA synthetase	1,11	0,76	0,87	0,40	0,03	0,13	0,36	0,11	0,35
BP1105	<i>recJ</i>	single-stranded-DNA-specific exonuclease	1,63	0,22	0,37	1,09	0,62	0,77	0,67	0,20	0,45
BP1110	<i>sphB3</i>	serine protease	2,39	0,00	0,04	5,58	0,03	0,13	2,34	0,12	0,35
BP1112	<i>bipA</i>	putative outer membrane ligand binding protein	1,30	0,03	0,12	0,58	0,04	0,14	0,44	0,01	0,22
BP1116	<i>BP1116</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1117	<i>greB</i>	transcription elongation factor GreB	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1119	<i>fim2</i>	serotype 2 fimbrial subunit precursor	2,04	0,35	0,52	1,33	0,91	0,95	0,65	0,56	0,75
BP1120	<i>maeB</i>	phosphate acetyltransferase	0,99	0,82	0,91	1,03	0,69	0,81	1,04	0,73	0,85
BP1124	<i>odhA</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	1,54	0,12	0,25	1,28	0,01	0,07	0,83	0,51	0,72

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP1125	<i>odhB</i>	dihydrolipoamide acetyltransferase	1,65	0,03	0,10	1,42	0,01	0,08	0,86	0,39	0,63
BP1126	<i>odhL</i>	dihydrolipoamide dehydrogenase	1,41	0,04	0,12	1,52	0,14	0,29	1,08	0,85	0,93
BP1149	<i>phbC</i>	poly-beta-hydroxybutyrate polymerase	1,38	0,40	0,56	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1150	<i>phbB</i>	acetoacetyl-CoA reductase	0,79	0,34	0,51	1,03	0,86	0,91	1,31	0,31	0,56
BP1151	<i>BP1151</i>	hypothetical protein	0,67	0,16	0,31	0,38	0,00	0,05	0,57	0,16	0,40
BP1163	<i>BP1163</i>	probable short-chain dehydrogenase	0,73	0,30	0,46	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1189	<i>BP1189</i>	lipoprotein	0,99	0,85	0,92	0,42	0,00	0,03	0,42	0,01	0,22
BP1192	<i>BP1192</i>	hypothetical protein	1,08	0,99	1,00	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1198	<i>clpB</i>	ATP-dependent protease, ATPase subunit	1,18	0,20	0,36	1,67	0,00	0,01	1,42	0,03	0,25
BP1201	<i>tcfA</i>	tracheal colonization factor precursor	0,71	0,17	0,32	1,15	0,45	0,60	1,62	0,09	0,34
BP1204	<i>BP1204</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	0,59	0,95	0,97	ON	na	na
BP1207	<i>BP1207</i>	N-acyl-D-glutamate deacylase	ON	na	na	ON	na	na	1,50	0,06	0,29
BP1222	<i>BP1222</i>	short chain dehydrogenase	0,44	0,00	0,05	0,43	0,09	0,22	0,97	0,06	0,29
BP1223	<i>BP1223</i>	hypothetical protein	0,74	0,79	0,89	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1232	<i>BP1232</i>	50S ribosomal protein L31	1,34	0,40	0,56	0,74	0,09	0,23	0,55	0,12	0,36
BP1237	<i>lytB</i>	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na
BP1238	<i>BP1238</i>	putative glutathione-S-transferase	0,73	0,29	0,44	0,74	0,16	0,32	1,01	0,83	0,92
BP1241	<i>BP1241</i>	hypothetical protein		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP1243	<i>BP1243</i>	hypothetical protein	0,50	0,01	0,08	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1245	<i>BP1245</i>	hypothetical protein	1,57	0,18	0,34	1,89	0,04	0,14	1,21	0,47	0,69
BP1246	<i>nusA</i>	transcription elongation factor NusA	1,72	0,00	0,03	1,31	0,45	0,60	0,76	0,26	0,51
BP1247	<i>infB</i>	translation initiation factor IF-2	2,25	0,00	0,03	0,87	0,49	0,64	0,39	0,05	0,27
BP1250	<i>typA</i>	GTP-binding elongation factor	0,84	0,21	0,36	0,89	0,33	0,50	1,06	0,74	0,85
BP1251	<i>BP1251</i>	putative toxin	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na
BP1252	<i>BP1252</i>	hypothetical protein	0,60	0,94	0,97	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1258	<i>sdaA</i>	L-serine dehydratase 1	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na
BP1260	<i>glnE</i>	glutamate-ammonia-ligase adenylyltransferase	ON	na	na	ON	na	na	1,50	0,82	0,91
BP1262	<i>rho</i>	transcription termination factor Rho	1,48	0,01	0,07	0,95	0,64	0,78	0,64	0,01	0,17
BP1263	<i>trxA</i>	thioredoxin 1	0,60	0,12	0,25	1,51	0,26	0,44	2,53	0,04	0,26
BP1264	<i>parE</i>	DNA topoisomerase IV subunit B	0,67	0,94	0,97	1,82	0,31	0,48	2,72	0,43	0,66
BP1266	<i>parC</i>	DNA topoisomerase IV subunit A	2,38	0,91	0,96	3,05	0,28	0,45	1,28	0,50	0,71
BP1274	<i>livG</i>	high-affinity branched-chain amino acid transport	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na
BP1277	<i>livJ</i>	leu/ile/val-binding protein precursor	OFF	na	na	0,41	0,00	0,03	ON	na	na

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP1281	<i>ugpB</i>	glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein precursor	0,15	0,00	0,04	0,29	0,01	0,07	1,89	0,15	0,40
BP1299	<i>BP1299</i>	putative acetyltransferase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1300	<i>BP1300</i>	putative glutathione transferase	0,29	0,00	0,04	0,65	0,17	0,33	2,19	0,53	0,73
BP1307	<i>BP1307</i>	putative bacterioferritin comigratory protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1315	<i>BP1315</i>	universal stress family protein	1,27	0,67	0,79	2,02	0,11	0,25	1,58	0,25	0,50
BP1320	<i>BP1320</i>	hypothetical protein	0,97	0,03	0,11	0,76	0,40	0,56	0,78	0,34	0,59
BP1324	<i>malQ</i>	pseudogene	ON	na	na		na	na	OFF	na	na
BP1327	<i>glgX</i>	probable glycosyl hydrolase	ON	na	na	ON	na	na	3,52	0,05	0,26
BP1340	<i>BP1340</i>	hypothetical protein		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP1355	<i>BP1355</i>	probable LacI-family transcriptional regulator	ON	na	na	ON	na	na	5,81	0,01	0,17
BP1357	<i>leuC</i>	pseudogene		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP1359	<i>BP1359</i>	putative mandelate racemase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1360	<i>BP1360</i>	putative ketopantoate reductase	0,94	0,62	0,74	0,63	0,71	0,82	0,67	0,92	0,96
BP1364	<i>BP1364</i>	putative amino-acid ABC transporter	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1410	<i>fliD</i>	flagellar hook-associated protein 2	ON	na	na	ON	na	na	1,97	0,11	0,35
BP1415	<i>purF</i>	amidophosphoribosyltransferase	1,08	0,49	0,64	0,31	0,09	0,23	0,29	0,08	0,32
BP1418	<i>map</i>	methionine aminopeptidase	0,98	0,99	1,00	0,96	0,86	0,91	0,97	0,83	0,92
BP1419	<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	2,03	0,01	0,06	1,01	0,90	0,93	0,50	0,05	0,26
BP1420	<i>tsf</i>	elongation factor Ts	0,37	0,01	0,06	0,65	0,08	0,20	1,76	0,10	0,34
BP1421	<i>pyrH</i>	uridylate kinase	1,25	0,34	0,50	2,19	0,00	0,01	1,75	0,03	0,25
BP1422	<i>frr</i>	ribosome releasing factor	1,01	0,92	0,96	2,70	0,02	0,12	2,67	0,04	0,26
BP1425	<i>dxr</i>	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	OFF	na	na	0,62	0,84	0,90	ON	na	na
BP1427	<i>BP1427</i>	probable surface antigen	1,60	0,00	0,03	0,90	0,22	0,38	0,56	0,00	0,13
BP1428	<i>BP1428</i>	putative outer membrane protein	1,34	0,25	0,41	0,98	0,82	0,89	0,73	0,23	0,49
BP1429	<i>lpxD</i>	UDP-3-O-	0,66	0,27	0,43	0,30	0,06	0,18	0,45	0,52	0,72
BP1435	<i>BP1435</i>	hypothetical protein	1,19	0,49	0,64	1,71	0,00	0,02	1,43	0,11	0,35
BP1436	<i>ppsA</i>	phosphoenolpyruvate synthase	1,19	0,13	0,26	0,87	0,37	0,53	0,73	0,08	0,31
BP1440	<i>BP1440</i>	hypothetical protein	0,79	0,41	0,57	0,64	0,14	0,30	0,81	0,64	0,79
BP1445	<i>BP1445</i>	probable acyl-CoA dehydrogenase	0,43	0,10	0,22	0,76	0,36	0,53	1,74	0,92	0,96
BP1446	<i>BP1446</i>	enoly-CoA hydratase	OFF	na	na	0,31	0,02	0,12	ON	na	na
BP1452	<i>carA</i>	carbamoyl-phosphate synthase small subunit	0,56	0,10	0,23	0,52	0,44	0,59	0,94	0,73	0,85
BP1453	<i>carB</i>	carbamoyl-phosphate synthase large subunit	0,51	0,06	0,16	0,35	0,01	0,08	0,69	0,39	0,63
BP1456	<i>BP1456</i>	LysR-family transcriptional regulator		na	na	ON	na	na	ON	na	na

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP1462	<i>aroC</i>	chorismate synthase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1465	<i>moeA</i>	molybdopterin biosynthesis protein	0,42	0,21	0,36	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1466	<i>moba</i>	molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein A	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1467	<i>BP1467</i>	putative iron sulfur binding protein	0,45	0,36	0,53	0,25	0,02	0,10	0,55	0,65	0,80
BP1480	<i>BP1480</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1482	<i>leuD</i>	isopropylmalate isomerase small subunit	2,10	0,06	0,16	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1484	<i>asd</i>	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	0,41	0,04	0,12	0,74	0,09	0,23	1,78	0,13	0,37
BP1485	<i>BP1485</i>	hypothetical protein	1,21	0,83	0,91	0,49	0,02	0,11	0,41	0,11	0,35
BP1487	<i>smoM</i>	putative periplasmic solute-binding protein	0,48	0,04	0,13	0,89	0,46	0,61	1,85	0,10	0,34
BP1492	<i>BP1492</i>	hypothetical protein		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP1497	<i>thrS</i>	threonyl-tRNA synthetase	1,43	0,02	0,09	0,38	0,05	0,16	0,27	0,02	0,23
BP1498	<i>infC</i>	translation initiation factor IF-3	1,96	0,03	0,10	1,61	0,06	0,17	0,82	0,28	0,53
BP1499	<i>gshB</i>	glutathione synthetase	1,22	0,09	0,21	1,36	0,23	0,40	1,11	0,70	0,84
BP1502	<i>ptsI</i>	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1506	<i>BP1506</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1519	<i>fba</i>	fructose-bisphosphate aldolase	0,70	0,28	0,44	1,49	0,03	0,14	2,12	0,10	0,34
BP1521	<i>hemH</i>	p-ribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	OFF	na	na	0,32	0,14	0,30	ON	na	na
BP1526	<i>purE</i>	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit	1,74	0,59	0,71	1,61	0,45	0,60	0,92	1,00	1,00
BP1531	<i>BP1531</i>	putative arginase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1535	<i>BP1535</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	0,59	0,87	0,92	ON	na	na
BP1537	<i>gcdH</i>	glutaryl-CoA dehydrogenase	0,96	0,76	0,88	0,47	0,01	0,09	0,50	0,04	0,26
BP1538	<i>ilvG</i>	acetolactate synthase II large subunit	0,77	0,14	0,28	1,08	0,77	0,85	1,40	0,18	0,43
BP1547	<i>BP1547</i>	hypothetical protein	2,41	0,02	0,10	8,12	0,00	0,02	3,38	0,10	0,34
BP1549	<i>dnaX</i>	DNA polymerase III subunits gamma and tau	0,57	0,59	0,72	1,70	0,23	0,40	3,00	0,26	0,52
BP1550	<i>BP1550</i>	hypothetical protein	1,05	0,20	0,36	1,61	0,06	0,17	1,54	0,10	0,34
BP1555	<i>BP1555</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1561	<i>BP1561</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1569	<i>BP1569</i>	putative lipoprotein	0,85	0,43	0,58	0,69	0,16	0,33	0,81	0,56	0,75
BP1570	<i>dapA</i>	dihydrodipicolinate synthase	0,55	0,00	0,05	1,17	0,40	0,56	2,13	0,18	0,43
BP1573	<i>glnH</i>	glutamine ABC transporter periplasmic-binding protein	0,34	0,02	0,08	0,59	0,16	0,32	1,72	0,36	0,61
BP1575	<i>glnQ</i>	glutamine ABC transporter ATP-binding component	1,24	0,63	0,76	0,55	0,05	0,16	0,45	0,07	0,30
BP1577	<i>rpoZ</i>	DNA-directed RNA polymerase omega subunit	1,01	0,92	0,96	0,72	0,72	0,82	0,71	0,73	0,85
BP1578	<i>gmK</i>	guanylate kinase	1,01	0,83	0,91	OFF	na	na	OFF	na	na

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP1579	<i>BP1579</i>	putative cytochrome C	ON	na	na	ON	na	na	0,85	0,09	0,34
BP1583	<i>amn</i>	AMP nucleosidase	0,42	0,32	0,49	1,30	0,12	0,28	3,08	0,02	0,22
BP1590	<i>BP1590</i>	probable transcriptional regulator	OFF	na	na	1,71	0,05	0,16	ON	na	na
BP1592	<i>BP1592</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	1,30	0,61	0,78
BP1596	<i>glnA</i>	glutamine synthetase	1,03	0,98	1,00	0,58	0,02	0,11	0,56	0,07	0,30
BP1601	<i>BP1601</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na
BP1605	<i>BP1605</i>	putative iron binding protein	0,24	0,04	0,13	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1608	<i>BP1608</i>	pseudogene	ON	na	na	ON	na	na	3,27	0,15	0,40
BP1613	<i>BP1613</i>	probable LysR-family transcriptional regulator	0,33	0,10	0,22	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1616	<i>dps</i>	putative DNA-binding protein	1,43	0,02	0,09	1,67	0,03	0,13	1,17	0,35	0,60
BP1625	<i>kpsE</i>	capsule polysaccharide export inner-membrane protein	ON	na	na	ON	na	na	4,35	0,08	0,32
BP1628	<i>wza</i>	putative capsular polysaccharide export protein	ON	na	na	ON	na	na	2,15	0,10	0,34
BP1630	<i>wbpP</i>	capsular polysaccharide biosynthesis protein	0,86	0,19	0,35	0,76	0,03	0,13	0,89	0,28	0,53
BP1642	<i>BP1642</i>	pseudogene	ON	na	na	ON	na	na	2,47	na	na
BP1664	<i>gst</i>	glutathione S-transferase	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na
BP1698	<i>BP1698</i>	hypothetical protein	0,88	0,45	0,61	1,62	0,02	0,10	1,83	0,19	0,44
BP1706	<i>BP1706</i>	probable ATP-binding ABC transporter protein	OFF	na	na	2,29	0,14	0,30	ON	na	na
BP1721	<i>BP1721</i>	putative peptidase	0,90	0,26	0,42	0,87	0,31	0,48	0,97	0,79	0,88
BP1722	<i>BP1722</i>	hypothetical protein	0,43	0,08	0,20	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1723	<i>BP1723</i>	hypothetical protein	1,11	0,27	0,43	3,46	0,00	0,01	3,12	0,00	0,13
BP1728	<i>BP1728</i>	putative glutaredoxin	0,73	0,95	0,97	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1730	<i>BP1730</i>	hypothetical protein	1,56	0,28	0,44	2,13	0,16	0,32	1,36	0,12	0,35
BP1731	<i>ugpQ</i>	cytoplasmic glycerophosphodiester phosphodiesterase	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na
BP1732	<i>ppiD</i>	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	1,08	0,58	0,71	0,24	0,01	0,07	0,22	0,00	0,17
BP1744	<i>BP1744</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	2,01	0,27	0,53
BP1751	<i>dfp</i>	phosphopantothenoylcysteine synthase/decarboxylase	1,03	0,32	0,49	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1753	<i>ileS</i>	isoleucyl-tRNA synthetase	0,38	0,09	0,21	0,28	0,13	0,28	0,76	0,66	0,80
BP1759	<i>uvrD</i>	DNA helicase II	0,77	0,67	0,79	1,31	0,26	0,43	1,70	0,55	0,75
BP1760	<i>BP1760</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	1,80	0,26	0,51
BP1764	<i>dapD</i>	tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase	0,63	0,70	0,82	0,56	0,06	0,17	0,89	0,33	0,58
BP1766	<i>BP1766</i>	hypothetical protein	3,80	0,00	0,05	2,59	0,02	0,10	0,68	0,03	0,25
BP1770	<i>cspA</i>	cold shock-like protein	0,53	0,13	0,26	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1774	<i>tig</i>	trigger factor	0,88	0,54	0,68	0,80	0,29	0,47	0,91	0,91	0,95

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP1775	<i>clpP</i>	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	0,82	0,46	0,61	0,78	0,33	0,49	0,94	0,97	0,98
BP1776	<i>clpX</i>	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	1,60	0,12	0,26	0,68	0,32	0,49	0,43	0,07	0,30
BP1777	<i>lon</i>	ATP-dependent protease La	1,10	0,88	0,94	0,53	0,02	0,11	0,49	0,07	0,30
BP1779	<i>BP1779</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	3,33	0,01	0,17
BP1787	<i>BP1787</i>	pseudogene	4,50	0,02	0,10	11,59	0,01	0,09	2,58	0,02	0,23
BP1795	<i>tyrB</i>	aspartate aminotransferase	0,52	0,05	0,15	0,67	0,27	0,44	1,28	0,78	0,88
BP1799	<i>iscS</i>	cysteine desulfurase	1,25	0,81	0,91	1,05	0,73	0,83	0,84	0,96	0,98
BP1806	<i>BP1806</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na
BP1817	<i>ascD</i>	CDP-6-deoxy-delta-3,4-glucoseen reductase	1,05	0,73	0,85	0,32	0,13	0,29	0,31	0,03	0,25
BP1818	<i>dadA</i>	D-amino acid dehydrogenase small subunit	1,23	0,55	0,69	0,38	0,12	0,28	0,31	0,10	0,34
BP1832	<i>BP1832</i>	pseudogene	ON	na	na	ON	na	na	1,04	0,91	0,95
BP1836	<i>alaS</i>	alanyl-tRNA synthetase	0,87	0,50	0,64	1,00	0,92	0,95	1,15	0,55	0,75
BP1838	<i>BP1838</i>	hypothetical protein	0,85	0,21	0,36	1,10	0,86	0,91	1,30	0,44	0,67
BP1839	<i>rpsP</i>	30S ribosomal protein S16	2,67	0,03	0,12	2,58	0,02	0,10	0,97	1,00	1,00
BP1843	<i>BP1843</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	0,31	0,00	0,05	ON	na	na
BP1857	<i>gdhA</i>	glutamate dehydrogenase	1,28	0,20	0,35	1,98	0,00	0,05	1,54	0,06	0,29
BP1876	<i>bvgR</i>	regulatory protein BvgR	0,93	0,65	0,77	0,60	0,75	0,84	0,64	0,88	0,95
BP1877	<i>bvgS</i>	virulence sensor protein	0,61	0,18	0,33	2,13	0,89	0,93	3,46	0,42	0,65
BP1878	<i>bvgA</i>	virulence factors transcription regulator	1,39	0,08	0,20	1,51	0,03	0,12	1,09	0,62	0,79
BP1879	<i>fhaB</i>	filamentous hemagglutinin/adhesin	1,83	0,01	0,06	1,15	0,53	0,68	0,63	0,04	0,26
BP1882	<i>fimC</i>	outer membrane usher protein precursor	3,78	0,01	0,08	2,02	0,10	0,24	0,53	0,58	0,76
BP1883	<i>fimD</i>	fimbrial adhesin	2,03	0,01	0,07	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1884	<i>fhaC</i>	hemolysin activator-like protein	4,07	0,02	0,10	3,34	0,05	0,16	0,82	0,61	0,78
BP1887	<i>BP1887</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	0,25	0,04	0,14	ON	na	na
BP1895	<i>oplaH</i>	5-oxoprolinase	0,21	0,00	0,04	0,34	0,04	0,14	1,59	0,49	0,70
BP1899	<i>BP1899</i>	putative transcriptional regulator	ON	na	na	ON	na	na	3,08	0,02	0,22
BP1900	<i>BP1900</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na
BP1902	<i>suhB</i>	inositol-1-monophosphatase	1,05	0,94	0,97	1,24	0,65	0,78	1,18	0,68	0,83
BP1907	<i>BP1907</i>	hypothetical protein	ON	na	na	na	na	na	OFF	na	na
BP1910	<i>accA</i>	acetyl-CoA carboxylase alpha subunit	1,20	0,61	0,74	1,31	0,26	0,43	1,09	0,61	0,78
BP1913	<i>ask</i>	aspartate kinase	0,71	0,40	0,56	1,06	0,62	0,77	1,49	0,92	0,96
BP1926	<i>BP1926</i>	putative extracellular solute-binding protein	ON	na	na	ON	na	na	3,92	0,09	0,34
BP1948	<i>BP1948</i>	branched-chain amino acid-binding protein	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP1954	<i>BP1954</i>	putative monooxygenase	ON	na	na	ON	na	na	1,66	0,60	0,78
BP1960	<i>BP1960</i>	pseudogene	ON	na	na	ON	na	na	2,19	0,11	0,35
BP1976	<i>gabD</i>	succinate-semialdehyde dehydrogenase	1,89	0,22	0,38	1,15	0,22	0,39	0,61	0,36	0,61
BP1980	<i>BP1980</i>	probable ATP-dependent DNA helicase	ON	na	na	ON	na	na	1,06	0,76	0,87
BP1983	<i>BP1983</i>	putative extracellular solute-binding protein		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP2004	<i>BP2004</i>	putative response regulator	ON	na	na	ON	na	na	1,30	0,12	0,36
BP2010	<i>efp</i>	elongation factor P	1,69	0,09	0,22	0,71	0,99	0,99	0,42	0,31	0,56
BP2012	<i>BP2012</i>	hypothetical protein	1,07	0,79	0,89	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2014	<i>acnA</i>	aconitate hydratase	1,54	0,01	0,06	1,78	0,01	0,10	1,15	0,42	0,65
BP2021	<i>acnB</i>	aconitate hydratase	2,23	0,01	0,07	1,12	0,87	0,92	0,50	0,08	0,32
BP2041	<i>proA</i>	gamma-glutamyl phosphate reductase	OFF	na	na	0,75	0,42	0,57	ON	na	na
BP2043	<i>BP2043</i>	putative lipoprotein	1,92	0,01	0,07	2,09	0,00	0,05	1,09	0,21	0,47
BP2044	<i>leuS</i>	leucyl-tRNA synthetase	0,45	0,00	0,02	0,36	0,05	0,16	0,81	0,47	0,68
BP2047	<i>bph2</i>	DNA-binding protein Bph2	2,75	0,56	0,69	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2059	<i>BP2059</i>	beta-ketothiolase	0,60	0,22	0,38	0,81	0,27	0,44	1,35	0,41	0,64
BP2067	<i>BP2067</i>	putative superoxide dismutase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2068	<i>BP2068</i>	hypothetical protein	0,32	0,05	0,14	0,38	0,03	0,13	1,18	0,67	0,82
BP2072	<i>BP2072</i>	putative lipoprotein	0,80	0,27	0,43	0,94	0,71	0,82	1,18	0,36	0,61
BP2081	<i>uvrC</i>	putative excinuclease ABC subunit C	ON	na	na	ON	na	na	1,21	0,47	0,69
BP2084	<i>BP2084</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	2,00	0,10	0,23	ON	na	na
BP2091	<i>BP2091</i>	putative dioxygenase hydroxylase component	ON	na	na	ON	na	na	0,94	0,24	0,50
BP2110	<i>BP2110</i>	putative exodeoxyribonuclease III	OFF	na	na	0,68	0,80	0,88	ON	na	na
BP2120	<i>gor</i>	glutathione reductase	0,48	0,01	0,07	0,77	0,10	0,24	1,61	0,74	0,85
BP2147	<i>BP2147</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	0,63	0,96	0,98	ON	na	na
BP2156	<i>BP2156</i>	hypothetical protein	0,95	0,83	0,91	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2164	<i>BP2164</i>	putative 8-amino-7-oxononanoate synthase	ON	na	na	ON	na	na	1,05	0,42	0,65
BP2178	<i>BP2178</i>	putative ABC transporter, ATP-binding subunit	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2184	<i>rpoD</i>	RNA polymerase sigma factor	1,32	0,49	0,64	0,80	0,53	0,68	0,60	0,22	0,48
BP2187	<i>BP2187</i>	putative transferase	1,82	0,07	0,17	2,69	0,04	0,16	1,48	0,37	0,63
BP2188	<i>purA</i>	adenylosuccinate synthetase	0,91	0,42	0,58	0,34	0,00	0,05	0,37	0,01	0,20
BP2189	<i>BP2189</i>	ATP phosphoribosyltransferase regulatory subunit	0,69	0,23	0,39	0,55	0,01	0,09	0,79	0,65	0,80
BP2191	<i>hfJK</i>	hypothetical protein	0,51	0,07	0,18	1,32	0,84	0,90	2,61	0,18	0,43
BP2193	<i>hfq</i>	RNA-binding protein Hfq	2,03	0,08	0,20	1,70	0,00	0,02	0,84	0,71	0,84

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP2194	<i>hisI</i>	histidinol-phosphate aminotransferase	0,84	0,55	0,69	0,49	0,35	0,52	0,59	0,79	0,89
BP2195	<i>BP2195</i>	GTP-binding protein EngA	1,53	0,99	1,00	2,18	0,63	0,77	1,42	0,58	0,76
BP2196	<i>BP2196</i>	putative quinoprotein	1,01	0,82	0,91	0,64	0,04	0,15	0,63	0,32	0,57
BP2197	<i>BP2197</i>	hypothetical protein	2,94	0,25	0,42	2,85	0,29	0,46	0,97	0,39	0,63
BP2198	<i>hisS</i>	histidyl-tRNA synthetase	0,71	0,12	0,26	0,87	0,41	0,57	1,23	0,46	0,68
BP2199	<i>ispG</i>	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	0,48	0,04	0,13	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2202	<i>ndk</i>	nucleoside diphosphate kinase	0,30	0,01	0,07	2,22	0,00	0,05	7,42	0,00	0,13
BP2203	<i>valS</i>	valyl-tRNA synthetase	0,53	0,53	0,67	1,94	0,30	0,47	3,70	0,25	0,50
BP2219	<i>BP2219</i>	putative cell surface protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2261	<i>bcrD</i>	putative type III secretion pore protein	ON	na	na	ON	na	na	2,34	0,12	0,35
BP2267	<i>greA</i>	transcription elongation factor	0,48	0,04	0,13	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2271	<i>BP2271</i>	putative regulatory lipoprotein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2283	<i>qor</i>	quinone oxidoreductase	1,16	0,85	0,92	1,59	0,30	0,47	1,37	0,51	0,71
BP2286	<i>BP2286</i>	putative transcriptional regulator (MarR family)	ON	na	na	ON	na	na	1,70	0,39	0,63
BP2291	<i>BP2291</i>	tartrate dehydrogenase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2293	<i>BP2293</i>	putative solute-binding transport protein (periplasmic)	0,88	0,45	0,61	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2301	<i>BP2301</i>	N-carbamoyl-L-amino acid amidohydrolase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2308	<i>BP2308</i>	hypothetical protein	1,04	0,08	0,20	1,73	0,00	0,05	1,66	0,60	0,78
BP2309	<i>purD</i>	phosphoribosylamine--glycine ligase	0,23	0,01	0,07	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2310	<i>hemF</i>	coproporphyrinogen III oxidase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2312	<i>BP2312</i>	hypothetical protein	1,14	0,86	0,92	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2315	<i>vag8</i>	autotransporter	2,56	0,01	0,05	0,92	0,71	0,82	0,36	0,01	0,17
BP2334	<i>BP2334</i>	putative ATP-dependent helicase	ON	na	na	ON	na	na	3,01	0,26	0,52
BP2335	<i>argA</i>	N-acetylglutamate synthase	1,42	0,15	0,29	0,70	0,96	0,97	0,49	0,39	0,63
BP2336	<i>BP2336</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2356	<i>BP2356</i>	pseudogene	ON	na	na		na	na	OFF	na	na
BP2358	<i>gltA</i>	citrate synthase	0,83	0,18	0,34	1,01	0,87	0,92	1,21	0,02	0,22
BP2360	<i>sdhB</i>	succinate dehydrogenase catalytic subunit	2,20	0,00	0,04	1,09	0,84	0,90	0,50	0,11	0,35
BP2361	<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase	1,55	0,09	0,21	1,37	0,01	0,10	0,88	0,64	0,80
BP2365	<i>mdH</i>	malate dehydrogenase	0,69	0,30	0,46	1,21	0,51	0,67	1,75	0,24	0,50
BP2379	<i>BP2379</i>	putative chaperonin	0,51	0,02	0,10	0,83	0,80	0,88	1,61	0,14	0,38
BP2380	<i>BP2380</i>	putative periplasmic protein	ON	na	na	ON	na	na	2,62	0,16	0,40
BP2386	<i>eno</i>	phosphopyruvate hydratase	1,45	0,00	0,04	1,36	0,02	0,10	0,94	0,47	0,69

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP2387	<i>BP2387</i>	hypothetical protein	ON	na	na		na	na	OFF	na	na
BP2388	<i>kdsA</i>	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	0,81	0,45	0,60	0,34	0,02	0,12	0,42	0,50	0,71
BP2391	<i>BP2391</i>	putative aminopeptidase	0,32	0,07	0,19	0,50	0,39	0,56	1,54	0,10	0,34
BP2393	<i>BP2393</i>	probable D-aminopeptidase	OFF	na	na	0,94	0,70	0,82	ON	na	na
BP2396	<i>BP2396</i>	putative transport periplasmic protein	1,79	0,18	0,34	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2397	<i>BP2397</i>	putative ABC transporter ATP-binding subunit	1,07	0,94	0,97	0,29	0,01	0,09	0,27	0,02	0,25
BP2399	<i>BP2399</i>	putative transcriptional regulator	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2400	<i>BP2400</i>	putative coenzyme A transferase subunit	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2401	<i>BP2401</i>	pseudogene	ON	na	na	ON	na	na	1,59	0,33	0,58
BP2402	<i>BP2402</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	2,47	0,11	0,26	ON	na	na
BP2403	<i>BP2403</i>	putative ubiquinone oxidoreductase	0,24	0,01	0,06	0,96	0,74	0,83	3,95	0,06	0,29
BP2412	<i>prpE</i>	pseudogene	ON	na	na	ON	na	na	1,72	0,07	0,29
BP2418	<i>BP2418</i>	putative ABC transport protein	2,41	0,02	0,10	6,93	0,00	0,01	2,88	0,10	0,34
BP2421	<i>pepA</i>	cytosol aminopeptidase	0,78	0,44	0,60	1,16	0,41	0,57	1,49	0,22	0,48
BP2432	<i>lep</i>	signal peptidase I		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP2433	<i>lepA</i>	GTP-binding protein LepA	0,39	0,04	0,13	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2434	<i>mucD</i>	serine protease	1,61	0,03	0,10	1,76	0,05	0,16	1,09	0,77	0,87
BP2435	<i>mucB</i>	putative sigma factor regulatory protein	0,82	0,39	0,55	1,21	0,37	0,53	1,48	0,22	0,48
BP2436	<i>BP2436</i>	hypothetical protein	1,40	0,40	0,56	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2439	<i>fabF</i>	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase	0,51	0,13	0,27	1,07	0,85	0,91	2,13	0,14	0,38
BP2440	<i>acpP</i>	acyl carrier protein	0,50	0,11	0,24	0,86	0,45	0,60	1,71	0,24	0,50
BP2441	<i>fabG</i>	3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	0,60	0,06	0,15	0,92	0,52	0,67	1,52	0,07	0,31
BP2442	<i>fabD</i>	acyl-carrier-protein S-malonyltransferase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2443	<i>fabH</i>	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase	0,44	0,11	0,24	0,51	0,30	0,47	1,15	0,61	0,78
BP2447	<i>maf</i>	Maf-like protein	OFF	na	na	0,94	0,37	0,53	ON	na	na
BP2470	<i>BP2470</i>	seryl-tRNA synthetase	0,47	0,11	0,24	0,22	0,00	0,05	0,46	0,73	0,85
BP2471	<i>BP2471</i>	hypothetical protein	1,39	0,82	0,91	0,40	0,03	0,12	0,29	0,41	0,64
BP2472	<i>BP2472</i>	outer-membrane lipoprotein carrier protein precursor	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2474	<i>trxB</i>	thioredoxin reductase	1,03	0,73	0,85	1,08	0,32	0,49	1,04	0,63	0,79
BP2481	<i>kdpB</i>	potassium-transporting ATPase B chain	2,19	0,03	0,10	6,68	0,00	0,05	3,05	0,05	0,26
BP2488	<i>icd</i>	isocitrate dehydrogenase	0,27	0,00	0,03	0,79	0,16	0,32	2,87	0,04	0,26
BP2497	<i>BP2497</i>	putative zinc protease	0,65	0,08	0,20	0,69	0,03	0,12	1,05	0,75	0,86
BP2498	<i>dnaJ</i>	molecular chaperone	1,63	0,05	0,15	0,71	0,24	0,40	0,43	0,05	0,27

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP2499	<i>dnaK</i>	molecular chaperone DnaK	1,02	0,60	0,73	1,16	0,02	0,11	1,14	0,01	0,17
BP2501	<i>BP2501</i>	putative GrpE chaperone	1,37	0,47	0,62	1,17	0,80	0,88	0,85	0,71	0,85
BP2505	<i>ppnK</i>	inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase	0,41	0,13	0,26	0,65	0,88	0,92	1,59	0,27	0,53
BP2506	<i>BP2506</i>	DNA repair protein	OFF	na	na	8,10	0,06	0,18	ON	na	na
BP2507	<i>fur</i>	ferric ion uptake regulator	1,16	0,82	0,91	1,08	0,94	0,96	0,93	0,89	0,95
BP2508	<i>omlA</i>	outer membrane lipoprotein	0,61	0,15	0,30	0,78	0,28	0,45	1,28	0,49	0,70
BP2533	<i>ppa</i>	inorganic pyrophosphatase	0,72	0,07	0,19	2,14	0,01	0,06	2,97	0,00	0,17
BP2537	<i>HemC</i>	porphobilinogen deaminase	0,36	0,11	0,24	0,99	0,96	0,98	2,76	0,13	0,37
BP2540	<i>sucD</i>	succinyl-CoA synthetase alpha subunit	0,58	0,04	0,12	1,17	0,28	0,45	2,02	0,03	0,25
BP2541	<i>sucC</i>	succinyl-CoA synthetase subunit beta	0,69	0,20	0,35	1,10	0,27	0,44	1,60	0,13	0,37
BP2543	<i>metE</i>	methyltransferase	0,90	0,55	0,69	1,23	0,05	0,16	1,36	0,22	0,48
BP2546	<i>recA</i>	recombinase A	1,52	0,03	0,10	1,19	0,37	0,53	0,78	0,16	0,41
BP2561	<i>BP2561</i>	recombination associated protein	1,52	0,02	0,10	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2562	<i>pyrB</i>	aspartate carbamoyltransferase	2,04	0,02	0,08	1,28	0,64	0,78	0,63	0,19	0,44
BP2564	<i>BP2564</i>	putative lipoprotein	1,20	0,17	0,32	2,81	0,00	0,05	2,34	0,27	0,53
BP2571	<i>BP2571</i>	putative transcriptional regulatory protein	1,64	0,27	0,43	1,49	0,06	0,17	0,91	0,95	0,97
BP2572	<i>ihfA</i>	integration host factor alpha subunit	0,52	0,59	0,72	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2574	<i>pheS</i>	phenylalanyl-tRNA synthetase alpha subunit	2,45	0,03	0,11	1,41	0,15	0,32	0,57	0,17	0,42
BP2578	<i>dut</i>	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	0,68	0,86	0,92	0,92	0,19	0,35	1,36	0,12	0,35
BP2616	<i>BP2616</i>	ABC transport protein, periplasmic component	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2624	<i>guaA</i>	GMP synthase/glutamine amidotransferase protein	1,33	0,01	0,08	0,40	0,05	0,17	0,30	0,01	0,22
BP2625	<i>guaB</i>	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	2,04	0,00	0,04	0,99	0,88	0,92	0,49	0,01	0,20
BP2634	<i>dadA</i>	pseudogene	0,67	0,11	0,25	0,25	0,01	0,06	0,38	0,16	0,41
BP2652	<i>BP2652</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	0,38	0,44	0,59	ON	na	na
BP2661	<i>BP2661</i>	hypothetical protein	1,43	0,11	0,24	2,33	0,04	0,16	1,63	0,23	0,49
BP2667	<i>fhaS</i>	adhesin	1,07	0,77	0,88	1,26	0,97	0,98	1,17	0,85	0,93
BP2668	<i>purL</i>	phosphoribosylformylglycinamide synthase	0,34	0,06	0,16	0,40	0,06	0,17	1,20	0,67	0,82
BP2671	<i>BP2671</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	1,13	0,26	0,43	ON	na	na
BP2675	<i>paaK</i>	phenylacetate-coenzyme A ligase	0,86	0,38	0,55	0,46	0,14	0,30	0,54	0,15	0,40
BP2687	<i>BP2687</i>	oligoribonuclease	0,57	0,04	0,13	1,01	0,60	0,75	1,77	0,18	0,43
BP2700	<i>nadE</i>	NAD(+) synthase	OFF	na	na	1,08	0,27	0,44	ON	na	na
BP2702	<i>argH</i>	argininosuccinate lyase	0,53	0,39	0,55	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2706	<i>moaA</i>	molybdenum cofactor biosynthesis protein A	ON	na	na		na	na	OFF	na	na

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP2707	<i>moeA</i>	molybdopterin cofactor biosynthesis protein	OFF	na	na	0,72	0,91	0,95	ON	na	na
BP2710	<i>moaD</i>	molybdopterin converting factor	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2726	<i>BP2726</i>	putative oxidoreductase	1,03	0,83	0,91	0,55	0,45	0,60	0,53	0,35	0,60
BP2735	<i>BP2735</i>	hypothetical protein	0,37	0,01	0,05	0,58	0,03	0,13	1,55	0,11	0,35
BP2743	<i>BP2743</i>	putative ABC transport protein, ATP-binding component	1,54	0,01	0,08	1,15	0,21	0,38	0,75	0,10	0,34
BP2745	<i>BP2745</i>	putative ABC transport protein, ATP-binding component	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2747	<i>BP2747</i>	putative ABC transport solute-binding protein	0,22	0,00	0,04	0,60	0,09	0,23	2,72	0,05	0,26
BP2749	<i>putA</i>	bifunctional proline oxidoreductase/transcriptional repressor	0,36	0,02	0,08	0,25	0,07	0,19	0,68	0,93	0,96
BP2750	<i>BP2750</i>	lipoprotein	0,83	0,11	0,24	0,98	0,79	0,87	1,17	0,26	0,52
BP2753	<i>clpA</i>	ATP-dependent clp protease ATP-binding	0,59	0,15	0,30	0,82	0,35	0,52	1,40	0,33	0,58
BP2755	<i>BP2755</i>	hypothetical protein	0,85	0,26	0,43	0,47	0,14	0,29	0,56	0,20	0,44
BP2757	<i>BP2757</i>	putative cold-shock protein	0,55	0,58	0,71	1,53	0,16	0,32	2,76	0,13	0,37
BP2759	<i>BP2759</i>	acetyl-CoA acetyltransferase	0,65	0,79	0,89	0,44	0,30	0,47	0,67	0,54	0,74
BP2761	<i>sodB</i>	superoxide dismutase	0,13	0,01	0,06	0,37	0,01	0,10	2,87	0,07	0,30
BP2762	<i>xseA</i>	exodeoxyribonuclease VII large subunit	ON	na	na	ON	na	na	4,09	0,05	0,27
BP2767	<i>BP2767</i>	hypothetical protein	1,37	0,25	0,41	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2769	<i>adK</i>	adenylate kinase	0,79	0,39	0,55	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2770	<i>BP2770</i>	probable short-chain dehydrogenase	1,02	1,00	1,00	1,09	0,87	0,92	1,07	0,89	0,95
BP2783	<i>thrC</i>	threonine synthase	0,24	0,01	0,06	0,15	0,00	0,04	0,65	0,90	0,95
BP2784	<i>BP2784</i>	homoserine dehydrogenase	0,35	0,02	0,09	0,39	0,18	0,35	1,10	0,40	0,64
BP2785	<i>BP2785</i>	hypothetical protein	0,87	0,00	0,04	0,40	0,00	0,05	0,47	0,01	0,17
BP2788	<i>BP2788</i>	hypothetical protein	0,82	0,46	0,62	0,64	0,04	0,15	0,79	0,59	0,77
BP2791	<i>dnaB</i>	replicative DNA helicase	0,93	0,12	0,26	1,30	0,62	0,77	1,39	0,70	0,84
BP2793	<i>rplI</i>	50S ribosomal protein L9	2,55	0,00	0,02	0,70	0,07	0,19	0,27	0,00	0,13
BP2796	<i>rpsF</i>	30S ribosomal protein S6	2,01	0,00	0,04	1,30	0,27	0,44	0,65	0,07	0,30
BP2797	<i>BP2797</i>	hypothetical protein	1,49	0,28	0,44	1,62	0,01	0,08	1,08	0,24	0,50
BP2800	<i>xseB</i>	exodeoxyribonuclease VII small subunit	1,66	0,09	0,21	2,59	0,02	0,10	1,56	0,02	0,23
BP2815	<i>BP2815</i>	hypothetical protein	0,44	0,01	0,08	0,26	0,00	0,05	0,60	0,16	0,41
BP2818	<i>BP2818</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2850	<i>panB</i>	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	0,44	0,17	0,32	0,81	0,21	0,37	1,83	0,19	0,44
BP2865	<i>BP2865</i>	hypothetical protein	1,43	0,11	0,24	1,08	0,01	0,08	0,76	0,56	0,75
BP2889	<i>BP2889</i>	putative c'cytochrome	0,55	0,28	0,44	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2890	<i>purB</i>	adenylosuccinate lyase	1,15	0,14	0,28	0,77	0,23	0,40	0,67	0,12	0,36

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP2893	<i>trmU</i>	tRNA methyltransferase	0,74	0,35	0,51	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2903	<i>glcF</i>	glycolate oxidase iron-sulfur subunit		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP2905	<i>glcD</i>	glycolate oxidase subunit	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2908	<i>aroG</i>	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	0,72	0,09	0,21	1,31	0,06	0,17	1,81	0,01	0,22
BP2909	<i>BP2909</i>	hypothetical protein	0,79	0,34	0,50	0,62	0,21	0,37	0,79	0,56	0,75
BP2911	<i>bph3</i>	putative DNA-binding protein (histone)	1,77	0,04	0,12	1,65	0,12	0,28	0,93	0,73	0,85
BP2918	<i>BP2918</i>	hypothetical protein	0,25	0,02	0,09	0,89	0,56	0,70	3,51	0,07	0,30
BP2924	<i>BP2924</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2927	<i>BP2927</i>	putative integral membrane protein	3,43	0,14	0,28	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2936	<i>BP2936</i>	hypothetical protein	1,44	0,02	0,09	1,27	0,15	0,30	0,88	0,29	0,53
BP2937	<i>BP2937</i>	hypothetical protein	1,31	0,25	0,41	2,87	0,06	0,17	2,19	0,51	0,72
BP2948	<i>BP2948</i>	putative riboflavin-specific deaminase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2951	<i>nrdr</i>	hypothetical protein	0,33	0,00	0,03	0,47	0,19	0,35	1,41	0,04	0,26
BP2952	<i>glyA</i>	serine hydroxymethyltransferase	0,94	0,63	0,75	1,05	0,56	0,70	1,12	0,41	0,64
BP2953	<i>BP2953</i>	hypothetical protein	0,19	0,14	0,28	0,57	0,40	0,56	3,05	0,05	0,26
BP2954	<i>tyrS</i>	tyrosyl-tRNA synthetase	0,69	0,19	0,34	1,02	0,98	0,98	1,48	0,22	0,48
BP2958	<i>BP2958</i>	hypothetical protein	1,67	0,03	0,10	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2959	<i>BP2959</i>	putative integral membrane protein	0,73	0,48	0,63	1,13	0,02	0,11	1,56	0,16	0,40
BP2960	<i>argC</i>	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	1,19	0,58	0,71	1,86	0,01	0,08	1,56	0,13	0,37
BP2961	<i>rpsI</i>	30S ribosomal protein S9	3,15	0,00	0,04	2,48	0,02	0,11	0,79	0,36	0,61
BP2963	<i>BP2963</i>	putative exported solute binding protein	0,22	0,01	0,06	0,83	0,39	0,56	3,78	0,02	0,25
BP2964	<i>BP2964</i>	hypothetical protein	1,13	0,80	0,90	1,10	0,74	0,83	0,97	1,00	1,00
BP2971	<i>BP2971</i>	putative hydrolase	ON	na	na	ON	na	na	3,23	0,23	0,49
BP2977	<i>BP2977</i>	hypothetical protein	0,79	0,56	0,70	1,25	0,18	0,34	1,58	0,01	0,22
BP2978	<i>gltX</i>	glutamyl-tRNA synthetase	0,23	0,05	0,14	0,19	0,00	0,05	0,85	0,89	0,95
BP2983	<i>nrda</i>	ribonucleotide-diphosphate reductase alpha subunit	1,88	0,02	0,08	0,77	0,44	0,59	0,41	0,10	0,34
BP2985	<i>bpHI</i>	histone protein	1,03	0,91	0,96	0,50	0,80	0,88	0,49	0,69	0,84
BP2992	<i>pcp</i>	putative lipoprotein	0,61	0,09	0,22	0,82	0,13	0,29	1,34	0,26	0,51
BP2993	<i>BP2993</i>	putative carbohydrate kinase	0,26	0,09	0,22	0,32	0,10	0,23	1,24	0,74	0,85
BP2996	<i>fabG</i>	acetyl-CoA carboxylase	1,09	0,70	0,82	1,14	0,34	0,50	1,05	0,58	0,76
BP2997	<i>fabE</i>	acetyl-CoA carboxylase	1,35	0,27	0,43	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2998	<i>aroQ</i>	3-dehydroquinate dehydratase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3002	<i>BP3002</i>	hypothetical protein	0,61	0,85	0,92	OFF	na	na	OFF	na	na

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP3012	<i>BP3012</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3014	<i>secA</i>	translocase	1,78	0,01	0,05	1,06	0,68	0,81	0,60	0,03	0,25
BP3018	<i>ftsZ</i>	cell division protein FtsZ	0,97	0,73	0,85	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3019	<i>ftsA</i>	cell division protein FtsA	0,13	0,02	0,08	0,67	0,09	0,23	5,07	0,05	0,27
BP3023	<i>murG</i>	N-acetylglucosaminyl transferase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3025	<i>murD</i>	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate synthetase	0,52	0,09	0,22	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3028	<i>ftsI</i>	peptidoglycan synthetase precursor		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP3030	<i>mraW</i>	S-adenosyl-methyltransferase MraW	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3031	<i>mraZ</i>	hypothetical protein	1,12	0,93	0,96	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3034	<i>BP3034</i>	putative ABC transporter ATP-binding protein	2,56	0,19	0,34	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3035	<i>pyrC</i>	dihydroorotase	0,43	0,20	0,36	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3036	<i>BP3036</i>	putative hydrolase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3037	<i>BP3037</i>	hypothetical protein	0,73	0,35	0,52	1,17	0,94	0,96	1,62	0,47	0,69
BP3040	<i>blyY</i>	putative hemolysin	1,13	0,97	0,99	1,65	0,30	0,47	1,46	0,39	0,63
BP3043	<i>ilvD</i>	dihydroxy-acid dehydratase	ON	na	na	ON	na	na	1,88	0,46	0,68
BP3048	<i>BP3048</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	0,94	0,16	0,32	ON	na	na
BP3066	<i>BP3066</i>	putative methylenetetrahydrofolate reductase	0,75	0,20	0,35	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3068	<i>acyH</i>	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	1,00	0,94	0,97	1,38	0,01	0,06	1,38	0,02	0,23
BP3071	<i>metK</i>	S-adenosylmethionine synthetase	0,67	0,15	0,29	1,19	0,41	0,57	1,78	0,11	0,35
BP3075	<i>BP3075</i>	hypothetical protein	0,43	0,01	0,08	0,86	0,53	0,68	2,01	0,07	0,30
BP3083	<i>BP3083</i>	putative regulatory protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3084	<i>BP3084</i>	hypothetical protein	1,53	0,15	0,29	0,51	0,06	0,18	0,33	0,03	0,25
BP3087	<i>hsIU</i>	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	1,58	0,07	0,18	0,31	0,06	0,17	0,20	0,00	0,17
BP3109	<i>BP3109</i>	hypothetical protein		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP3116	<i>BP3116</i>	putative modification methylase	1,28	0,85	0,92	0,75	0,63	0,77	0,59	0,93	0,96
BP3117	<i>BP3117</i>	putative restriction endonuclease	1,25	0,14	0,29	1,36	0,10	0,23	1,09	0,76	0,86
BP3121	<i>BP3121</i>	hypothetical protein	0,54	0,07	0,18	0,34	0,02	0,10	0,63	0,29	0,53
BP3124	<i>rplY</i>	50S ribosomal protein L25	1,81	0,07	0,19	1,38	0,16	0,32	0,76	0,38	0,63
BP3125	<i>prsA</i>	ribose-phosphate pyrophosphokinase	1,03	0,95	0,98	0,69	0,32	0,49	0,66	0,38	0,63
BP3127	<i>BP3127</i>	outer membrane lipoprotein LolB precursor	1,70	0,13	0,26	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3128	<i>BP3128</i>	hypothetical protein	1,08	0,95	0,97	0,53	0,03	0,12	0,49	0,17	0,41
BP3130	<i>BP3130</i>	putative cyclase	0,34	0,02	0,10	0,97	0,70	0,82	2,84	0,47	0,69
BP3134	<i>hmgA</i>	homogentisate 1,2-dioxygenase	0,63	0,84	0,91	1,48	0,41	0,57	2,34	0,47	0,69

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP3136	<i>BP3136</i>	putative sulfatase	0,60	0,99	1,00	2,98	0,03	0,13	4,95	0,00	0,17
BP3150	<i>wbpO</i>	polysaccharide biosynthesis protein	1,51	0,00	0,04	1,39	0,22	0,39	0,92	0,59	0,77
BP3158	<i>mmsA</i>	pseudogene	ON	na	na	ON	na	na	0,71	0,73	0,85
BP3183	<i>BP3183</i>	pseudogene	5,72	0,13	0,26	7,07	0,03	0,14	1,24	0,59	0,77
BP3202	<i>BP3202</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	1,00	0,88	0,95
BP3213	<i>gloB</i>	probable hydroxyacylglutathione hydrolase	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na
BP3215	<i>fabI</i>	enoyl-(acyl carrier protein) reductase	1,02	0,99	1,00	1,12	0,66	0,79	1,10	0,73	0,85
BP3218	<i>BP3218</i>	hypothetical protein	0,77	0,35	0,51	0,69	0,02	0,10	0,90	0,87	0,95
BP3222	<i>ompR</i>	two component response regulator	OFF	na	na	0,67	0,94	0,96	ON	na	na
BP3226	<i>glnS</i>	glutaminyl-tRNA synthetase	0,92	0,82	0,91	1,59	0,73	0,83	1,72	0,65	0,80
BP3228	<i>minD</i>	putative septum site-determining protein	1,52	0,00	0,03	0,95	0,62	0,77	0,62	0,28	0,53
BP3229	<i>minE</i>	putative cell division topological specificity factor	0,54	0,43	0,58	1,66	0,07	0,20	3,05	0,05	0,26
BP3233	<i>BP3233</i>	pseudogene	ON	na	na	ON	na	na	0,48	0,19	0,43
BP3237	<i>BP3237</i>	putative binding-protein-dependent transport protein	OFF	na	na	0,36	0,20	0,37	ON	na	na
BP3240	<i>uvrA2</i>	putative excinuclease ABC subunit	1,28	0,58	0,71	3,73	0,15	0,31	2,91	0,24	0,50
BP3254	<i>BP3254</i>	formyltetrahydrofolate deformylase	0,61	0,01	0,08	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3261	<i>trpC</i>	indole-3-glycerol phosphate synthase	OFF	na	na	0,50	0,42	0,57	ON	na	na
BP3262	<i>trpD</i>	anthranilate phosphoribosyltransferase	1,23	0,98	1,00	1,44	0,40	0,56	1,17	0,65	0,80
BP3264	<i>trpE</i>	anthranilate synthase component I	0,22	0,00	0,04	0,65	0,21	0,38	3,03	0,33	0,58
BP3267	<i>BP3267</i>	hypothetical protein	0,35	0,00	0,04	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3276	<i>BP3276</i>	hypothetical protein	0,18	0,00	0,04	0,41	0,08	0,22	2,23	0,09	0,34
BP3284	<i>atpF</i>	ATP synthase B chain	1,01	0,93	0,96	0,50	0,41	0,57	0,50	0,50	0,71
BP3285	<i>atpH</i>	ATP synthase subunit D	2,24	0,01	0,06	2,89	0,00	0,02	1,29	0,16	0,40
BP3286	<i>atpA</i>	ATP synthase subunit A	1,51	0,01	0,06	1,77	0,00	0,03	1,17	0,19	0,44
BP3287	<i>atpG</i>	ATP synthase subunit C	1,70	0,04	0,13	0,48	0,06	0,17	0,28	0,03	0,25
BP3288	<i>atpD</i>	ATP synthase subunit B	1,56	0,02	0,08	1,42	0,00	0,05	0,91	0,49	0,70
BP3291	<i>hemE</i>	uroporphyrinogen decarboxylase	0,73	0,70	0,82	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3292	<i>BP3292</i>	putative primosomal protein	1,47	0,33	0,50	4,42	0,03	0,13	3,01	0,11	0,35
BP3295	<i>BP3295</i>	putative peptidase	ON	na	na	na	na	na	OFF	na	na
BP3302	<i>BP3302</i>	hypothetical protein	0,48	0,04	0,13	0,76	0,40	0,56	1,56	0,16	0,40
BP3317	<i>BP3317</i>	putative enoyl-CoA hydratase/isomerase	ON	na	na	ON	na	na	2,80	0,05	0,27
BP3320	<i>BP3320</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na
BP3321	<i>BP3321</i>	putative amidase	0,39	0,00	0,04	0,30	0,03	0,14	0,76	0,41	0,65

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP3322	<i>BP3322</i>	putative binding-protein-dependent transport protein	ON	na	na	ON	na	na	3,49	0,16	0,40
BP3329	<i>BP3329</i>	putative outer membrane (permeability) protein	1,03	0,98	1,00	1,22	0,35	0,52	1,19	0,49	0,70
BP3330	<i>BP3330</i>	putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0,47	0,15	0,30	0,52	0,03	0,13	1,10	0,62	0,78
BP3331	<i>ksgA</i>	dimethyladenosine transferase	0,31	0,08	0,19	0,49	0,38	0,55	1,56	0,16	0,40
BP3333	<i>pykA</i>	pyruvate kinase	0,80	0,34	0,51	0,67	0,12	0,28	0,85	0,69	0,84
BP3341	<i>BP3341</i>	putative periplasmic protein	1,07	0,84	0,92	0,74	0,09	0,22	0,69	0,18	0,43
BP3342	<i>BP3342</i>	putative peptidoglycan-associated lipoprotein	0,24	0,01	0,07	0,19	0,00	0,03	0,80	0,63	0,79
BP3343	<i>BP3343</i>	translocation protein TolB precursor	1,14	0,38	0,55	1,12	0,53	0,67	0,98	0,90	0,95
BP3344	<i>BP3344</i>	Proline-rich inner membrane protein	OFF	na	na	1,71	0,05	0,16	ON	na	na
BP3345	<i>BP3345</i>	putative TolR-like translocation protein	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na
BP3346	<i>BP3346</i>	putative TolQ-like translocation protein	0,98	0,51	0,65	1,44	0,17	0,33	1,47	0,61	0,78
BP3348	<i>proS</i>	prolyl-tRNA synthetase	0,91	0,60	0,72	0,78	0,20	0,37	0,86	0,63	0,79
BP3366	<i>BP3366</i>	putative phage tail protein	12,28	0,05	0,14	12,55	0,04	0,16	1,02	0,93	0,96
BP3398	<i>ilvE</i>	branched-chain amino acid aminotransferase	0,31	0,03	0,10	0,70	0,19	0,35	2,29	0,40	0,64
BP3402	<i>BP3402</i>	hypothetical protein	2,75	0,03	0,12	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3403	<i>BP3403</i>	putative UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na
BP3405	<i>ompQ</i>	outer membrane porin protein OmpQ	1,15	0,57	0,71	1,84	0,01	0,08	1,60	0,09	0,33
BP3415	<i>fis</i>	DNA-binding protein	0,52	0,34	0,51	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3416	<i>purH</i>	bifunctional purine biosynthesis protein	0,55	0,01	0,07	0,42	0,00	0,05	0,78	0,23	0,49
BP3419	<i>BP3419</i>	hypothetical protein	1,63	0,28	0,44	2,68	0,07	0,20	1,64	0,39	0,63
BP3420	<i>BP3420</i>	serine/threonine dehydratase	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na
BP3421	<i>ruvB</i>	Holliday junction DNA helicase RuvB	1,07	0,79	0,89	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3425	<i>BP3425</i>	putative carbonic anhydrase	0,17	0,00	0,04	0,39	0,05	0,16	2,23	0,08	0,31
BP3441	<i>BP3441</i>	hypothetical protein	2,88	0,02	0,08	1,18	0,17	0,33	0,41	0,03	0,25
BP3442	<i>pyrD</i>	dihydroorotate dehydrogenase	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na
BP3460	<i>BP3460</i>	ABC transporter ATP-binding protein	1,50	0,38	0,55	0,93	0,25	0,42	0,62	0,99	0,99
BP3462	<i>BP3462</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	2,41	0,17	0,42
BP3467	<i>BP3467</i>	hypothetical protein	1,00	0,68	0,80	1,00	0,92	0,95	1,00	0,74	0,85
BP3471	<i>coaD</i>	phosphopantetheine adenylyltransferase	1,19	0,78	0,89	0,83	0,44	0,59	0,70	0,42	0,65
BP3481	<i>BP3481</i>	hypothetical protein	0,30	0,03	0,12	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3484	<i>ribB</i>	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	0,88	0,50	0,65	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3485	<i>ribH</i>	riboflavin synthase subunit beta	0,88	0,11	0,24	1,04	0,99	0,99	1,18	0,42	0,65
BP3489	<i>BP3489</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP3491	<i>ndh</i>	putative NADH dehydrogenase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3494	<i>brkA</i>	serum resistance protein	2,13	0,00	0,05	1,00	0,99	0,99	0,47	0,00	0,17
BP3495	<i>groEL</i>	chaperonin GroEL	1,89	0,00	0,02	1,61	0,00	0,03	0,85	0,04	0,26
BP3496	<i>groES</i>	co-chaperonin GroES	1,91	0,00	0,03	1,88	0,02	0,11	0,99	0,85	0,93
BP3498	<i>BP3498</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3499	<i>BP3499</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3524	<i>BP3524</i>	putative acetyltransferase	0,94	0,02	0,09	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3526	<i>rnr</i>	putative ribonuclease R	0,39	0,35	0,52	0,92	0,49	0,64	2,34	0,19	0,44
BP3527	<i>BP3527</i>	putative tRNA/rRNA methyltransferase	1,56	0,10	0,23	1,14	0,24	0,40	0,73	0,91	0,95
BP3529	<i>BP3529</i>	putative hydroxylase	0,66	0,03	0,12	1,04	0,80	0,88	1,56	0,02	0,23
BP3530	<i>hupB</i>	DNA-binding protein Hu-beta	2,02	0,09	0,22	1,43	0,46	0,61	0,71	0,36	0,61
BP3534	<i>basR</i>	response regulator protein	0,44	0,03	0,11	0,64	0,73	0,83	1,45	0,59	0,77
BP3537	<i>argG</i>	argininosuccinate synthase	0,41	0,12	0,26	0,50	0,04	0,14	1,20	0,56	0,75
BP3538	<i>argF</i>	ornithine carbamoyltransferase	1,21	0,88	0,94	1,32	0,65	0,78	1,10	0,84	0,93
BP3539	<i>argD</i>	acetylornithine aminotransferase	0,34	0,05	0,15	0,54	0,33	0,49	1,59	0,27	0,53
BP3543	<i>BP3543</i>	putative D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase	0,38	0,02	0,09	0,61	0,03	0,13	1,63	0,12	0,35
BP3552	<i>ahpC</i>	alkyl hydroperoxide reductase	1,24	0,17	0,33	1,28	0,03	0,13	1,03	0,79	0,88
BP3554	<i>risA</i>	response regulator protein	1,20	0,19	0,35	0,98	0,93	0,96	0,81	0,05	0,26
BP3558	<i>BP3558</i>	putative chromosome partition protein	1,06	0,74	0,86	0,45	0,04	0,14	0,43	0,03	0,26
BP3560	<i>ligA</i>	DNA ligase	0,53	0,53	0,67	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3561	<i>BP3561</i>	putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1,57	0,07	0,19	0,87	0,34	0,51	0,56	0,06	0,29
BP3572	<i>BP3572</i>	putative solute-binding periplasmic protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3575	<i>BP3575</i>	hypothetical protein	0,05	0,00	0,04	0,63	0,27	0,44	12,31	0,02	0,24
BP3576	<i>BP3576</i>	ABC transporter ATP-binding protein	0,67	0,78	0,89	0,72	0,95	0,97	1,07	0,90	0,95
BP3581	<i>BP3581</i>	putative ferredoxin--NADP reductase	0,84	0,50	0,65	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3582	<i>BP3582</i>	ferredoxin	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3584	<i>BP3584</i>	hypothetical protein	0,23	0,02	0,09	1,25	0,67	0,80	5,39	0,06	0,29
BP3587	<i>relA</i>	putative GTP pyrophosphokinase	0,84	0,43	0,58	4,10	0,02	0,11	4,87	0,07	0,29
BP3589	<i>trpB</i>	tryptophan synthase subunit beta	0,46	0,09	0,22	0,92	0,73	0,83	2,01	0,09	0,34
BP3591	<i>accD</i>	acetyl-CoA carboxylase beta subunit	1,20	0,55	0,69	0,95	0,71	0,82	0,79	0,47	0,69
BP3594	<i>metH</i>	5-methyltetrahydrofolate--homocysteine methyltransferase	1,35	0,37	0,53	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3597	<i>thiG</i>	thiazole synthase	0,47	0,35	0,51	1,04	0,73	0,83	2,21	0,67	0,82
BP3599	<i>BP3599</i>	putative protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	0,25	0,02	0,09	0,95	0,75	0,84	3,85	0,10	0,34

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP3610	<i>fusA</i>	elongation factor G	0,94	0,41	0,56	1,33	0,00	0,03	1,42	0,01	0,20
BP3612	<i>rpsJ</i>	30S ribosomal protein S10	2,17	0,00	0,05	0,95	0,69	0,82	0,44	0,00	0,17
BP3613	<i>rplC</i>	50S ribosomal protein L3	4,23	0,03	0,10	3,31	0,04	0,15	0,78	0,40	0,63
BP3614	<i>rplD</i>	50S ribosomal protein L4	4,01	0,00	0,02	1,76	0,10	0,23	0,44	0,02	0,23
BP3615	<i>rplW</i>	50S ribosomal protein L23	2,59	0,07	0,18	0,93	0,43	0,58	0,36	0,13	0,37
BP3616	<i>rplB</i>	50S ribosomal protein L2	1,64	0,92	0,96	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3618	<i>rplV</i>	50S ribosomal protein L22	1,21	0,30	0,46	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3619	<i>rpsC</i>	30S ribosomal protein S3	3,92	0,03	0,10	0,69	0,81	0,88	0,17	0,05	0,26
BP3621	<i>rpmC</i>	50S ribosomal protein L29	5,90	0,00	0,02	3,46	0,00	0,01	0,59	0,03	0,26
BP3622	<i>rpsQ</i>	30S ribosomal protein S17	2,03	0,24	0,39	2,27	0,16	0,32	1,12	0,71	0,84
BP3624	<i>BP3624</i>	putative aldehyde dehydrogenase	0,82	0,06	0,17	0,88	0,27	0,44	1,07	0,61	0,78
BP3626	<i>rplN</i>	50S ribosomal protein L14	2,35	0,01	0,08	3,58	na	na	1,52	na	na
BP3627	<i>rplX</i>	50S ribosomal protein L24	2,84	0,02	0,09	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3628	<i>rplE</i>	50S ribosomal protein L5	1,31	0,36	0,53	1,13	0,80	0,88	0,86	0,55	0,75
BP3630	<i>rpsH</i>	30S ribosomal protein S8	1,48	0,46	0,61	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3631	<i>rplF</i>	50S ribosomal protein L6	3,23	0,00	0,03	1,15	0,71	0,82	0,36	0,01	0,20
BP3632	<i>rplR</i>	50S ribosomal protein L18	4,26	0,01	0,05	5,00	0,00	0,01	1,17	0,15	0,40
BP3635	<i>rplO</i>	50S ribosomal protein L15	1,49	0,28	0,44	3,58	0,05	0,16	2,39	0,17	0,41
BP3640	<i>rpsK</i>	30S ribosomal protein S11	2,22	0,10	0,23	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3641	<i>rpsD</i>	30S ribosomal protein S4	5,45	0,01	0,07	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3642	<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase alpha subunit	1,49	0,13	0,27	1,22	0,10	0,23	0,82	0,44	0,67
BP3643	<i>BP3643</i>	50S ribosomal protein L17	2,45	0,03	0,10	0,69	0,83	0,90	0,28	0,02	0,22
BP3650	<i>BP3650</i>	putative cytochrome C precursor	2,40	0,18	0,34	0,85	0,31	0,48	0,35	0,46	0,68
BP3651	<i>BP3651</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	2,15	0,53	0,73
BP3659	<i>BP3659</i>	putative glutathione S-transferase	OFF	na	na	OFF	na	na	na	na	na
BP3660	<i>uvrA</i>	excinuclease ABC subunit A	1,06	0,87	0,93	2,06	0,08	0,21	1,95	0,18	0,43
BP3662	<i>ssb</i>	single-strand binding protein	1,13	0,47	0,62	1,04	0,93	0,96	0,92	0,60	0,77
BP3674	<i>BP3674</i>	periplasmic solute-binding protein	ON	na	na	ON	na	na	1,39	0,56	0,75
BP3680	<i>glcB</i>	malate synthase	0,20	0,01	0,07	1,16	0,20	0,36	5,71	0,01	0,17
BP3689	<i>BP3689</i>	hypothetical protein	0,66	0,05	0,14	0,46	0,03	0,13	0,70	0,24	0,50
BP3692	<i>BP3692</i>	tRNA (guanine-N(7))-methyltransferase	2,29	0,10	0,22	6,30	0,03	0,13	2,75	0,18	0,42
BP3701	<i>BP3701</i>	hypothetical protein	na	na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP3702	<i>BP3702</i>	GntR-family transcriptional regulator	2,22	0,00	0,03	4,08	0,01	0,09	1,84	0,07	0,31

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP3728	<i>rkpK</i>	putative UDP-glucose 6-dehydrogenase	0,54	0,08	0,19	0,38	0,01	0,08	0,70	0,30	0,55
BP3730	<i>glmU</i>	UDP-N-acetylglucosamine synthesis bifunctional protein	0,75	0,01	0,08	0,85	0,32	0,49	1,13	0,53	0,74
BP3731	<i>BP3731</i>	hypothetical protein	1,92	0,21	0,36	2,88	0,05	0,16	1,50	0,31	0,56
BP3732	<i>BP3732</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3734	<i>BP3734</i>	SCO1/SenC family protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3744	<i>BP3744</i>	putative bifunctional protein	0,36	0,17	0,32	1,10	0,83	0,89	3,03	0,20	0,44
BP3748	<i>rpoH</i>	RNA polymerase sigma factor	OFF	na	na	0,92	0,19	0,35	ON	na	na
BP3751	<i>adhI</i>	alcohol dehydrogenase class III	0,28	0,00	0,03	1,36	0,49	0,64	4,87	0,07	0,29
BP3752	<i>BP3752</i>	hypothetical protein	0,49	0,34	0,50	0,74	0,06	0,17	1,52	0,78	0,88
BP3753	<i>gltB</i>	glutamate synthase	1,43	0,08	0,20	0,66	0,13	0,29	0,46	0,04	0,26
BP3754	<i>gltD</i>	glutamate synthase	2,71	0,00	0,05	1,38	0,18	0,34	0,51	0,03	0,25
BP3757	<i>BP3757</i>	putative ABC transporter, ATP-binding protein	1,74	0,02	0,08	0,24	0,00	0,05	0,14	0,00	0,17
BP3767	<i>hisG</i>	ATP phosphoribosyltransferase	0,50	0,06	0,17	0,32	0,02	0,11	0,65	0,90	0,95
BP3768	<i>hisD</i>	histidinol dehydrogenase	0,29	0,03	0,11	0,68	0,21	0,37	2,34	0,45	0,67
BP3770	<i>hisB</i>	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	0,59	0,04	0,13	0,82	0,12	0,28	1,38	0,11	0,35
BP3772	<i>hisA</i>	1-(5-phosphoribosyl)-5-	0,47	0,01	0,07	0,57	0,03	0,13	1,19	0,44	0,67
BP3776	<i>BP3776</i>	MttA/Hcf106 family protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3778	<i>tatB</i>	Sec-independent protein translocase protein	1,45	0,18	0,33	0,93	0,67	0,80	0,64	0,21	0,47
BP3783	<i>ptxA</i>	pertussis toxin subunit 1 precursor	0,90	0,55	0,69	1,35	0,01	0,07	1,50	0,13	0,37
BP3784	<i>ptxB</i>	pertussis toxin subunit 2 precursor	0,35	0,05	0,14	0,63	0,83	0,89	1,79	0,03	0,25
BP3785	<i>ptxD</i>	pertussis toxin subunit 4 precursor	0,85	0,33	0,50	1,86	0,04	0,16	2,18	0,04	0,26
BP3787	<i>ptxC</i>	pertussis toxin subunit 3 precursor	0,30	0,02	0,09	0,49	0,21	0,38	1,62	0,12	0,36
BP3790	<i>BP3790</i>	putative bacterial secretion system protein	3,07	0,05	0,14	2,87	0,13	0,29	0,93	0,83	0,92
BP3794	<i>BP3794</i>	putative bacterial secretion system protein	1,13	0,38	0,55	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3796	<i>BP3796</i>	putative bacterial secretion system protein	0,80	1,00	1,00	1,01	0,23	0,40	1,26	0,65	0,80
BP3798	<i>BP3798</i>	AraC family regulatory protein	ON	na	na	ON	na	na	1,77	0,23	0,49
BP3802	<i>BP3802</i>	putative extracellular solute-binding protein	0,70	0,86	0,93	1,14	0,33	0,49	1,62	0,46	0,68
BP3807	<i>argJ</i>	ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase	0,16	0,00	0,05	0,41	0,03	0,13	2,65	0,29	0,54
BP3808	<i>BP3808</i>	hypothetical protein	1,41	0,13	0,27	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3819	<i>BP3819</i>	hypothetical protein	0,65	0,01	0,07	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3821	<i>panC</i>	pantoate--beta-alanine ligase	0,80	0,44	0,59	0,70	0,25	0,42	0,87	0,38	0,63
BP3822	<i>BP3822</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	1,56	0,26	0,51
BP3825	<i>glpK</i>	glycerol kinase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na

Locus	Gen	Proteína	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP3827	<i>BP3827</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3828	<i>BP3828</i>	putative amino acid ABC transporter ATP-binding protein	1,14	0,47	0,63	1,12	0,71	0,82	0,99	0,88	0,95
BP3831	<i>BP3831</i>	ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein	0,22	0,05	0,14	0,94	0,63	0,77	4,16	0,06	0,29
BP3849	<i>BP3849</i>	hypothetical protein		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP3852	<i>katA</i>	catalase	1,00	0,86	0,92	0,90	0,08	0,21	0,91	0,72	0,85
BP3857	<i>BP3857</i>	putative hydrolase	0,49	0,00	0,04	0,66	0,20	0,37	1,34	0,56	0,75
BP3862	<i>BP3862</i>	putative extracellular solute-binding protein	0,18	0,04	0,13	0,22	0,04	0,14	1,27	0,72	0,85
BP3863	<i>trmE</i>	tRNA modification GTPase	1,05	0,20	0,36	OFF	na	na	OFF	na	na

Tabla Anexa 2. Proteínas de *B. pertussis* que muestran niveles modificados entre las muestras (Control, 3 h y 48 h post infección). Na = No detectado.

Locus	Gen	Descripción	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
Metabolismo											
BP0112	<i>metC</i>	cystathionine beta-lyase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0190	<i>BP0190</i>	probable orn/arg/lys decarboxylase	0,44	0,001	0,032	0,20	na	na	0,44	na	na
BP0196	<i>gcvH</i>	glycine cleavage system H protein	OFF	na	na	1,13	0,029	0,129	ON	na	na
BP0225	<i>catD2</i>	3-oxoadipate enol-lactone hydrolase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0465	<i>BP0465</i>	probable aldehyde dehydrogenase	0,23	0,000	0,024	0,32	0,040	0,146	1,41	0,038	0,265
BP0607	<i>gpmA</i>	phosphoglyceromutase	0,11	0,000	0,024	0,36	0,002	0,045	3,16	0,036	0,265
BP0627	<i>BP0627</i>	probable enoyl-CoA hydratase/isomerase	0,33	0,008	0,062	0,32	0,000	0,017	0,94	0,938	0,963
BP0629	<i>pdhA</i>	putative pyruvate dehydrogenase E1 component	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0693	<i>BP0693</i>	HPr kinase/phosphorylase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0746	<i>proB</i>	gamma-glutamyl kinase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0751	<i>ispB</i>	octaprenyl-diphosphate synthase	OFF	na	na	1,01	0,365	0,529	ON	na	na
BP0753	<i>hyuA</i>	putative hydantoin utilization protein A	ON	na	na	ON	na	na	1,95	0,274	0,525
BP0822	<i>hyuA</i>	hydantoin utilization protein A	ON	na	na	ON	na	na	2,22	0,097	0,336
BP0842	<i>nuoB</i>	NADH dehydrogenase beta subunit	2,59	0,004	0,046	1,21	0,366	0,529	0,47	0,017	0,224
BP0847	<i>nuoG</i>	NADH dehydrogenase gamma subunit	1,46	0,003	0,042	0,60	0,004	0,054	0,41	0,000	0,117
BP1198	<i>clpB</i>	ATP-dependent protease, ATPase subunit	1,18	0,204	0,355	1,67	0,000	0,013	1,42	0,026	0,245
BP1207	<i>BP1207</i>	N-acyl-D-glutamate deacylase	ON	na	na	ON	na	na	1,50	0,061	0,288
BP2533	<i>ppa</i>	inorganic pyrophosphatase	0,72	0,073	0,190	2,14	0,006	0,061	2,97	0,005	0,166
BP1222	<i>BP1222</i>	short chain dehydrogenase	0,44	0,004	0,048	0,43	0,086	0,224	0,97	0,060	0,288
BP1281	<i>ugpB</i>	glycerol-3-p-binding periplasmic protein precursor	0,15	0,003	0,042	0,29	0,007	0,065	1,89	0,149	0,396
BP1421	<i>pyrH</i>	uridylate kinase	1,25	0,335	0,505	2,19	0,000	0,013	1,75	0,029	0,249
BP1425	<i>dxr</i>	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	OFF	na	na	0,62	0,838	0,899	ON	na	na
BP1446	<i>BP1446</i>	enoyl-CoA hydratase	OFF	na	na	0,31	0,024	0,120	ON	na	na
BP1462	<i>aroC</i>	chorismate synthase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1465	<i>moeA</i>	molybdopterin biosynthesis protein	0,42	0,208	0,357	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1482	<i>leuD</i>	isopropylmalate isomerase small subunit	2,10	0,059	0,161	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1521	<i>hemH</i>	phosphoribosylaminoimidazole synthase	OFF	na	na	0,32	0,137	0,296	ON	na	na
BP1531	<i>BP1531</i>	putative arginase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1578	<i>gmK</i>	guanylate kinase	1,01	0,829	0,912	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1751	<i>dfp</i>	phosphopantothenoylcysteine synthase/decarboxylase	1,03	0,323	0,492	OFF	na	na	OFF	na	na

Locus	Gen	Descripción	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP1895	<i>oplaH</i>	5-oxoprolinase	0,21	0,003	0,042	0,34	0,038	0,144	1,59	0,490	0,703
BP2041	<i>proA</i>	gamma-glutamyl phosphate reductase	OFF	na	na	0,75	0,418	0,575	ON	na	na
BP2164	<i>BP2164</i>	putative 8-amino-7-oxononanoate synthase	ON	na	na	ON	na	na	1,05	0,421	0,646
BP2199	<i>ispG</i>	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	0,48	0,041	0,127	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2309	<i>purD</i>	phosphoribosylamine--glycine ligase	0,23	0,011	0,072	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2360	<i>sdhB</i>	succinate dehydrogenase catalytic subunit	2,20	0,002	0,041	1,09	0,841	0,900	0,50	0,109	0,349
BP2442	<i>fabD</i>	acyl-carrier-protein S-malonyltransferase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2625	<i>guaB</i>	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	2,04	0,003	0,042	0,99	0,883	0,922	0,49	0,010	0,204
BP2700	<i>nadE</i>	NAD(+) synthase	OFF	na	na	1,08	0,268	0,438	ON	na	na
BP2702	<i>argH</i>	argininosuccinate lyase	0,53	0,386	0,550	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2707	<i>moeA</i>	molybdopterin cofactor biosynthesis protein	OFF	na	na	0,72	0,913	0,945	ON	na	na
BP2710	<i>moaD</i>	molybdopterin converting factor	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2769	<i>adK</i>	adenylate kinase	0,79	0,388	0,551	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2783	<i>thrC</i>	threonine synthase	0,24	0,007	0,061	0,15	0,002	0,039	0,65	0,897	0,953
BP2785	<i>BP2785</i>	hypothetical protein	0,87	0,003	0,042	0,40	0,003	0,052	0,47	0,006	0,166
BP2889	<i>BP2889</i>	putative c'cytochrome	0,55	0,281	0,439	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2905	<i>glcD</i>	glycolate oxidase subunit	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2948	<i>BP2948</i>	putative riboflavin-specific deaminase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2997	<i>fabE</i>	acetyl-CoA carboxylase	1,35	0,267	0,427	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3023	<i>murG</i>	N-acetylglucosaminyl transferase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3025	<i>murD</i>	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate synthetase	0,52	0,094	0,219	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3035	<i>pyrC</i>	dihydroorotase	0,43	0,205	0,355	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3066	<i>BP3066</i>	putative methylenetetrahydrofolate reductase	0,75	0,199	0,351	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3150	<i>wbpO</i>	polysaccharide biosynthesis protein	1,51	0,002	0,037	1,39	0,219	0,386	0,92	0,591	0,769
BP3213	<i>glbB</i>	probable hydroxyacylglutathione hydrolase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3254	<i>BP3254</i>	formyltetrahydrofolate deformylase	0,61	0,013	0,079	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3261	<i>trpC</i>	indole-3-glycerol phosphate synthase	OFF	na	na	0,50	0,415	0,572	ON	na	na
BP3285	<i>atpH</i>	ATP synthase subunit D	2,24	0,008	0,062	2,89	0,001	0,021	1,29	0,156	0,400
BP3286	<i>atpA</i>	ATP synthase subunit A	1,51	0,007	0,061	1,77	0,001	0,027	1,17	0,193	0,442
BP3291	<i>hemE</i>	uroporphyrinogen decarboxylase	0,73	0,704	0,824	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3403	<i>BP3403</i>	putative UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3416	<i>purH</i>	bifunctional purine biosynthesis protein	0,55	0,011	0,072	0,42	0,002	0,045	0,78	0,231	0,488
BP3420	<i>BP3420</i>	serine/threonine dehydratase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na

Locus	Gen	Descripción	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP3442	<i>pyrD</i>	dihydroorotate dehydrogenase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3484	<i>ribB</i>	bifunctional 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase/GTP cyclohydrolase II protein	0,88	0,504	0,649	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3491	<i>ndh</i>	putative NADH dehydrogenase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3581	<i>BP3581</i>	putative ferredoxin--NADP reductase	0,84	0,500	0,645	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3594	<i>metH</i>	5-methyltetrahydrofolate--homocysteine methyltransferase	1,35	0,369	0,532	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3754	<i>gluD</i>	glutamate synthase	2,71	0,004	0,046	1,38	0,175	0,341	0,51	0,026	0,245
BP3825	<i>glpK</i>	glycerol kinase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3857	<i>BP3857</i>	putative hydrolase	0,49	0,002	0,037	0,66	0,200	0,367	1,34	0,560	0,750
BP2488	<i>icd</i>	isocitrate dehydrogenase	0,27	0,000	0,027	0,79	0,155	0,318	2,87	0,044	0,265
BP3807	<i>argJ</i>	ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase	0,16	0,005	0,050	0,41	0,028	0,128	2,65	0,294	0,541
BP0801	<i>tpiA</i>	triosephosphate isomerase	0,14	0,004	0,046	0,50	0,069	0,192	3,71	0,154	0,400
BP3264	<i>trpE</i>	anthranilate synthase component I	0,22	0,002	0,037	0,65	0,214	0,382	3,03	0,330	0,579
BP1570	<i>dapA</i>	dihydrodipicolinate synthase	0,55	0,005	0,049	1,17	0,402	0,564	2,13	0,182	0,429
BP3751	<i>adhI</i>	alcohol dehydrogenase class III	0,28	0,001	0,033	1,36	0,490	0,639	4,87	0,066	0,295
BP1260	<i>glnE</i>	glutamate-ammonia-ligase adenylyltransferase	ON	na	na	ON	na	na	1,50	0,82	0,91
BP0863	<i>serB</i>	phosphoserine phosphatase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1237	<i>lytB</i>	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2310	<i>hemF</i>	coproporphyrinogen III oxidase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2706	<i>moaA</i>	molybdenum cofactor biosynthesis protein A	ON	na	na		na	na	OFF	na	na
BP2998	<i>aroQ</i>	3-dehydroquinate dehydratase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1327	<i>glgX</i>	probable glycosyl hydrolase	ON	na	na	ON	na	na	3,52	0,05	0,26
BP1731	<i>ugpQ</i>	cytoplasmic glycerophosphodiester phosphodiesterase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0215	<i>ppc</i>	phosphoenolpyruvate carboxylase	ON	na	na		na	na	OFF	na	na
BP1072	<i>ppk</i>	polyphosphate kinase	2,40	0,00	0,04	OFF	na	na	OFF	na	na
BP0264	<i>apt</i>	adenine phosphoribosyltransferase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1357	<i>leuC</i>	pseudogene		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP3028	<i>ftsI</i>	peptidoglycan synthetase precursor		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP3043	<i>ihvD</i>	dihydroxy-acid dehydratase	ON	na	na	ON	na	na	1,88	0,463	0,684
BP1628	<i>wza</i>	putative capsular polysaccharide export protein	ON	na	na	ON	na	na	2,15	0,098	0,336
BP2762	<i>xseA</i>	exodeoxyribonuclease VII large subunit	ON	na	na	ON	na	na	4,09	0,050	0,271
BP1453	<i>carB</i>	carbamoyl-phosphate synthase large subunit	0,51	0,059	0,161	0,35	0,009	0,078	0,69	0,387	0,632
BP1857	<i>gdhA</i>	glutamate dehydrogenase	1,28	0,197	0,349	1,98	0,003	0,052	1,54	0,063	0,292

Locus	Gen	Descripción	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP2188	<i>purA</i>	adenylosuccinate synthetase	0,91	0,423	0,581	0,34	0,004	0,054	0,37	0,009	0,200
BP2202	<i>ndk</i>	nucleoside diphosphate kinase	0,30	0,009	0,070	2,22	0,003	0,052	7,42	0,001	0,130
BP2634	<i>dada</i>	pseudogene	0,67	0,115	0,246	0,25	0,005	0,057	0,38	0,163	0,408
BP2960	<i>argC</i>	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	1,19	0,579	0,707	1,86	0,010	0,078	1,56	0,128	0,369
BP2978	<i>gltX</i>	glutamyl-tRNA synthetase	0,23	0,048	0,138	0,19	0,005	0,054	0,85	0,892	0,953
BP0624	<i>BP0624</i>	acyl-CoA synthase	0,54	0,090	0,213	1,76	0,008	0,073	3,29	0,021	0,232
BP3136	<i>BP3136</i>	putative sulfatase	0,60	0,992	0,996	2,98	0,032	0,134	4,95	0,003	0,166
BP3728	<i>rkpK</i>	putative UDP-glucose 6-dehydrogenase	0,54	0,076	0,191	0,38	0,009	0,078	0,70	0,300	0,550
BP0379	<i>ldh</i>	putative L-lactate dehydrogenase	0,82	0,364	0,527	0,66	0,005	0,054	0,80	0,580	0,763
BP0038	<i>gloA</i>	lactoylglutathione lyase	0,70	0,579	0,707	2,21	0,006	0,064	3,16	0,036	0,265
BP0185	<i>dcd</i>	deoxycytidine triphosphate deaminase	2,02	0,006	0,052	2,15	0,064	0,181	1,06	0,996	0,998
BP0445	<i>aceK</i>	pseudogene	2,11	0,016	0,079	6,68	0,004	0,054	3,16	0,036	0,265
BP3680	<i>glcB</i>	malate synthase	0,20	0,011	0,072	1,16	0,198	0,365	5,71	0,007	0,166
BP1125	<i>odhB</i>	dihydroliipoamide acetyltransferase	1,65	0,026	0,099	1,42	0,009	0,078	0,86	0,387	0,632
BP2014	<i>acnA</i>	aconitate hydratase	1,54	0,008	0,062	1,78	0,015	0,099	1,15	0,417	0,646
BP1001	<i>pgk</i>	phosphoglycerate kinase	0,31	0,006	0,056	0,46	0,039	0,146	1,47	0,388	0,632
BP0961	<i>etfB</i>	electron transfer flavoprotein beta-subunit	0,97	0,802	0,903	1,75	0,005	0,054	1,80	0,007	0,166
BP2403	<i>BP2403</i>	electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	0,24	0,006	0,056	0,96	0,742	0,835	3,95	0,058	0,288
Procesos celulares											
BP1189	<i>BP1189</i>	lipoprotein	0,99	0,848	0,922	0,42	0,001	0,027	0,42	0,012	0,217
BP1605	<i>BP1605</i>	putative iron binding protein	0,24	0,040	0,126	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1664	<i>gst</i>	glutathione S-transferase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2067	<i>BP2067</i>	putative superoxide dismutase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2081	<i>uvrC</i>	putative excinuclease ABC subunit C	ON	na	na	ON	na	na	1,21	0,472	0,685
BP2110	<i>BP2110</i>	putative exodeoxyribonuclease III	OFF	na	na	0,68	0,803	0,877	ON	na	na
BP2433	<i>lepA</i>	GTP-binding protein LepA	0,39	0,042	0,127	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2447	<i>maf</i>	Maf-like protein	OFF	na	na	0,94	0,366	0,529	ON	na	na
BP2561	<i>BP2561</i>	recombination associated protein	1,52	0,024	0,095	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3018	<i>ftsZ</i>	cell division protein FtsZ	0,97	0,733	0,852	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3228	<i>minD</i>	putative septum site-determining protein	1,52	0,000	0,027	0,95	0,615	0,768	0,62	0,275	0,525
BP3495	<i>groEL</i>	chaperonin GroEL	1,89	0,000	0,024	1,61	0,001	0,033	0,85	0,045	0,265
BP3496	<i>groES</i>	co-chaperonin GroES	1,91	0,001	0,027	1,88	0,020	0,112	0,99	0,845	0,929
BP3748	<i>rpoH</i>	RNA polymerase sigma factor	OFF	na	na	0,92	0,188	0,351	ON	na	na

Locus	Gen	Descripción	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP2506	<i>BP2506</i>	DNA repair protein	OFF	na	na	8,10	0,064	0,181	ON	na	na
BP1732	<i>ppiD</i>	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	1,08	0,579	0,707	0,24	0,007	0,065	0,22	0,005	0,166
BP3087	<i>hslU</i>	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	1,58	0,069	0,182	0,31	0,058	0,173	0,20	0,005	0,166
BP0102	<i>BP0102</i>	putative penicillin-binding protein precursor	1,40	0,010	0,071	0,18	0,012	0,087	0,13	0,005	0,166
BP2761	<i>sodB</i>	superoxide dismutase	0,13	0,007	0,060	0,37	0,014	0,096	2,87	0,068	0,297
Transferencia de información											
BP1117	<i>greB</i>	transcription elongation factor GreB	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1246	<i>nusA</i>	transcription elongation factor NusA	1,72	0,001	0,033	1,31	0,452	0,601	0,76	0,257	0,514
BP1247	<i>infB</i>	translation initiation factor IF-2	2,25	0,001	0,027	0,87	0,490	0,639	0,39	0,051	0,271
BP1728	<i>BP1728</i>	putative glutaredoxin	0,73	0,950	0,972	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2044	<i>leuS</i>	leucyl-tRNA synthetase	0,45	0,000	0,024	0,36	0,048	0,159	0,81	0,465	0,684
BP2267	<i>greA</i>	transcription elongation factor	0,48	0,041	0,127	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2572	<i>ihfA</i>	integration host factor alpha subunit	0,52	0,594	0,721	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2893	<i>trmU</i>	tRNA methyltransferase	0,74	0,346	0,512	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3002	<i>BP3002</i>	hypothetical protein	0,61	0,851	0,922	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3030	<i>mraW</i>	S-adenosyl-methyltransferase MraW	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3415	<i>fis</i>	DNA-binding protein	0,52	0,345	0,512	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3421	<i>ruvB</i>	Holliday junction DNA helicase RuvB	1,07	0,790	0,893	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3560	<i>ligA</i>	DNA ligase	0,53	0,528	0,671	OFF	na	na	OFF	na	na
BP0115	<i>argS</i>	arginyl-tRNA synthetase	0,24	0,084	0,206	0,18	0,002	0,037	0,77	0,920	0,958
BP3863	<i>trmE</i>	tRNA modification GTPase	1,05	0,20	0,36	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1420	<i>tsf</i>	elongation factor Ts	0,37	0,007	0,061	0,65	0,075	0,204	1,76	0,099	0,336
BP2470	<i>BP2470</i>	seryl-tRNA synthetase	0,47	0,109	0,237	0,22	0,004	0,054	0,46	0,726	0,850
Estructura celular											
BP0014	<i>rplL</i>	50S ribosomal protein L7/L12	2,41	0,001	0,027	1,18	0,739	0,833	0,49	0,045	0,265
BP0748	<i>rpmA</i>	50S ribosomal protein L27	4,31	0,008	0,062	10,51	0,003	0,049	2,44	0,128	0,369
BP1047	<i>BP1047</i>	putative secreted protein	0,91	0,521	0,665	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1427	<i>BP1427</i>	probable surface antigen	1,60	0,001	0,027	0,90	0,216	0,384	0,56	0,001	0,130
BP1579	<i>BP1579</i>	putative cytochrome C	ON	na	na	ON	na	na	0,85	0,091	0,336
BP2219	<i>BP2219</i>	putative cell surface protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2793	<i>rplI</i>	50S ribosomal protein L9	2,55	0,000	0,024	0,70	0,067	0,188	0,27	0,001	0,130
BP2796	<i>rpsF</i>	30S ribosomal protein S6	2,01	0,002	0,042	1,30	0,273	0,442	0,65	0,073	0,304
BP2961	<i>rpsI</i>	30S ribosomal protein S9	3,15	0,003	0,042	2,48	0,018	0,108	0,79	0,363	0,614

Locus	Gen	Descripción	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP3612	<i>rpsJ</i>	30S ribosomal protein S10	2,17	0,004	0,048	0,95	0,691	0,817	0,44	0,004	0,166
BP3614	<i>rplD</i>	50S ribosomal protein L4	4,01	0,000	0,024	1,76	0,096	0,235	0,44	0,021	0,232
BP3616	<i>rplB</i>	50S ribosomal protein L2	1,64	0,923	0,963	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3618	<i>rplV</i>	50S ribosomal protein L22	1,21	0,300	0,460	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3621	<i>rpmC</i>	50S ribosomal protein L29	5,90	0,000	0,024	3,46	0,000	0,013	0,59	0,033	0,265
BP3627	<i>rplX</i>	50S ribosomal protein L24	2,84	0,019	0,087	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3630	<i>rpsH</i>	30S ribosomal protein S8	1,48	0,460	0,612	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3631	<i>rplF</i>	50S ribosomal protein L6	3,23	0,001	0,027	1,15	0,710	0,823	0,36	0,011	0,205
BP3632	<i>rplR</i>	50S ribosomal protein L18	4,26	0,005	0,052	5,00	0,000	0,007	1,17	0,154	0,400
BP3640	<i>rpsK</i>	30S ribosomal protein S11	2,22	0,102	0,228	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3641	<i>rpsD</i>	30S ribosomal protein S4	5,45	0,010	0,070	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3344	<i>BP3344</i>	Proline-rich inner membrane protein	OFF	na	na	1,71	0,05	0,16	ON	na	na
BP0827	<i>BP0827</i>	integral membrane component of multidrug efflux system	ON	na	na	ON	na	na	2,80	0,051	0,271
BP1625	<i>kpsE</i>	capsule polysaccharide export inner-membrane protein	ON	na	na	ON	na	na	4,35	0,083	0,322
BP0010	<i>rplK</i>	50S ribosomal protein L11	2,26	0,04	0,13	0,65	0,08	0,21	0,29	0,01	0,17
BP0609	<i>ctpA</i>	putative carboxy-terminal processing protease precursor	2,99	0,013	0,077	0,74	0,315	0,485	0,25	0,005	0,166
BP2043	<i>BP2043</i>	putative lipoprotein	1,92	0,012	0,072	2,09	0,004	0,054	1,09	0,208	0,466
BP2564	<i>BP2564</i>	putative lipoprotein	1,20	0,165	0,316	2,81	0,005	0,054	2,34	0,275	0,525
BP3405	<i>ompQ</i>	outer membrane porin protein OmpQ	1,15	0,573	0,707	1,84	0,010	0,078	1,60	0,087	0,332
BP0013	<i>rplJ</i>	50S ribosomal protein L10	2,78	0,006	0,056	1,56	0,067	0,187	0,56	0,001	0,130
BP1419	<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	2,03	0,008	0,062	1,01	0,895	0,931	0,50	0,045	0,265
Regulación											
BP0694	<i>rpoP</i>	nitrogen regulatory IIA protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1435	<i>BP1435</i>	hypothetical protein	1,19	0,492	0,639	1,71	0,000	0,016	1,43	0,109	0,349
BP1613	<i>BP1613</i>	probable LysR-family transcriptional regulator	0,33	0,098	0,223	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1770	<i>cspA</i>	cold shock-like protein	0,53	0,126	0,260	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2193	<i>hfq</i>	RNA-binding protein Hfq	2,03	0,079	0,197	1,70	0,001	0,021	0,84	0,705	0,845
BP2271	<i>BP2271</i>	putative regulatory lipoprotein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2399	<i>BP2399</i>	putative transcriptional regulator	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3222	<i>ompR</i>	two component response regulator	OFF	na	na	0,67	0,940	0,960	ON	na	na
BP3083	<i>BP3083</i>	putative regulatory protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1092	<i>BP1092</i>	probable two-component histidine kinase	9,67	0,003	0,042	37,65	0,020	0,112	3,89	0,097	0,336
BP2047	<i>bph2</i>	DNA-binding protein Bph2	2,75	0,556	0,691	OFF	na	na	OFF	na	na

Locus	Gen	Descripción	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP3798	<i>BP3798</i>	AraC family regulatory protein	ON	na	na	ON	na	na	1,77	0,23	0,49
BP1590	<i>BP1590</i>	probable transcriptional regulator	OFF	na	na	1,71	0,05	0,16	ON	na	na
BP0441	<i>BP0441</i>	MerR-family transcriptional regulator	1,09	0,73	0,85	OFF	na	na	OFF	na	na
BP0617	<i>BP0617</i>	TetR-family transcriptional regulator	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0744	<i>BP0744</i>	putative transcriptional regulator	ON	na	na	ON	na	na	0,71	0,73	0,85
BP2004	<i>BP2004</i>	putative response regulator	ON	na	na	ON	na	na	1,30	0,12	0,36
BP0670	<i>BP0670</i>	probable acyl-CoA dehydrogenase	ON	na	na	ON	na	na	2,22	0,29	0,54
BP1355	<i>BP1355</i>	probable LacI-family transcriptional regulator	ON	na	na	ON	na	na	5,81	0,006	0,166
BP1456	<i>BP1456</i>	LysR-family transcriptional regulator		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP3702	<i>BP3702</i>	GntR-family transcriptional regulator	2,22	0,001	0,027	4,08	0,014	0,095	1,84	0,074	0,305
BP1899	<i>BP1899</i>	putative transcriptional regulator	ON	na	na	ON	na	na	3,08	0,016	0,224
BP1262	<i>rho</i>	transcription termination factor Rho	1,48	0,010	0,071	0,95	0,642	0,777	0,64	0,006	0,166
Transporte											
BP0385	<i>BP0385</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	0,48	0,716	0,823	ON	na	na
BP0558	<i>BP0558</i>	amino acid-binding periplasmic protein	0,37	0,003	0,042	0,51	0,000	0,017	1,38	0,107	0,349
BP0840	<i>BP0840</i>	outer membrane porin protein precursor	1,43	0,275	0,434	2,38	0,000	0,016	1,67	0,086	0,330
BP0856	<i>bfrD</i>	probable TonB-dependent receptor for iron transport	2,30	0,001	0,029	2,31	0,000	0,013	1,01	0,896	0,953
BP1097	<i>livK</i>	putative amino acids binding protein	ON	na	na	ON	na	na	1,43	0,749	0,857
BP1274	<i>livG</i>	high-affinity branched-chain amino acid transport	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1277	<i>livJ</i>	leu/ile/val-binding protein precursor	OFF	na	na	0,41	0,001	0,027	ON	na	na
BP1364	<i>BP1364</i>	putative amino-acid ABC transporter	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1480	<i>BP1480</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1506	<i>BP1506</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1948	<i>BP1948</i>	branched-chain amino acid-binding protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2396	<i>BP2396</i>	transport periplasmic protein	1,79	0,181	0,337	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2671	<i>BP2671</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	1,13	0,259	0,432	ON	na	na
BP2747	<i>BP2747</i>	putative ABC transport solute-binding protein	0,22	0,003	0,042	0,60	0,093	0,234	2,72	0,045	0,265
BP3034	<i>BP3034</i>	putative ABC transporter ATP-binding protein	2,56	0,186	0,340	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3237	<i>BP3237</i>	putative binding-protein-dependent transport protein	OFF	na	na	0,36	0,201	0,367	ON	na	na
BP3345	<i>BP3345</i>	putative TolR-like translocation protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3572	<i>BP3572</i>	putative solute-binding periplasmic protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3674	<i>BP3674</i>	periplasmic solute-binding protein	ON	na	na	ON	na	na	1,39	0,559	0,750
BP3794	<i>BP3794</i>	putative bacterial secretion system protein	1,13	0,383	0,548	OFF	na	na	OFF	na	na

Locus	Gen	Descripción	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP3757	<i>BP3757</i>	putative ABC transporter, ATP-binding protein	1,74	0,016	0,079	0,24	0,002	0,047	0,14	0,003	0,166
BP2293	<i>BP2293</i>	putative solute-binding transport protein (periplasmic)	0,88	0,451	0,606	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2616	<i>BP2616</i>	ABC transport protein, periplasmic component	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2178	<i>BP2178</i>	putative ABC transporter, ATP-binding subunit	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2418	<i>BP2418</i>	putative ABC transport protein	2,41	0,024	0,095	6,93	0,000	0,008	2,88	0,102	0,341
BP1926	<i>BP1926</i>	putative extracellular solute-binding protein	ON	na	na	ON	na	na	3,92	0,093	0,336
BP1983	<i>BP1983</i>	putative extracellular solute-binding protein		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP3322	<i>BP3322</i>	putative binding-protein-dependent transport protein	ON	na	na	ON	na	na	3,49	0,157	0,400
BP1046	<i>secD</i>	protein export protein SecD	2,59	0,018	0,082	4,32	0,010	0,078	1,67	0,854	0,933
BP2481	<i>kdpB</i>	potassium-transporting ATPase B chain	2,19	0,026	0,099	6,68	0,004	0,054	3,05	0,046	0,265
BP2963	<i>BP2963</i>	putative exported solute binding protein	0,22	0,008	0,063	0,83	0,390	0,557	3,78	0,024	0,245
BP3014	<i>secA</i>	translocase	1,78	0,005	0,052	1,06	0,683	0,811	0,60	0,025	0,245
BP0604	<i>secB</i>	export protein SecB	0,38	0,017	0,081	0,18	0,004	0,054	0,47	0,074	0,305
Factores de virulencia											
BP3494	<i>brkA</i>	serum resistance protein	2,13	0,004	0,048	1,00	0,989	0,991	0,47	0,004	0,166
BP1879	<i>fhaB</i>	filamentous hemagglutinin/adhesin	1,83	0,008	0,062	1,15	0,533	0,677	0,63	0,043	0,265
BP2315	<i>vag8</i>	autotransporter	2,56	0,005	0,052	0,92	0,713	0,823	0,36	0,007	0,166
Hipotéticas											
BP0101	<i>BP0101</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0117	<i>BP0117</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0516	<i>BP0516</i>	hypothetical protein	0,66	0,258	0,419	OFF	na	na	OFF	na	na
BP0561	<i>BP0561</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0570	<i>BP0570</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0705	<i>BP0705</i>	pseudogene	11,14	0,011	0,072	11,90	0,000	0,013	1,07	0,639	0,798
BP1066	<i>BP1066</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1087	<i>BP1087</i>	hypothetical protein	1,59	0,034	0,118	2,82	0,002	0,039	1,78	0,013	0,221
BP1192	<i>BP1192</i>	hypothetical protein	1,08	0,992	0,996	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1204	<i>BP1204</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	0,59	0,952	0,971	ON	na	na
BP1223	<i>BP1223</i>	hypothetical protein	0,74	0,789	0,893	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1243	<i>BP1243</i>	hypothetical protein	0,50	0,013	0,079	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1252	<i>BP1252</i>	hypothetical protein	0,60	0,940	0,969	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1535	<i>BP1535</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	0,59	0,875	0,917	ON	na	na
BP1561	<i>BP1561</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na

Locus	Gen	Descripción	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP1592	<i>BP1592</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	1,30	0,607	0,779
BP1601	<i>BP1601</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1722	<i>BP1722</i>	hypothetical protein	0,43	0,080	0,197	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1723	<i>BP1723</i>	hypothetical protein	1,11	0,273	0,433	3,46	0,000	0,013	3,12	0,001	0,130
BP1744	<i>BP1744</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	2,01	0,271	0,525
BP1760	<i>BP1760</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	1,80	0,258	0,514
BP1766	<i>BP1766</i>	hypothetical protein	3,80	0,005	0,050	2,59	0,017	0,102	0,68	0,025	0,245
BP1806	<i>BP1806</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1843	<i>BP1843</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	0,31	0,003	0,048	ON	na	na
BP1887	<i>BP1887</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	0,25	0,037	0,142	ON	na	na
BP1907	<i>BP1907</i>	hypothetical protein	ON	na	na		na	na	OFF	na	na
BP2012	<i>BP2012</i>	hypothetical protein	1,07	0,790	0,893	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2084	<i>BP2084</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	2,00	0,097	0,235	ON	na	na
BP2147	<i>BP2147</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	0,63	0,964	0,976	ON	na	na
BP2156	<i>BP2156</i>	hypothetical protein	0,95	0,826	0,912	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2312	<i>BP2312</i>	hypothetical protein	1,14	0,861	0,923	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2336	<i>BP2336</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2652	<i>BP2652</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	0,38	0,441	0,595	ON	na	na
BP2767	<i>BP2767</i>	hypothetical protein	1,37	0,248	0,409	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2818	<i>BP2818</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2924	<i>BP2924</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2951	<i>nrdR</i>	hypothetical protein	0,33	0,001	0,031	0,47	0,192	0,354	1,41	0,038	0,265
BP2958	<i>BP2958</i>	hypothetical protein	1,67	0,026	0,099	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3012	<i>BP3012</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3031	<i>mraZ</i>	hypothetical protein	1,12	0,928	0,963	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3048	<i>BP3048</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	0,94	0,159	0,319	ON	na	na
BP3267	<i>BP3267</i>	hypothetical protein	0,35	0,003	0,042	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3320	<i>BP3320</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3402	<i>BP3402</i>	hypothetical protein	2,75	0,035	0,119	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3462	<i>BP3462</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	2,41	0,171	0,416
BP3481	<i>BP3481</i>	hypothetical protein	0,30	0,035	0,119	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3489	<i>BP3489</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3498	<i>BP3498</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na

Locus	Gen	Descripción	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP3499	<i>BP3499</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3732	<i>BP3732</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3808	<i>BP3808</i>	hypothetical protein	1,41	0,134	0,271	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3819	<i>BP3819</i>	hypothetical protein	0,65	0,011	0,072	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3822	<i>BP3822</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	1,56	0,259	0,515
BP3827	<i>BP3827</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3575	<i>BP3575</i>	hypothetical protein	0,05	0,003	0,042	0,63	0,267	0,438	12,31	0,023	0,244
BP3276	<i>BP3276</i>	hypothetical protein	0,18	0,002	0,037	0,41	0,083	0,216	2,23	0,094	0,336
BP3651	<i>BP3651</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	2,15	0,53	0,73
BP2387	<i>BP2387</i>	hypothetical protein	ON	na	na		na	na	OFF	na	na
BP3202	<i>BP3202</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	1,00	0,88	0,95
BP1900	<i>BP1900</i>	hypothetical protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2334	<i>BP2334</i>	putative ATP-dependent helicase	ON	na	na	ON	na	na	3,01	0,26	0,52
BP2401	<i>BP2401</i>	pseudogene	ON	na	na	ON	na	na	1,59	0,33	0,58
BP0532	<i>BP0532</i>	putative substrate-CoA ligase	ON	na	na	ON	na	na	3,84	0,284	0,534
BP0773	<i>BP0773</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	3,16	0,036	0,265
BP0971	<i>cysN</i>	pseudogene		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP1005	<i>BP1005</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	3,02	0,381	0,631
BP1241	<i>BP1241</i>	hypothetical protein		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP1492	<i>BP1492</i>	hypothetical protein		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP1547	<i>BP1547</i>	hypothetical protein	2,406	0,024	0,095	8,12	0,000	0,016	3,38	0,103	0,342
BP3317	<i>BP3317</i>	putative enoyl-CoA hydratase/isomerase	ON	na	na	ON	na	na	2,80	0,051	0,271
BP3849	<i>BP3849</i>	hypothetical protein		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP1779	<i>BP1779</i>	hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	3,33	0,007	0,166
BP3701	<i>BP3701</i>	hypothetical protein		na	na	ON	na	na	ON	na	na
BP1057	<i>BP1057</i>	hypothetical protein	2,548	0,030	0,109	2,39	0,007	0,065	0,94	0,939	0,963
BP1151	<i>BP1151</i>	hypothetical protein	0,669	0,159	0,305	0,38	0,003	0,053	0,57	0,157	0,400
BP2308	<i>BP2308</i>	hypothetical protein	1,04	0,082	0,201	1,73	0,004	0,054	1,66	0,603	0,777
BP2735	<i>BP2735</i>	hypothetical protein	0,37	0,005	0,052	0,58	0,031	0,130	1,55	0,109	0,349
BP2797	<i>BP2797</i>	hypothetical protein	1,49	0,28	0,44	1,62	0,009	0,08	1,08	0,24	0,50
BP2815	<i>BP2815</i>	hypothetical protein	0,44	0,01	0,08	0,26	0,004	0,05	0,60	0,16	0,41
Sin clasificación											
BP0176	<i>BP0176</i>	pseudogene	ON	na	na	ON	na	na	0,76	0,727	0,850

Locus	Gen	Descripción	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP0614	<i>BP0614</i>	pseudogene	ON	na	na	ON	na	na	1,83	0,453	0,677
BP0718	<i>BP0718</i>	carboxyvinyl-carboxyphosphonate phosphorylmutase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1307	<i>BP1307</i>	putative bacterioferritin comigratory protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1359	<i>BP1359</i>	putative mandelate racemase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1960	<i>BP1960</i>	pseudogene	ON	na	na	ON	na	na	2,19	0,113	0,351
BP2291	<i>BP2291</i>	tartrate dehydrogenase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3036	<i>BP3036</i>	putative hydrolase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3127	<i>BP3127</i>	outer membrane lipoprotein LolB precursor	1,70	0,126	0,260	OFF	na	na	OFF	na	na
BP3659	<i>BP3659</i>	putative glutathione S-transferase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3776	<i>BP3776</i>	MttA/Hcf106 family protein	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3233	<i>BP3233</i>	pseudogene	ON	na	na	ON	na	na	0,48	0,185	0,433
BP0700	<i>BP0700</i>	probable hydrolase	0,17	0,003	0,042	0,26	0,008	0,072	1,48	0,141	0,383
BP0208	<i>BP0208</i>	putative oxidoreductase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP0360	<i>BP0360</i>	probable aldehyde dehydrogenase	ON	na	na	ON	na	na	0,78	0,536	0,737
BP0906	<i>BP0906</i>	putative peptidase	0,13	0,001	0,027	0,33	0,019	0,110	2,59	0,345	0,598
BP1300	<i>BP1300</i>	putative glutathione transferase	0,29	0,003	0,042	0,65	0,169	0,330	2,19	0,528	0,731
BP3321	<i>BP3321</i>	putative amidase	0,39	0,003	0,042	0,30	0,035	0,137	0,76	0,413	0,645
BP3425	<i>BP3425</i>	putative carbonic anhydrase	0,17	0,002	0,042	0,39	0,052	0,163	2,23	0,076	0,308
BP1251	<i>BP1251</i>	putative toxin	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3342	<i>BP3342</i>	putative peptidoglycan-associated lipoprotein	0,24	0,010	0,071	0,19	0,001	0,027	0,80	0,628	0,790
BP3524	<i>BP3524</i>	putative acetyltransferase	0,94	0,020	0,087	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2091	<i>BP2091</i>	putative dioxygenase hydroxylase component	ON	na	na	ON	na	na	0,94	0,239	0,496
BP1163	<i>BP1163</i>	probable short-chain dehydrogenase	0,73	0,298	0,458	OFF	na	na	OFF	na	na
BP2393	<i>BP2393</i>	probable D-aminopeptidase	OFF	na	na	0,94	0,703	0,823	ON	na	na
BP0665	<i>BP0665</i>	thymidine diphosphoglucose 4,6-dehydratase	0,35	0,055	0,153	OFF	na	na	OFF	na	na
BP1299	<i>BP1299</i>	putative acetyltransferase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP1324	<i>malQ</i>	pseudogene	ON	na	na		na	na	OFF	na	na
BP1608	<i>BP1608</i>	pseudogene	ON	na	na	ON	na	na	3,27	0,15	0,40
BP1832	<i>BP1832</i>	pseudogene	ON	na	na	ON	na	na	1,04	0,91	0,95
BP2301	<i>BP2301</i>	N-carbamoyl-L-amino acid amidohydrolase	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP2400	<i>BP2400</i>	putative coenzyme A transferase subunit	OFF	na	na	OFF	na	na		na	na
BP3158	<i>mmsA</i>	pseudogene	ON	na	na	ON	na	na	0,71	0,73	0,85
BP0421	<i>BP0421</i>	putative acyl-CoA dehydrogenase		na	na	ON	na	na	ON	na	na

Locus	Gen	Descripción	3 h p.i. vs control			48 h p.i. vs control			48 h p.i. vs 3 h p.i.		
			Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)	Expresión relativa	p-valor	q-valor (BH)
BP0513	<i>BP0513</i>	phage-related hypothetical protein	ON	na	na	ON	na	na	3,38	0,229	0,485
BP2971	<i>BP2971</i>	putative hydrolase	ON	na	na	ON	na	na	3,23	0,233	0,489

Capítulo 4

**Caracterización del rol de los receptores
de hierro BfrD y BfrE en la sobrevivencia
intracelular de *B. pertussis***

4. Caracterización del rol de los receptores de hierro BfrD y BfrE en la sobrevida intracelular de *B. pertussis*

4.1. Introducción

En la intersección entre los campos de investigación de la microbiología y la neurobiología se define un nuevo campo de investigación denominado endocrinología microbiana que estudia la influencia de los neuroquímicos en la interacción patógeno-hospedador y en el desarrollo de infecciones [1]. De esta manera, la endocrinología microbiana propone un nuevo marco conceptual para analizar cómo los microorganismos se ven modificados por las señales neuroquímicas que encuentran en el huésped, y viceversa, así como también para descifrar las vías de señalización inter reino que ocurren entre ambos [1].

En el primer estudio que analizó el efecto de un neuroquímico como las catecolaminas en la fisiología bacteriana se demostró que el agregado de norepinefrina, y en menor medida epinefrina o dopamina, favorece el crecimiento de una variedad de bacterias Gram-negativas en medios de cultivo mínimo suplementados con suero [2]. Estudios posteriores demostraron que las glicoproteínas séricas transferrina y lactoferrina, de alta afinidad por hierro, están involucradas en la promoción del crecimiento mediado por catecolaminas [3]. A partir de estos resultados se infirió que las catecolaminas liberaban el hierro unido a estas glicoproteínas facilitando su acceso y estimulando en consecuencia el crecimiento bacteriano. Posteriormente se demostró mediante estudios bioquímicos que las catecolaminas epinefrina y norepinefrina forman complejos transitorios con el hierro férrico contenido tanto en las glicoproteínas transferrina como lactoferrina [4]. Esta interacción produce la reducción del estado de oxidación de Fe(III) a Fe(II), con la consiguiente disminución de la constante de asociación del complejo transferrina/lactoferrina-hierro y la liberación del complejo catecolamina-Fe(II) al medio de cultivo. Las bacterias pueden, posteriormente, capturar el hierro secuestrado por las catecolaminas a través de sistemas de captura específicos [4]. Asimismo, debido a su baja estabilidad, el complejo catecolamina-Fe(II) se disocia fácilmente, con la liberación de Fe(II) al medio, que probablemente es reoxidado rápidamente a Fe(III) en condiciones aeróbicas y, por lo tanto, puede ser capturado tanto por sistemas de adquisición bacterianos de Fe(III) o bien ser recuperado por las proteínas transferrina/lactoferrina [4].

Se ha demostrado que el agregado de transferrina o lactoferrina en cultivos limitados en hierro de *B. pertussis* produce un aumento en el crecimiento de esta bacteria [5, 6]. Bajo estas condiciones, *B. pertussis* produce y libera al medio extracelular el sideróforo de tipo hidroxamato alcaligina [5], el cual estaría implicado, según lo sugieren varios estudios, en la captura de hierro quelado en estas glicoproteínas [5, 6]. Estudios posteriores demostraron que en *Bordetella bronchiseptica*, un patógeno relacionado estrechamente con *B. pertussis*, la promoción del crecimiento en limitación de hierro por la presencia de transferrina o lactoferrina requiere de la síntesis del sideróforo alcaligina [7, 8]. Con respecto a la promoción del crecimiento por catecolaminas en condiciones de limitación de hierro en *Bordetella*, en el caso de *B. bronchiseptica*, el agregado de norepinefrina en presencia de transferrina o lactoferrina aumenta el crecimiento de cepas tanto deficientes como productoras de alcaligina [7-9]. Es importante destacar que la presencia de norepinefrina produce un efecto aditivo en la captura de hierro mediada por el sideróforo alcaligina [8]. Asimismo, se observó que la limitación de hierro aumenta la unión de norepinefrina a *B. bronchiseptica*, indicando la inducción de algún receptor capaz de capturar este neuroquímico bajo estas condiciones de cultivo [7]. Estos resultados sugieren la presencia de un mecanismo específico distinto del sideróforo alcaligina encargado de capturar hierro a partir de catecolaminas en *Bordetella*.

El efecto de promoción de crecimiento por norepinefrina en *B. bronchiseptica* requiere del sistema de transducción de energía TonB, indicando que uno o más transportadores de membrana externa dependientes de TonB estarían involucrados en la captura de hierro a partir de esta catecolamina [7]. Estudios posteriores demostraron que en *B. bronchiseptica* ninguna mutación individual de receptores de membrana externa dependientes de TonB elimina la promoción del crecimiento por norepinefrina en presencia de transferrina [8]. Sin embargo, la eliminación simultánea de los receptores de catecoles BfrA, BfrD y BfrE y del receptor del sideróforo alcaligina (FauA) suprimen la habilidad de *B. bronchiseptica* de crecer a expensas de norepinefrina y transferrina. La expresión en esta cepa mutante de cualquiera de los receptores BfrA, BfrD o BfrE individualmente restablece el fenotipo de promoción de crecimiento por norepinefrina, sugiriendo la existencia de redundancia de funciones entre estos receptores [8].

El genoma de *B. pertussis* contiene genes que codifican para los receptores BfrD y BfrE pero no para el receptor BfrA [10]. Los estudios de crecimiento *in vitro* que se han realizado con *B. pertussis* no han demostrado que el agregado de norepinefrina en

condiciones de crecimiento en limitación de hierro en presencia de transferrina o lactoferrina aumente significativamente el crecimiento de esta bacteria [8]. Este resultado ha llevado a especular que los receptores de membrana externa BfrD y BfrE de *B. pertussis* podrían ser no funcionales. Sin embargo, se ha demostrado que la complementación tanto con BfrD como con BfrE de *B. pertussis* en una cepa de *B. bronchiseptica* mutante en dichos receptores restablece el fenotipo de promoción de crecimiento por norepinefrina, indicando que estos receptores de *B. pertussis* son funcionales [11]. Además, la expresión del receptor de catecolaminas BfrA de *B. bronchiseptica*, con una elevada similitud de secuencia con BfrD y BfrE, permite a *B. pertussis* aumentar su crecimiento *in vitro* en presencia de norepinefrina, indicando que esta especie tiene los receptores de membrana citoplasmática necesarios para funcionar en conjunto con estos receptores de membrana externa [8]. Estos resultados indican que la imposibilidad de *B. pertussis* de utilizar norepinefrina para promover su crecimiento *in vitro* no se debe a una disfuncionalidad de los receptores de membrana externa BfrD y BfrE, sino que podría deberse a una limitación del sistema de cultivo utilizado. Por ejemplo, tal como lo discuten los autores de ese trabajo, es posible que las condiciones utilizadas no permitan una expresión significativa de estos receptores para conferir una utilización efectiva de catecolaminas [11]. En apoyo a esta hipótesis, mediante el uso de una cepa mutante y el modelo murino de infección, se ha observado que el receptor BfrD está involucrado en la colonización de ratones por *B. pertussis*. Por otro lado, se ha observado que BfrD y BfrE son reconocidos por sueros de humanos convalecientes de tos convulsa, lo que indicaría la expresión de ambos en el fenotipo infectante [11]. Estas observaciones sugieren que los receptores BfrD y BfrE de *B. pertussis* podrían tener un rol en la patogénesis de esta bacteria. Asimismo, indican que esta bacteria podría obtener hierro a partir de transferrina y lactoferrina no solo a través del sideróforo alcaligina sino también a través de catecolaminas utilizando los receptores BfrD y BfrE (**Figura 4.1**).

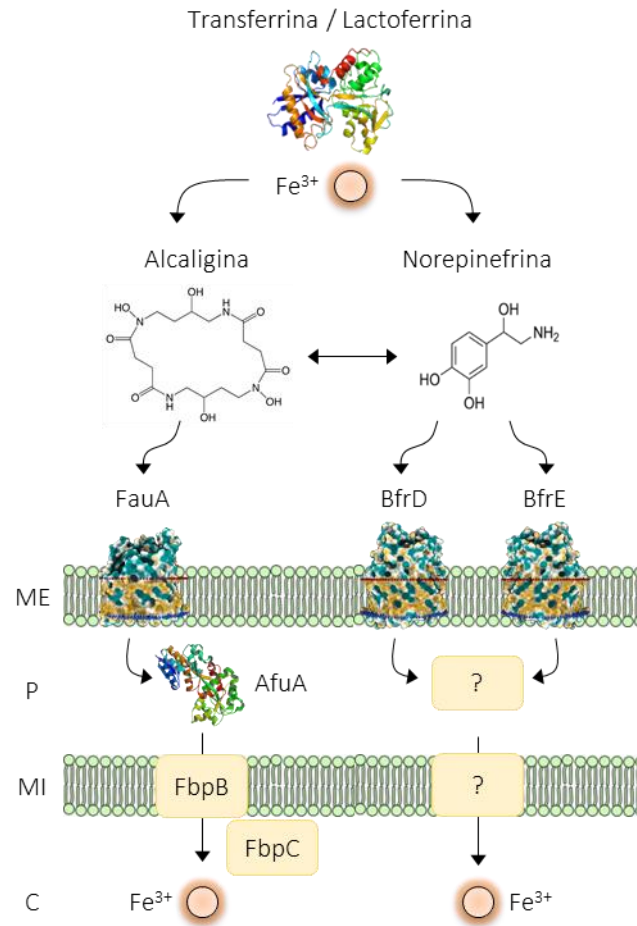


Figura 4.1: Modelo de la adquisición de hierro a partir de transferrina y lactoferrina por *B. pertussis*: *B. pertussis* es capaz de adquirir hierro a partir del complejo Fe-transferrina (Tf) y Fe-lactoferrina (Lf) a través el sideróforo alcaligina que, a su vez, es capturado por el receptor de membrana externa FauA y transportado a través del periplasma hacia el citoplasma por la proteína AfuA. Alternativamente, el hierro complejo en la Tf o Lf puede ser capturado por las catecolaminas del huésped (como la norepinefrina) que luego se unen a receptores de membrana externa BfrD y BfrE. El transportador de Fe de este sistema a través del periplasma aún no ha sido identificado. La alcaligina y la norepinefrina pueden realizar un mecanismo aditivo en la captura de hierro a partir de Tf/Lf. ME: membrana celular externa. P: periplasma. MI: membrana celular interna. C: citoplasma.

En el estudio del proteoma de *B. pertussis* intracelular presentado en el **Capítulo 3** se observó que los niveles de expresión de los receptores BfrD y BfrE están incrementados significativamente en respuesta al ambiente intracelular en todos los tiempos post infección analizados, sugiriendo que señales químicas presentes en el entorno fagosomal inducen la expresión de estos receptores. Este resultado mostró por primera vez una condición de entorno en la cual BfrD y BfrE se expresan en niveles significativos en *B. pertussis*. Cabe destacar que, dentro de las proteínas de *B. pertussis*

involucradas en la captura de hierro, sólo estos receptores presentaron un aumento significativo de expresión en las bacterias intracelulares sugiriendo que podrían tener un rol relevante durante esta fase. Esta suposición está avalada por resultados previos de nuestro grupo que señalan que *B. pertussis* tiene acceso a transferrina exógena dentro del fagosoma [12] y por la capacidad de estas células inmunes de sintetizar catecolaminas [13]. En este contexto, en el presente capítulo se estudió el rol de BfrD y BfrE en la fase intracelular de *B. pertussis*.

4.2. Resultados

4.2.1. Obtención de una cepa de *B. pertussis* defectiva en la expresión de los receptores BfrD y BfrE

Dado que se encontró que los receptores BfrD y BfrE de *B. pertussis* aumentan su expresión en localización intracelular se decidió analizar el rol de estos transportadores en la sobrevivencia intracelular de este patógeno. Para ello, se construyó un doble mutante defectivo en BfrD y BfrE. Se decidió construir un doble mutante debido a la posible función redundante de estos receptores. Como se mencionó anteriormente, para impedir el crecimiento de *B. bronchiseptica* a expensas de catecolaminas y transferrina es necesario inactivar todos los posibles receptores de catecoles, eliminando simultáneamente los genes que codifican para BfrA, BfrD y BfrE [8]. *B. pertussis* no posee el receptor BfrA, pero sí BfrD y BfrE con una elevada similitud de secuencia con dichos receptores de *B. bronchiseptica*, indicando una posible redundancia de funciones entre ambos [10]. La estrategia de mutagénesis elegida consistió en un sistema de intercambio alélico que es una adaptación del publicado por Inatsuka y col. [14], detallada en Materiales y Métodos (Capítulo 2). Dado que los genes *bfrD* y *bfrE* se encuentran adyacentes en el genoma de *B. pertussis*, se construyó un único plásmido, pSS4245 Δ *bfrDE*, conteniendo las regiones circundantes homólogas a ambos genes para eliminarlos simultáneamente. Utilizando la estrategia descrita anteriormente, los genes que codifican a los receptores BfrD y BfrE fueron eliminados por recombinación homóloga. En la **Figura 4.2** se muestra el análisis por PCR para discriminar entre clones salvajes y mutantes realizado con cebadores que amplifican el entorno genómico de *bfrDE* de las colonias de *B. pertussis* obtenidas después de dos recombinaciones homólogas con el vector pSS4245 Δ *bfrDE*. La región del genoma que incluye la eliminación fue secuenciada confirmando que la misma era la esperada.

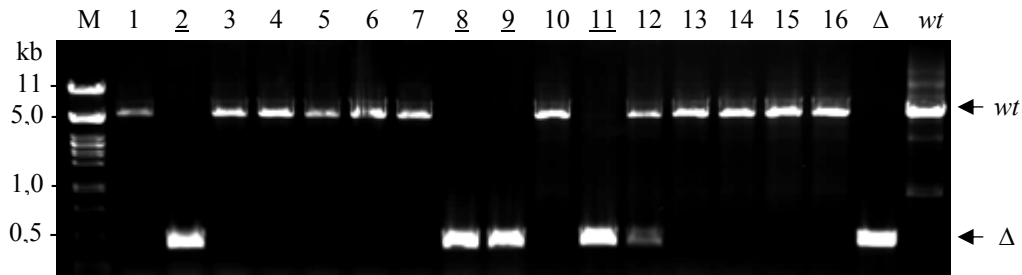


Figura 4.2: Obtención de una cepa de *B. pertussis* defectiva en BfrDE. Electroforesis en gel de agarosa de amplificaciones por PCR con los cebadores *bfrDE*-CF y *bfrDE*-CR que amplifican la región genómica que contiene a *bfrDE* para discriminar entre clones salvajes y clones mutantes de las colonias obtenidas después de dos recombinaciones homólogas con el vector pSS4245 Δ *bfrDE*. Los clones en las calles sin subrayar muestran la amplificación esperada para una región genómica salvaje de *bfrDE* (*wt*; aprox. 5 kb) y los clones en las calles subrayadas muestran la amplificación esperada para una región genómica mutante por eliminación de *bfrDE* (Δ ; aprox. 0,5 kb). La calle *wt* contiene una amplificación por PCR a partir de una muestra de ADN genómico de *B. pertussis* Tohama cepa salvaje. La calle Δ contiene una amplificación por PCR a partir del plásmido pSS4245 Δ *bfrDE*. M: marcador de peso molecular.

4.2.2. Construcción de una cepa mutante complementada en la expresión de los receptores BfrD y BfrE

Como estrategia de complementación se decidió construir un plásmido duplicativo en *B. pertussis*, pBBR1MCS-*bfrDE*, que contuviera los genes que codifican para BfrD y BfrE junto con sus respectivas secuencias promotoras y terminadoras de la transcripción. En la **Figura 4.3** se muestra un análisis por PCR con cebadores que amplifican los genes *bfrDE* de un clon obtenido luego de conjugar este plásmido a la cepa mutante Δ *bfrDE* para obtener una cepa complementada en la expresión de estos receptores. Se obtuvo la amplificación esperada para *bfrDE* en la cepa salvaje y complementada, mientras que no se obtuvo amplificación en la cepa mutante para *bfrDE* (**Figura 4.3**).

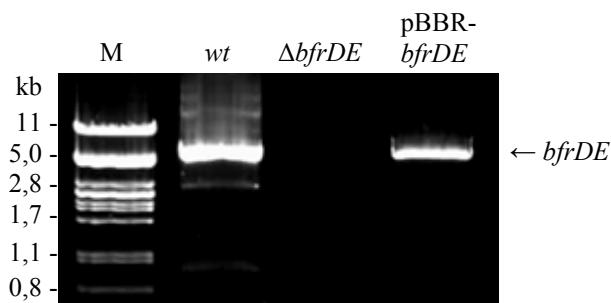


Figura 4.3: Obtención de una cepa complementada en la expresión de BfrDE. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR con los cebadores *bfrDE*-CF y *bfrDE*-CR que amplifican los genes *bfrDE* de las cepas salvaje (*wt*), mutante en *bfrDE* ($\Delta bfrDE$) y cepa complementada con el plásmido pBBR1MCS-*bfrDE* (pBBR-*bfrDE*). M: marcador de peso molecular.

4.2.3. Caracterización de la cinética de crecimiento *in vitro* de las cepas mutante $\Delta bfrDE$ y cepa mutante complementada

Se analizó la cinética de crecimiento en medio de cultivo estándar (SS) de la cepa salvaje, la cepa mutante $\Delta bfrDE$ y la cepa complementada pBBR-*bfrDE*. No se observaron diferencias significativas entre ellas, indicando que la mutación de BfrDE no afectó el crecimiento *in vitro* de *B. pertussis* (Figura 4.4).

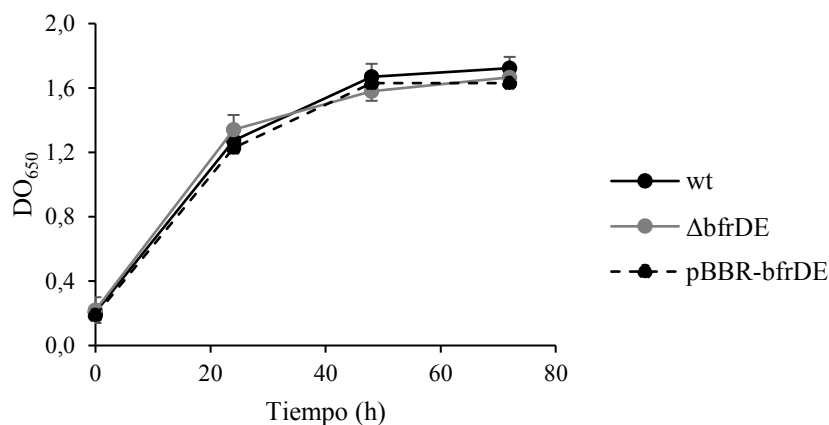


Figura 4.4: La ausencia de expresión de BfrDE no afecta el crecimiento de *B. pertussis* en medio SS. *B. pertussis* cepa salvaje (*wt*), mutante en *bfrDE* ($\Delta bfrDE$) y cepa complementada con el plásmido pBBR1MCS-*bfrDE* (pBBR-*bfrDE*) fueron cultivadas en medio SS líquido y el crecimiento bacteriano fue determinado a distintos tiempos mediante medidas de densidad óptica a λ 650nm (DO₆₅₀).

4.2.4. Análisis del rol de los receptores BfrD y BfrE en la sobrevida intracelular de *B. pertussis* en macrófagos humanos

Para analizar si los receptores BfrD y BfrE están involucrados en la sobrevida intracelular de *B. pertussis* se realizó una infección de macrófagos THP-1 con la cepa salvaje, con la cepa mutante $\Delta bfrDE$ y la cepa mutante defectiva complementada. Como la primera etapa de la infección involucra la adhesión bacteriana al macrófago, seguido de la fagocitosis de la bacteria para lograr su internalización, y dado que estos parámetros deben ser tenidos en cuenta para comprar resultados de sobrevida intracelular, se decidió analizar si existían diferencias en estos parámetros entre las cepas utilizadas. Mediante el uso de microscopía de fluorescencia se observó que tanto el nivel de adhesión a células THP-1 como el de fagocitosis no difirieron significativamente entre las cepas, sugiriendo que los receptores BfrD y BfrE no están involucrados en ninguno de estos procesos iniciales de la infección (**Figura 4.5**).

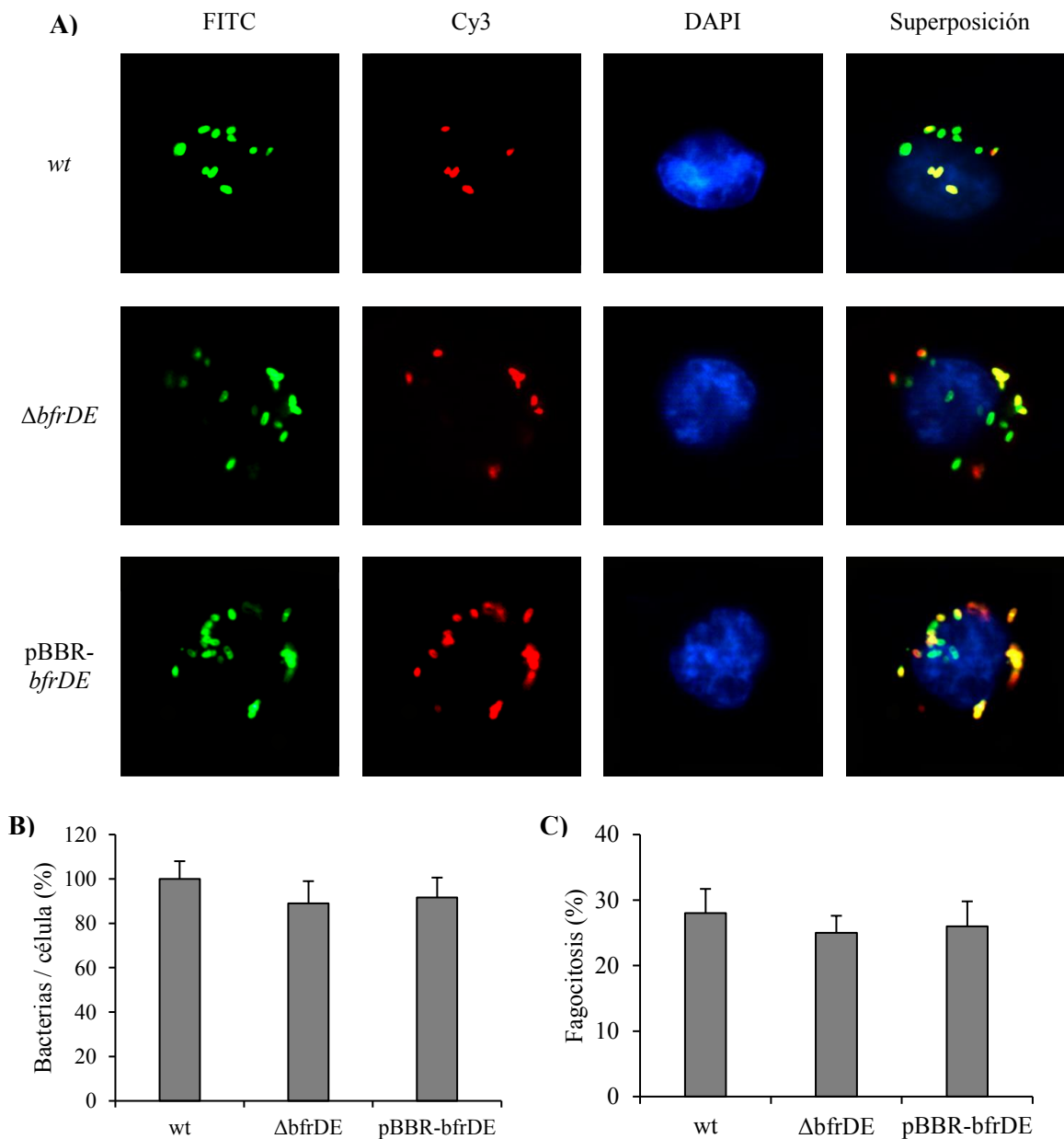


Figura 4.5: Los receptores BfrD y BfrE no están involucrados en la adhesión ni en la fagocitosis de *B. pertussis* por macrófagos THP-1. **A)** Células THP-1 fueron diferenciadas a macrófagos con PMA durante 24 h y posteriormente incubadas con *B. pertussis* (R_ib/c 100) cepa salvaje (*wt*), mutante en *bfrDE* ($\Delta bfrDE$) o cepa complementada con el plásmido pBBR1MCS-*bfrDE* (pBBR-*bfrDE*) durante 2 h. Luego las células fueron lavadas y fijadas con paraformaldehído. El número de bacterias extracelulares (rojas y verdes) e intracelulares (verdes) fue discriminado con doble marcación fluorescente y cuantificado mediante microscopía de fluorescencia. Los núcleos de las células THP-1 fueron teñidos de azul con DAPI. Se muestran imágenes representativas de un experimento de tres independientes **B)** Bacterias totales (rojas y verdes) adheridas por célula. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de bacterias/célula respecto a la cepa salvaje (*wt*). Se muestran la media \pm DE de tres experimentos independientes. **C)** Porcentaje de fagocitosis (bacterias verdes \times 100 / bacterias totales) por célula. Se muestra la media \pm DE de tres experimentos independientes.

Posteriormente, se determinó la sobrevida intracelular de las distintas cepas a diferentes tiempos post infección. Se observó que la sobrevida intracelular de la cepa mutante $\Delta bfrDE$ no difirió significativamente de la cepa salvaje ni de la complementada a las 3 horas post infección en células THP-1 (**Figura 4.6**), sugiriendo que los receptores BfrD y BfrE no son necesarios para las etapas tempranas de infección. Sin embargo, la sobrevida intracelular de la cepa mutante $\Delta bfrDE$ fue significativamente menor que la de la cepa salvaje o la cepa complementada a las 24 horas post infección, indicando que estos receptores contribuyen de manera significativa a la sobrevida de *B. pertussis* en células THP-1. Dado que la sobrevida intracelular de la cepa complementada en la expresión de BfrDE fue similar a la de la cepa salvaje en todos los tiempos analizados, se puede afirmar que la disminución en la sobrevida del mutante $\Delta bfrDE$ se debe a la falta de expresión de estos receptores y no a un efecto polar causado por la mutación realizada (**Figura 4.6**). Es interesante destacar que a las 48 horas post infección no se encontraron diferencias significativas en la sobrevida intracelular de ninguna de las cepas estudiadas.

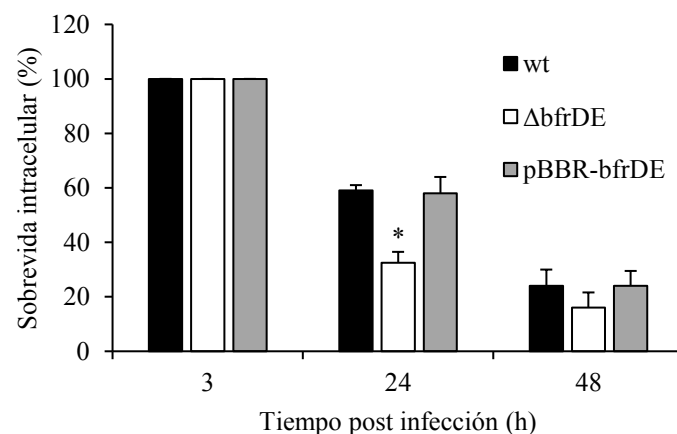


Figura 4.6: Los receptores BfrD y BfrE están involucrados en la sobrevida intracelular de *B. pertussis* en macrófagos THP-1. Células THP-1 fueron diferenciadas con PMA durante 24 h y posteriormente incubadas con *B. pertussis* ($R_i/b/c$ 100) cepa salvaje (*wt*), mutante en *bfrDE* ($\Delta bfrDE$) o mutante defectiva complementada con el plásmido pBBR1MCS-bfrDE (*pBBR-bfrDE*) durante 2 h. Después de tres lavados, las células fueron incubadas durante 1 h con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares y el número de UFC de *B. pertussis* por célula fue determinado a los distintos tiempos post infección. El número de bacterias viables por célula fue calculado dividiendo el número de UFC por el número de macrófagos. La sobrevida intracelular fue referida al número de bacterias vivas por célula a las 3 h post infección. La polimixina B se mantuvo durante todo el tiempo de infección. Los datos representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. La sobrevida intracelular de la cepa mutante $\Delta bfrDE$ difiere significativamente de la sobrevida de las otras dos cepas a las 24 h post infección (* $p < 0,05$; Test de ANOVA).

4.2.5. Estudio de la importancia de los receptores BfrD y BfrE en la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en células del epitelio respiratorio

Estudios previos indican que *B. pertussis* no sólo es capaz de sobrevivir en macrófagos humanos, sino que también persiste en células del epitelio respiratorio, otro tipo celular relevante en el sitio de infección y potencial nicho de persistencia [15]. Los mecanismos de persistencia en este tipo celular y particularmente los sistemas de captura de nutrientes involucrados en la supervivencia bacteriana se desconocen. Dado que los receptores BfrD y BfrE promueven la sobrevivencia intracelular en macrófagos, se evaluó si también están involucrados en la persistencia en células epiteliales del tracto respiratorio. Para ello se empleó la línea celular 16HBE14o-, establecida a partir de epitelio bronquial de un humano sano [16]. Esta línea celular resulta particularmente adecuada para el estudio de la interacción patógeno-hospedador por conservar características del epitelio pulmonar primario que le dio origen, como el crecimiento polarizado, entre otras [16]. Con este fin se realizaron infecciones con *B. pertussis* cepa salvaje y con la cepa mutante $\Delta bfrDE$, en paralelo. En primer lugar, tal como se hizo en la infección de macrófago, se analizó si la eliminación de los receptores BfrD y BfrE afecta la internalización de la bacteria y por lo tanto el número de bacterias intracelulares iniciales. Mediante el uso de microscopía de fluorescencia se determinó que el nivel de adhesión e internalización a las células epiteliales no fue significativamente diferente entre las cepas, sugiriendo que los receptores BfrD y BfrE no estarían involucrados en este proceso inicial de la infección (**Figura 4.7**).

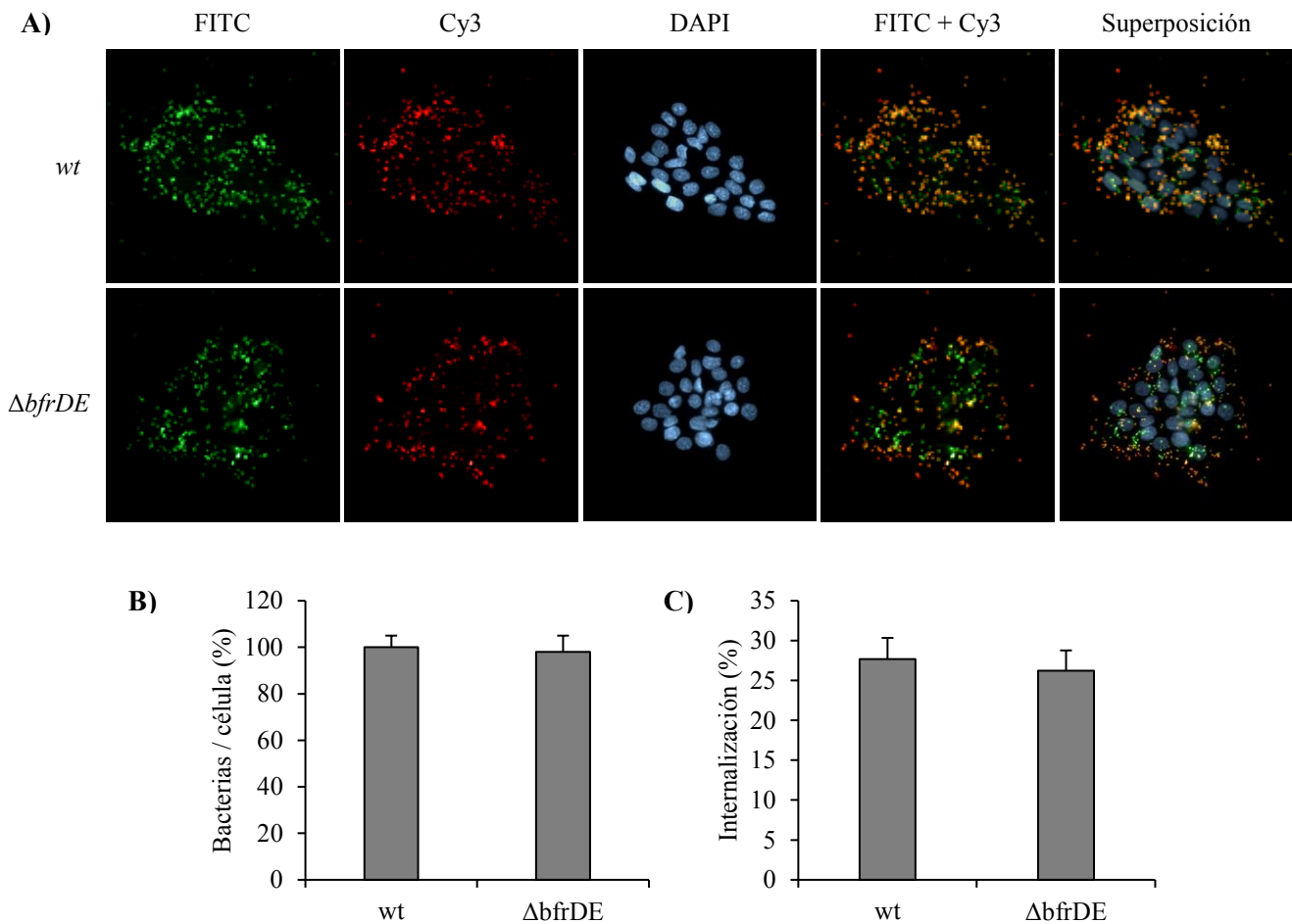


Figura 4.7: Los receptores BfrDE no están involucrados en la adhesión ni en la internalización de *B. pertussis* en células del epitelio respiratorio. **A)** Células 16HBE14o- fueron incubadas con *B. pertussis* (R:b/c 30) cepa salvaje (*wt*) o mutante en *bfrDE* ($\Delta bfrDE$) durante 3 h. Luego las células fueron lavadas y fijadas con paraformaldehído. El número de bacterias extracelulares (rojas y verdes) e intracelulares (verdes) fue discriminado con doble marcación fluorescente y cuantificado mediante microscopía de fluorescencia. Los núcleos de las células 16HBE14o- fueron teñidos de azul con DAPI. Se muestran imágenes representativas de un experimento de dos independientes. **B)** Bacterias totales (rojas y verdes) adheridas por célula. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de bacterias/célula respecto a la cepa salvaje (*wt*). Los datos representan la media \pm DE de dos experimentos independientes. **C)** Bacterias intracelulares (bacterias verdes \times 100 / bacterias totales) por célula. Los datos representan la media \pm DE de dos experimentos independientes.

Ensayos de sobrevivencia intracelular mostraron que la sobrevivencia de la cepa mutante $\Delta bfrDE$ en células epiteliales no fue significativamente diferente de la cepa salvaje a tiempos cortos post infección (**Figura 4.8**). Sin embargo, la sobrevivencia intracelular de la cepa mutante $\Delta bfrDE$ fue menor comparada con la cepa salvaje a las 24 hs post infección, alcanzando niveles con diferencias estadísticamente significativas a las 48 hs post infección (**Figura 4.8**). Estos estudios indican que BfrD y/o BfrE son receptores

relevantes para la persistencia intracelular de *B. pertussis* en células del epitelio respiratorio.

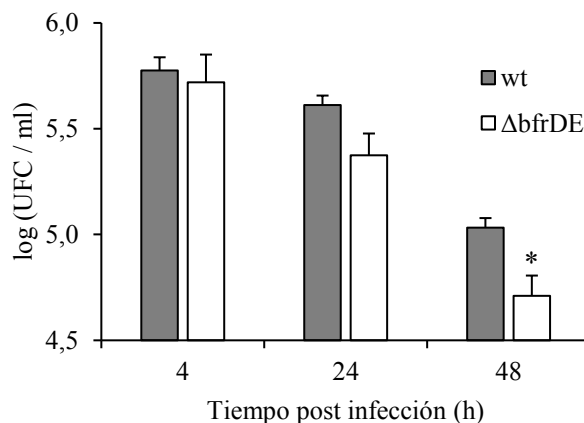


Figura 4.8: Los receptores BfrDE están involucrados en la sobrevida intracelular de *B. pertussis* en células del epitelio respiratorio. Células 16HBE14o- fueron incubadas con *B. pertussis* (R;b/c 30) cepa salvaje (*wt*) o mutante en *bfrDE* ($\Delta bfrDE$) durante 3 h. Después de tres lavados, las células fueron incubadas durante 1 h con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares y el número de UFC de *B. pertussis* por ml fue determinado a los distintos tiempos post infección. La polimixina B se mantuvo durante todo el tiempo de infección. Los datos representan la media \pm DE de dos experimentos independientes. La sobrevida intracelular de la cepa mutante $\Delta bfrDE$ difiere significativamente de la cepa salvaje a las 48 h post infección (* $p < 0,05$; Test *t* de Student)

4.2.6. Caracterización de señales que inducen la expresión de los receptores BfrD y BfrE

Los estudios descriptos en este trabajo indican que los receptores BfrD y BfrE no sólo son inducidos en localización intracelular (**Capítulo 3**) sino que también son relevantes en la persistencia intracelular de *B. pertussis* tanto en macrófagos como en células epiteliales. En un intento por discernir las señales ambientales que podrían estar involucradas en la inducción de la expresión de estos receptores, *B. pertussis* fue cultivada bajo diferentes condiciones de estrés que podrían simular las encontradas en localización intracelular y el nivel de expresión de estos receptores fue determinado mediante RT-qPCR. En particular, se evaluó el efecto de la limitación de hierro [17] y la presencia de niveles de pH ligeramente ácidos, característicos de los endosomas tempranos donde *B. pertussis* sobrevive [18]. Como control se incluyó el estudio de la expresión del receptor *irp1-3* que es regulado positivamente tanto por limitación de hierro [17] como por entornos ácidos [19]. La **Figura 4.9** muestra que el gen *bfrD* es regulado positivamente tanto por limitación de hierro como por entornos ácidos, y que la presencia de ambas

condiciones simultáneas no genera un efecto sinérgico o aditivo en los niveles de expresión. En cambio, el receptor *bfrE* se encuentra regulado positivamente por limitación de hierro y negativamente por entornos ácidos (**Figura 4.9**). Cabe destacar que la presencia simultánea de ambas condiciones de estrés produjo un aumento significativo en la expresión de *bfrE*. Asimismo, el gen *irp1-3* se encontró regulado positivamente tanto por limitación de hierro como por entornos ácidos, como fue demostrado previamente [17, 19].

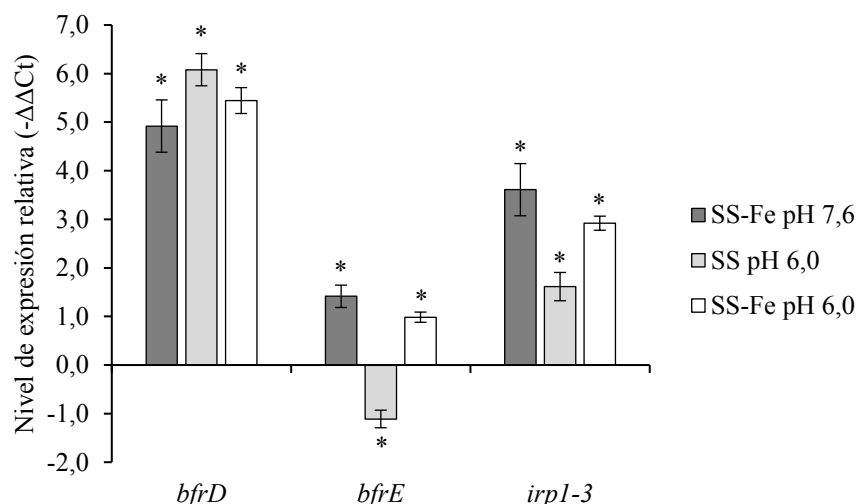


Figura 4.9: Las condiciones de acidez y la disponibilidad de hierro regulan la expresión de los genes *bfrD* y *bfrE*. *B. pertussis* fue cultivada en exceso (SS) o limitación (SS-Fe) de hierro y en distintas condiciones de pH (pH 7,6 y pH 6,0). El nivel de expresión de los receptores de hierro *bfrD*, *bfrE* e *irp1-3* fue determinado mediante RT-qPCR en fase exponencial. Se utilizó el gen *rpoD* como gen de referencia y la condición SS pH 7,6 como condición control. El nivel de expresión fue determinado utilizando el método de diferencias del ciclo umbral ($-\Delta\Delta C_t$). Valores positivos de este parámetro indican sobreexpresión con respecto a la condición control, mientras que valores negativos indican disminución de la expresión. El nivel de expresión de los genes analizados fue significativamente diferente de su respectivo control a pH 7,6 en exceso de hierro (* $p < 0,05$; Test de ANOVA).

Los receptores BfrD y BfrE están potencialmente involucrados en la captura de hierro a través de norepinefrina por *B. pertussis*. Por este motivo, se decidió analizar si la presencia de este neuroquímico afecta la expresión de estos receptores, en un mecanismo de inducción por presencia de sustrato. Para ello, *B. pertussis* fue cultivada en exceso o limitación de hierro y en presencia o ausencia de norepinefrina, y la expresión de los genes *bfrD* y *bfrE* fue evaluada mediante RT-qPCR. Como control de la limitación de hierro se analizó también el nivel de expresión de dos genes regulados positivamente por este estrés, como son los receptores *irp1-3* y *afuA* [17]. La **Figura 4.10** muestra que la

presencia de norepinefrina no afectó significativamente la expresión de ninguno de los receptores analizados, indicando que este neuroquímico no está involucrado en la inducción de *bfrD* o *bfrE*, en las condiciones experimentales utilizadas de este ensayo.

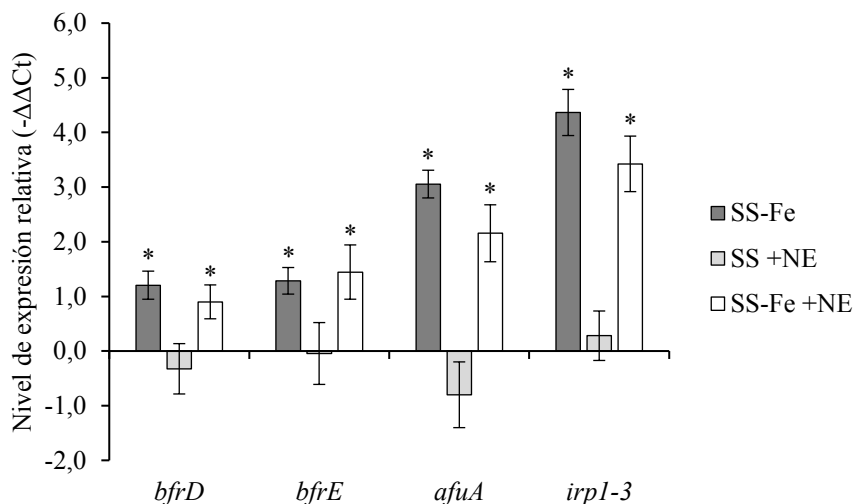


Figura 4.10: La presencia del neuroquímico norepinefrina no modifica la expresión de los genes *bfrD* ni *bfrE*. *B. pertussis* fue cultivada en exceso (SS) o limitación de hierro (SS-Fe) y en presencia de norepinefrina 1 μ M (+NE) o en ausencia de este neuroquímico. El nivel de expresión de los receptores de hierro *bfrD*, *bfrE*, *afuA* e *irp1-3* fue determinado mediante RT-qPCR en fase exponencial. Se utilizó el gen *rpoD* como gen de referencia y la condición SS como condición control. El nivel de expresión fue determinado utilizando el método de diferencias del ciclo umbral ($-\Delta\Delta C_t$). Valores positivos de este parámetro indican sobreexpresión con respecto a la condición control, mientras que valores negativos indican disminución de la expresión. El nivel de expresión de los genes analizados en limitación de hierro con o sin el agregado de NE fue significativamente diferente de su respectivo control en exceso de hierro con o sin el agregado de NE (* $p < 0,05$; Test de ANOVA).

4.3. Discusión

Los mecanismos de captura de hierro son un factor determinante en la capacidad de un patógeno para colonizar a su huésped y causar enfermedad [20]. *B. pertussis* posee dos transportadores, BfrD y BfrE, que podrían estar involucrados en la captura de hierro de las glicoproteínas transferrina y lactoferrina utilizando como intermediario las catecolaminas del huésped [11]. A pesar de la potencial relevancia de este mecanismo de captura en la patogénesis de *B. pertussis*, no hay estudios que hayan demostrado la funcionalidad de estos receptores. Los resultados de proteómica presentados en el **Capítulo 3** mostraron que *B. pertussis* aumenta la expresión de los receptores BfrD y BfrE en el estadio intracelular en macrófagos, sugiriendo que podrían ser relevantes para la adquisición de hierro dentro de células del hospedador. A partir de los resultados presentados en este capítulo, se puede concluir que los receptores BfrD y BfrE están involucrados en la persistencia de *B. pertussis* dentro de macrófagos y células epiteliales respiratorias. En este contexto, los resultados presentados sugieren que *B. pertussis* intracelular tendría acceso no sólo a transferrina, como había sido demostrado previamente [12], sino también a compuestos del tipo de las catecolaminas eventualmente producidos por el huésped. En este sentido, varios estudios demuestran que las células inmunes, incluidos los macrófagos, son capaces de sintetizar y secretar catecolaminas, así como también pueden incorporarlas a partir del medio extracelular [13]. Si bien no hay estudios que reporten la localización intracelular de las catecolaminas en los macrófagos, este proceso fue estudiado profundamente en neuronas, en las cuales se demostró que la norepinefrina es sintetizada en vesículas intracelulares a partir de dopamina por la enzima dopamina- β -hidroxilasa, que posteriormente es liberada al medio extracelular por tráfico intracelular y fusión con la membrana plasmática neuronal [21]. Asimismo, la norepinefrina extracelular puede ser incorporada al citoplasma de la neurona mediante el transportador SLC6A2 [22] y posteriormente cargada en vesículas intracelulares [23]. En caso de que el mecanismo de síntesis, secreción y captación de catecolaminas en macrófagos sea similar a lo que ocurre en neuronas, se puede especular que tanto la norepinefrina sintetizada por estas células inmunes como la capturada del medio extracelular pueden ser transportadas en vesículas intracelulares que eventualmente se fusionarán con el fagosoma que contiene a *B. pertussis*, tal como ocurre con otros nutrientes provenientes del medio extracelular como la transferrina [12]. De esta manera,

B. pertussis intracelular estaría en contacto tanto con la transferrina, que sería la fuente primaria de hierro, como con la norepinefrina, la cual podría funcionar como un sideróforo exógeno de captura de hierro, que finalmente sería incorporado por la bacteria utilizando los receptores BfrD y BfrE.

La plasticidad fenotípica de los macrófagos constituye una característica importante de este linaje celular [24]. En respuesta a señales ambientales estas células inmunes pueden diferenciarse en dos fenotipos diferentes denominados M1 y M2. Esta división, si bien es simplificada ya que hay un espectro amplio de posibles estados de activación de los macrófagos [25], separa dos de las principales actividades de estas células inmunes [26]. Los macrófagos M1 tienen mayor capacidad bactericida y están involucrados en el daño tisular ya que producen cantidades elevadas de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno [24]. Por otro lado, los macrófagos M2 promueven la remodelación y reparación de los tejidos, y tienen funciones inmunoregulatorias, lo que los hace menos bactericidas [24]. Dentro de estas diferencias es importante resaltar que se ha demostrado que la polarización a macrófagos M2, pero no a M1, resulta en un aumento en la síntesis y secreción de la catecolamina norepinefrina al medio de cultivo [27, 28]. Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que la infección por *B. pertussis* produce en los macrófagos un aumento de la expresión de SOCS1 y una disminución de la expresión de SOCS3, resultando en una proporción SOCS1/SOCS3 elevada, característica de un fenotipo M2 [29, 30]. Esta polarización a un fenotipo M2, además de generar un ambiente más permisivo para la supervivencia bacteriana [29], estaría induciendo a los macrófagos a sintetizar mayores niveles de norepinefrina, que favorecería la captura de hierro por *B. pertussis* a través de los receptores BfrD y BfrE. De esta manera, al inducir un fenotipo M2 en los macrófagos que infecta, *B. pertussis* no solo genera un nicho intracelular más propicio por la menor actividad bactericida de este fenotipo de macrófagos, sino también porque induce un aumento en la disponibilidad de intermediarios involucrados en la captura de un nutriente vital y de difícil acceso, como es el hierro. Resultados recientes de nuestro grupo (aún no publicados) que muestran una mayor supervivencia de *B. pertussis* en macrófagos polarizados al fenotipo M2 en comparación con macrófagos M1 apoyan esta hipótesis.

Otro tipo celular ampliamente utilizado por patógenos intracelulares para producir infecciones persistentes son las células del epitelio respiratorio. Estas células no están especializadas en la eliminación de patógenos como las células inmunes, siendo por lo

tanto más favorables para el establecimiento de infecciones intracelulares. Sin embargo, al no ser células fagocíticas profesionales, los patógenos en general deben realizar un mecanismo activo para promover su internalización por este tipo celular, en un proceso denominado invasión, generalmente al manipular el citoesqueleto de la célula huésped mediante proteínas efectoras [31]. Existen diferentes patógenos 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, entre los que se encuentran *Mycoplasma pneumoniae* [32], *Burkholderia cepacia* [33], *Haemophilus influenzae* [34], *Mycobacterium tuberculosis* [35], *Francisella tularensis* [36], *Bacillus anthracis* [37] y *Legionella pneumophila* [38]. 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 o para poder diseminarse a otros sitios de infección en el huésped. Existen evidencias que indican que el epitelio respiratorio podría constituir un reservorio intracelular de *B. pertussis* [39]. Trabajos previos mostraron la capacidad de *B. pertussis* de ser internalizada por células epiteliales *in vitro* [40-42]. Asimismo, autopsias de casos fatales de tos convulsa mostraron que este patógeno es capaz de ser internalizado por varios tipos celulares humanos *in vivo*, incluidas las células epiteliales respiratorias [43]. Trabajos previos de nuestro grupo demostraron que *B. pertussis* es capaz de ser internalizada por células del epitelio respiratorio *in vitro* en un mecanismo dependiente del ensamblado de microtúbulos, la integridad de las balsas lipídicas (*lipid rafts*) y la activación de vías de señalización mediadas por tirosina quinasas de la célula huésped [15]. En estos estudios se demostró, además, que las bacterias permanecen viables durante días en localización intracelular con la capacidad de repoblar el medio extracelular [15].

A pesar de la potencial relevancia de la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* dentro de células epiteliales, poco se sabe de los mecanismos que utiliza la bacteria para persistir dentro de este tipo celular, en especial los mecanismos que utiliza para adquirir nutrientes dentro de las mismas. En este capítulo se presentan resultados que muestran el rol de los receptores BfrD y BfrE en la persistencia intracelular de *B. pertussis* en células del epitelio respiratorio, indicando que podrían estar involucrados en la adquisición de hierro en el estadio intracelular en este tipo celular. A diferencia de las células inmunes, no hay estudios que demuestren que las células del epitelio respiratorio sean capaces de sintetizar las catecolaminas norepinefrina o epinefrina, que serían los intermediarios en

la captura de hierro por los receptores BfrD y BfrE. Las únicas células epiteliales de las cuales se ha demostrado la capacidad de síntesis de estas catecolaminas son las células del epitelio amniótico, un tipo de célula madre [44]. Estos resultados cuestionan si el intermediario químico que utilizan los receptores BfrD y BfrE en localización intracelular para obtener hierro sean las catecolaminas nombradas anteriormente. Es posible que el intermediario que utilicen estos receptores en células epiteliales sea otro compuesto, producido por el huésped o la bacteria, que contenga un grupo catecol en su estructura. En efecto, resultados previos muestran que *B. bronchiseptica* utiliza los receptores BfrD y BfrE para obtener hierro no solo a partir de los intermediarios epinefrina y norepinefrina sino también a partir de otros neuroquímicos del huésped, como dopamina y levodopa (L-DOPA) [8]. Además, estos receptores pueden capturar hierro a partir del sideróforo bacteriano enterobactina y su producto de degradación, la 2,3-dihidroxibenzoilserina (DHBS) [8]. Todos estos compuestos comparten la característica de poseer un grupo catecol en su estructura química (**Figura 4.11**). Otras moléculas producidas por el huésped que contienen un grupo catecol y que potencialmente podrían ser intermediarios de la captura de hierro por BfrD y BfrE son el ácido 4,5-dihidroxifenilacético (DOPAC) y el dihidroxifeniletilenglicol (DOPEG) (**Figura 4.11**). Estos compuestos se generan a partir de la degradación de dopamina y norepinefrina por la enzima L-monoamino oxidasa A en conjunto con las enzimas aldehído deshidrogenasa y/o aldosa reductasa [45]. La enzima monoamino oxidasa A se encuentra presente en el tejido pulmonar [46, 47], indicando que tanto el DOPAC como el DOPEG podrían estar en contacto con *B. pertussis* en su estadio intracelular dentro de células del epitelio respiratorio, y que podrían ser usados como intermediarios para la captura de hierro por BfrD y BfrE.

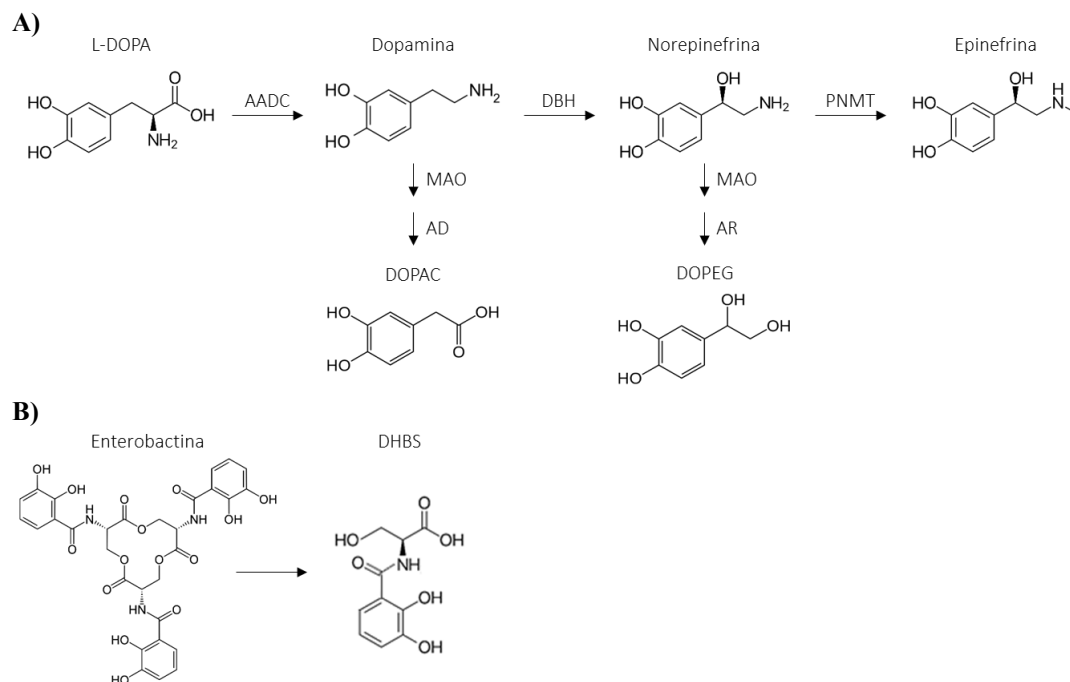


Figura 4.11: Compuestos catecoles posiblemente utilizados por los receptores BfrD y BfrE de *B. pertussis*. **A)** Vía de síntesis y degradación de catecolaminas. L-DOPA: levodopa. AADC: L-aminoácido aromático descarboxilasa. DBH: dopamina β-hidroxisasa. PNMT: feniletanolamina N-metiltransferasa. DOPAC: ácido 4,5-dihidroxisenilacético. DOPEG: dihidroxiseniletilenglicol. MAO: L-monoamino oxidasa. AD: aldehído deshidrogenasa. AR: aldosa reductasa. **B)** Sideróforo enterobactina y su producto de degradación 2,3-dihidroxisenilserina (DHBS).

Los resultados presentados en este capítulo representan los primeros que describen el uso de la línea celular 16HBE14o- como modelo *in vitro* para evaluar la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en células del epitelio respiratorio. Esta línea celular fue establecida a partir de epitelio bronquial de un humano sano, mediante la transfección con el genoma del virus SV40 defectivo en la replicación [16]. Las células 16HBE14o- retienen la morfología y funciones de células epiteliales diferenciadas, incluyendo el crecimiento polarizado, la presencia de uniones estrechas y cilios, la resistencia transepitelial y el flujo direccional de iones [16]. El crecimiento polarizado en esta línea celular es particularmente importante debido a que determina la existencia de una membrana basolateral y una membrana apical, cada una con un conjunto determinado de receptores en su superficie. El tipo de receptores determina la especificidad y el resultado de la interacción célula-patógeno [48-50]. Por esta razón la polarización es particularmente importante en el estudio de la interacción de patógenos con células del epitelio respiratorio. Los estudios realizados previamente para analizar la interacción entre *B. pertussis* y células epiteliales fueron realizados con líneas celulares que no

presentan crecimiento polarizado, como son las células A549 [41] y HeLa [51]. En estos estudios el porcentaje de internalización y persistencia intracelular fue menor que el observado en este estudio con la línea celular 16HBE14o-. Este resultado podría deberse al distinto origen de cada línea o, más probablemente, a que la línea celular 16HBE14o- retiene mayores características de células primarias que las otras líneas celulares nombradas, como es el crecimiento polarizado [16]. Resultados no publicados de nuestro grupo indican que *B. pertussis* se adhiere e internaliza en las células 16HBE14o- fundamentalmente a través de la cara basolateral, probablemente por la presencia de receptores de la membrana celular específicos, potencialmente ausentes en las líneas celulares A549 y HeLa.

Dado que los estudios presentados en este capítulo para evaluar el rol de los receptores BfrD y BfrE en la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* fueron realizados con una cepa mutante defectiva en ambos genes, no es posible afirmar si ambos receptores son requeridos por esta bacteria para persistir intracelularmente o si la expresión de solo uno de ellos es suficiente. Como el gen que codifica el receptor BfrD surgió evolutivamente a partir de una duplicación del gen BfrE [11], y dada la elevada similitud de secuencia de aminoácidos entre ellos, se puede especular que cumplen funciones redundantes. Además, la expresión individual de BfrD o BfrE en una cepa mutante de *B. bronchiseptica* carente de todos los receptores de catecoles (BfrA, BfrD y BfrE) restablece el fenotipo de promoción de crecimiento por norepinefrina en limitación de hierro y presencia de transferrina, confirmando la existencia de redundancia de funciones entre estos receptores [8], una situación que podría ser equivalente en *B. pertussis*.

En relación a la regulación de la expresión de BfrD y BfrE, estudios previos indicaron que la expresión de BfrD es controlada por el sistema de dos componentes BvgAS y que es expresado únicamente por bacterias que se encuentran en fase virulenta (Bvg⁺). Por el contrario, se ha demostrado que la expresión de BfrE es independiente del sistema de dos componentes BvgAS [52, 53]. Estos estudios indican, en concordancia con nuestros resultados, que estos receptores tienen diferentes mecanismos de regulación y que responden a diferentes señales del entorno. Se han publicado resultados controversiales con respecto a la regulación por hierro de estos transportadores, existiendo trabajos que muestran una represión a nivel transcripcional por limitación de hierro de ambos genes [11], mientras que otros trabajos, incluidos resultados de nuestro grupo aun no publicados, muestran un aumento a nivel proteico de ambos transportadores

en las mismas condiciones [54]. En efecto, en este capítulo se presentan resultados que indican que la limitación de hierro produce un aumento en la expresión de los receptores BfrD y BfrE a nivel transcripcional. La discrepancia con resultados publicados previamente se debe muy probablemente a diferencias en los métodos de cultivo utilizados para lograr la limitación en hierro de *B. pertussis*. Cabe señalar que la limitación de hierro en nuestro esquema experimental es comprobada a través de la detección de producción de sideróforos por la bacteria. Además, en los ensayos de evaluación de la expresión génica de BfrD y BfrE se utilizó como control interno la determinación de la expresión del transportador IRP1-3, cuya expresión aumentó como fue reportado previamente tanto en condiciones de limitación de hierro [17] como en ambientes con pH ligeramente ácido [19]. Asimismo, en el estudio del proteoma intracelular de *B. pertussis* presentado en el **Capítulo 3**, se encontró que la expresión de BfrD y BfrE aumenta en fase intracelular. Los resultados presentados en este capítulo muestran que un entorno ligeramente ácido produce un aumento en la expresión del gen *bfrD* y que la baja disponibilidad de hierro induce la expresión de *bfrD* y *bfrE*, dos condiciones que podrían ser encontradas en el entorno intrafagosomal que habita *B. pertussis*. En conjunto, estos resultados sugieren que el pH ambiental así como de la disponibilidad de hierro podrían ser señales que *B. pertussis* percibe para desencadenar una serie de adaptaciones al entorno intracelular, tal como ocurre en otros patógenos [55, 56].

B. pertussis posee otros sistemas de captura de hierro además de los receptores BfrD y BfrE, como son la captura mediada por el sideróforo alcaligina [57], la captura por el xenosideróforo enterobactina [58] y la incorporación de hierro derivado de grupos hemo [59]. Cada uno de estos sistemas se expresa diferencialmente en respuesta a la disponibilidad de la fuente de hierro que capturan mediante un mecanismo que implica reguladores positivos inducibles por sustrato [60]. De esta manera, *B. pertussis* asegura la expresión de cada sistema de forma diferencial de acuerdo a la fuente de hierro disponible de modo de priorizar la expresión de los sistemas más efectivos, adaptándose así al entorno encontrado en el hospedador. Por este motivo, se decidió estudiar si la norepinefrina, un posible sustrato del sistema BfrD/BfrE, era capaz de modificar la expresión de estos genes. Los resultados mostraron que la presencia de norepinefrina no modificó la expresión de *bfrD* ni *bfrE*, sugiriendo que, o bien la transcripción de estos receptores no se induce en respuesta a la presencia de sustrato, o bien que la norepinefrina

no es un intermediario de captura de éstos. También es posible que las condiciones de cultivo utilizadas no sean las indicadas para evidenciar una inducción de la expresión de estos genes por la presencia de norepinefrina. Por otro lado, es interesante destacar que la presencia de neuroquímicos, como la norepinefrina, produce en las bacterias cambios fenotípicos que no están relacionados con el metabolismo de hierro. Por ejemplo, se ha demostrado que la norepinefrina activa el sensor QseC del sistema de respuesta de dos componentes QseBC de *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7, involucrado en el control de la expresión de varios genes de virulencia de esta bacteria y que este efecto puede ser inhibido por bloqueadores β -adrenérgicos [61]. Asimismo, la epinefrina y la norepinefrina inducen la expresión del factor OspA implicado en la colonización de garrapatas por *Borrelia burgdorferi*, el agente causal de la enfermedad de Lyme [62]. La presencia de norepinefrina, por otro lado, induce la expresión de genes relacionados con el SST3 de *Vibrio parahaemolyticus*, cuyos efectores inducen citotoxicidad en las células del hospedador [63]. Queda por investigar si la presencia de neuroquímicos regula mecanismos de virulencia de *B. pertussis* que pudieran influir en la patogénesis de esta bacteria.

B. pertussis puede obtener el hierro secuestrado por las glicoproteínas transferrina y lactoferrina a través del sideróforo alcaligina y posiblemente también a partir de las catecolaminas sintetizadas por el huésped, en un mecanismo que involucraría los receptores BfrD y BfrE. El receptor de membrana externa FauA de *B. pertussis* es el encargado de capturar la alcaligina una vez que la misma se ha unido al hierro [64]. El hierro tomado por FauA de la alcaligina es a su vez derivado exclusivamente al receptor periplásmico AfuA, que transporta este ion al citoplasma de la bacteria [65]. El análisis del proteoma intracelular de *B. pertussis* indica que la expresión de AfuA disminuye fuertemente a tiempos cortos post infección y a tiempos tardíos no es posible detectar esta proteína, sugiriendo el apagado de este gen en estadio intracelular (**Capítulo 3**). No es posible especular sobre la posible síntesis de alcaligina en el estadio intracelular de *B. pertussis* ya que en el estudio proteómico no se identificó ninguna de las proteínas involucradas en la síntesis de este sideróforo, como así tampoco del receptor FauA. Sin embargo, en caso de que *B. pertussis* secrete alcaligina en estadio intracelular como estrategia para poder capturar el hierro contenido en las glicoproteínas transferrina y lactoferrina, el hierro capturado por este sideróforo no podría ser incorporado eficientemente por la bacteria, debido a la falta de expresión de AfuA. Además, una de

las estrategias de los macrófagos para limitar el crecimiento de patógenos es la síntesis de lipocalina-2, una proteína que captura sideróforos bacterianos [66, 67]. Es posible especular que la presencia de lipocalina-2 en el nicho intracelular de *B. pertussis* sea el motivo evolutivo por el cual AfuA, y presuntamente también la síntesis de alcaligina, esté apagada en el estadio intracelular. Si hubiera producción de sideróforos éstos podrían ser interceptados por esta proteína del huésped. Por el contrario, la capacidad de utilizar las catecolaminas del huésped como xenosideróforos a través de BfrD y BfrE parece una característica evolutiva beneficiosa y acorde a los resultados encontrados en este trabajo en el que se observan niveles elevados de expresión de ambos receptores en el estadio intracelular y evidencia de que cumplen un rol en este proceso infeccioso. En suma, al utilizar como sideróforos moléculas sintetizadas por el propio huésped como las catecolaminas *B. pertussis* contrarresta este mecanismo de defensa de los macrófagos.

Si bien en este capítulo se han caracterizado a los receptores BfrD y BfrE como posibles receptores de hierro a partir de catecolaminas en el estadio intracelular de *B. pertussis*, también es posible que sean funcionales en su estadio extracelular. En situaciones de estrés, como la infección, hay un aumento sustancial de catecolaminas presentes en el espacio pulmonar, debido al extensivo flujo de sangre y la abundancia de innervaciones de nervios noradrenérgicos en este órgano [1]. Estas catecolaminas secretadas al medio extracelular podrían ser utilizadas por *B. pertussis* para obtener el hierro de la lactoferrina, la principal glicoproteína secuestrante de hierro de las secreciones pulmonares, o bien de la transferrina una vez que se haya producido suficiente daño a nivel del epitelio respiratorio por causa de la infección.

Es interesante destacar que los receptores BfrD y BfrE parecen no ser necesarios para la persistencia intracelular de *B. pertussis* a tiempos tardíos de infección en macrófagos. Es posible que esta bacteria, a través de proteínas efectoras, sea capaz de inhibir los mecanismos de retención de hierro de los macrófagos, con lo cual a tiempos largos post infección su sobrevivencia no esté limitada por la disponibilidad de este nutriente. Estudios previos han demostrado que los patógenos intervienen en la homeostasis del hierro en las células que infectan favoreciendo así su acceso a este nutriente. Por ejemplo, la infección de fibroblastos humanos con el parásito *Toxoplasma gondii* [68] o la infección de macrófagos con las bacterias intracelulares *Ehrlichia chaffeensis* [69], *Ehrlichia sennetsu*, [69], *Francisella tularensis* [70] o *Coxiella burnetii* [71] produce un aumento en los niveles del receptor de transferrina (TfR) en las células infectadas, en un

mecanismo dependiente de la viabilidad de estos patógenos. Asimismo, el aumento observado en los niveles de TfR en los macrófagos infectados por *F. tularensis* o *C. burnetii* produce a su vez un aumento en los niveles celulares de hierro, incrementando así la disponibilidad de este nutriente [70, 71]. Nuestro grupo ha demostrado que *B. pertussis* es capaz de inhibir la respuesta bactericida y proinflamatoria de los macrófagos infectados, principalmente a partir de la acción de las toxinas pertussis (PT) y adenilato ciclasa (CyaA) [29]. Actualmente se están llevando a cabo estudios para analizar si esta manipulación de la respuesta del macrófago también involucra los mecanismos de retención de hierro, con el posible aumento en los niveles disponibles de este nutriente y su relación con la cinética de infección intracelular.

Otra explicación a la falta de diferencias encontradas a tiempos tardíos post infección en macrófagos entre la cepa salvaje y mutante en BfrD/BfrE podría ser que la cepa $\Delta bfrDE$ se adapte al ambiente intracelular encontrado en macrófagos a través de la eventual expresión de otros sistemas de captura de hierro que podrían compensar la falta de BfrD/BfrE. En este sentido, estudios previos indican que el transportador de hierro IRP1-3 es activado en un entorno ligeramente ácido [19], como el encontrado dentro del fagosoma que contiene a *B. pertussis*. Si bien los estudios de proteómica no demostraron un aumento significativo en la expresión de este receptor en bacterias intracelulares, se identificó la expresión de IRP1-3 a las 48 h post infección, sugiriendo una expresión tardía de este receptor en el entorno intracelular que avalaría la hipótesis anteriormente mencionada. Asimismo, se debe tener en cuenta que el estudio proteómico corresponde a la adaptación intracelular de la cepa salvaje y es posible que este mecanismo compensatorio ocurra en mayor medida en situaciones donde el sustrato que capturan BfrD/BfrE no se encuentre disponible. En este contexto, en el siguiente capítulo se analiza el rol del transportador IRP1-3 en la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en células del hospedador.

4.4. Conclusiones

Los resultados presentados en este capítulo indican que los receptores de hierro BfrD y BfrE están involucrados en la persistencia intracelular de *B. pertussis* en macrófagos y en células del epitelio respiratorio de origen humano. Asimismo, sugieren que esta bacteria utiliza mecanismos compensatorios para la captura de hierro en ausencia de BfrD/BfrE durante su persistencia en macrófagos. Por último, se observó que los genes que codifican para los receptores BfrD y BfrE están regulados por la disponibilidad de hierro y por el pH ambiental.

4.5. Referencias

1. Lyte M. Microbial Endocrinology in the Pathogenesis of Infectious Disease. *Microbiol Spectr.* 2016,4(2).
2. Lyte M, Ernst S. Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Sci.* 1992,50(3):203-212.
3. Freestone PP, Lyte M, Neal CP, Maggs AF, Haigh RD, Williams PH. The mammalian neuroendocrine hormone norepinephrine supplies iron for bacterial growth in the presence of transferrin or lactoferrin. *J Bacteriol.* 2000,182(21):6091-6098.
4. Sandrini SM, Shergill R, Woodward J, Muralikuttan R, Haigh RD, Lyte M, Freestone PP. Elucidation of the mechanism by which catecholamine stress hormones liberate iron from the innate immune defense proteins transferrin and lactoferrin. *J Bacteriol.* 2010,192(2):587-594.
5. Gorrige AR, Woods G, Robinson A. Growth and siderophore production by *Bordetella pertussis* under iron-restricted conditions. *FEMS Microbiol Lett.* 1990,54(1-3):101-105.
6. Menozzi FD, Gantiez C, Loch C. Identification and purification of transferrin- and lactoferrin-binding proteins of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* 1991,59(11):3982-3988.
7. Anderson MT, Armstrong SK. Norepinephrine mediates acquisition of transferrin-iron in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol.* 2008,190(11):3940-3947.
8. Armstrong SK, Brickman TJ, Suhadolc RJ. Involvement of multiple distinct *Bordetella* receptor proteins in the utilization of iron liberated from transferrin by host catecholamine stress hormones. *Mol Microbiol.* 2012,84(3):446-462.
9. Anderson MT, Armstrong SK. The *Bordetella* bfe system: growth and transcriptional response to siderophores, catechols, and neuroendocrine catecholamines. *J Bacteriol.* 2006,188(16):5731-5740.
10. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MT, y col. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet.* 2003,35(1):32-40.
11. Brickman TJ, Suhadolc RJ, Armstrong SK. Interspecies variations in *Bordetella* catecholamine receptor gene regulation and function. *Infect Immun.* 2015,83(12):4639-4652.
12. Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovics ML, Harvill ET, Rodriguez ME. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun.* 2010,78(3):907-913.
13. Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang M, Sarma JV, Ward PA. Catecholamines-crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening pandora's box? *Mol Med.* 2008,14(3-4):195-204.
14. Inatsuka CS, Xu Q, Vujkovic-Cvijin I, Wong S, Stibitz S, Miller JF, Cotter PA. Pertactin is required for *Bordetella* species to resist neutrophil-mediated clearance. *Infect Immun.* 2010,78(7):2901-2909.
15. Lamberti Y, Gorgojo J, Massillo C, Rodriguez ME. *Bordetella pertussis* entry into respiratory epithelial cells and intracellular survival. *Pathog Dis.* 2013,69(3):194-204.
16. Cozens AL, Yezzi MJ, Kunzelmann K, Ohrui T, Chin L, Eng K, Finkbeiner WE, Widdicombe JH, Gruenert DC. CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994,10(1):38-47.
17. Vidakovics ML, Paba J, Lamberti Y, Ricart CA, de Sousa MV, Rodriguez ME. Profiling the *Bordetella pertussis* proteome during iron starvation. *J Proteome Res.* 2007,6(7):2518-2528.
18. Huynh KK, Grinstein S. Regulation of vacuolar pH and its modulation by some microbial species. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007,71(3):452-462.

19. Brickman TJ, Armstrong SK. Iron and pH-responsive FtrABCD ferrous iron utilization system of *Bordetella* species. *Mol Microbiol.* 2012,86(3):580-593.
20. Skaar EP. The Battle for Iron between Bacterial Pathogens and Their Vertebrate Hosts. *PLoS Path.* 2010,6(8):e1000949.
21. Rush RA, Geffen LB. Dopamine beta-hydroxylase in health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1980,12(3):241-277.
22. Pacholczyk T, Blakely RD, Amara SG. Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature.* 1991,350(6316):350-354.
23. Torres GE, Gainetdinov RR, Caron MG. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci.* 2003,4(1):13-25.
24. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of Clinical Investigation.* 2012,122(3):787-795.
25. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008,8(12):958-969.
26. Mills C. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. 2012,32(6):463-488.
27. Nguyen KD, Qiu Y, Cui X, Goh YP, Mwangi J, David T, Mukundan L, Brombacher F, Locksley RM, Chawla A. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature.* 2011,480(7375):104-108.
28. Spengler RN, Chensue SW, Giacherio DA, Blenk N, Kunkel SL. Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor-alpha production from macrophages in vitro. *J Immunol.* 1994,152(6):3024-3031.
29. Valdez HA, Oviedo JM, Gorgojo JP, Lamberti Y, Rodriguez ME. *Bordetella pertussis* modulates human macrophage defense gene expression. *Pathog Dis.* 2016,74(6).
30. Wilson HM. SOCS Proteins in Macrophage Polarization and Function. *Front Immunol.* 2014,5:357.
31. Ribet D, Cossart P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microb Infect.* 2015,17(3):173-183.
32. Yavlovich A, Tarshis M, Rottem S. Internalization and intracellular survival of *Mycoplasma pneumoniae* by non-phagocytic cells. *FEMS Microbiol Lett.* 2004,233(2):241-246.
33. Martin DW, Mohr CD. Invasion and intracellular survival of *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun.* 2000,68(1):24-29.
34. Morey P, Cano V, Marti-Llitas P, Lopez-Gomez A, Regueiro V, Saus C, Bengoechea JA, Garmendia J. Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells. *Microbiology.* 2011,157(Pt 1):234-250.
35. Bermudez LE, Goodman J. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun.* 1996,64(4):1400-1406.
36. Hall JD, Craven RR, Fuller JR, Pickles RJ, Kawula TH. *Francisella tularensis* replicates within alveolar type II epithelial cells in vitro and in vivo following inhalation. *Infect Immun.* 2007,75(2):1034-1039.
37. Russell BH, Vasan R, Keene DR, Koehler TM, Xu Y. Potential dissemination of *Bacillus anthracis* utilizing human lung epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2008,10(4):945-957.
38. Mody CH, Paine R, 3rd, Shahrabadi MS, Simon RH, Pearlman E, Eisenstein BI, Toews GB. *Legionella pneumophila* replicates within rat alveolar epithelial cells. *J Infect Dis.* 1993,167(5):1138-1145.
39. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev.* 2005,18(2):326-382.
40. Gueirard P, Bassinet L, Bonne I, Prevost MC, Guiso N. Ultrastructural analysis of the interactions between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* and human tracheal epithelial cells. *Microb Pathog.* 2005,38(1):41-46.

41. Ishibashi Y, Relman DA, Nishikawa A. Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and alpha5beta1 integrin. *Microb Pathog.* 2001,30(5):279-288.
42. Bassinet L, Gueirard P, Maitre B, Housset B, Gounon P, Guiso N. Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 2000,68(4):1934-1941.
43. Paddock CD, Sanden GN, Cherry JD, Gal AA, Langston C, Tatti KM, Wu KH, y col. Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin Infect Dis.* 2008,47(3):328-338.
44. Elwan MA, Sakuragawa N. Evidence for synthesis and release of catecholamines by human amniotic epithelial cells. *Neuroreport.* 1997,8(16):3435-3438.
45. Goldstein DS, Eisenhofer G, Kopin IJ. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003,305(3):800-811.
46. Saura J, Nadal E, Van den Berg B, Vila M, Bombi J, Mahy N. Localization of monoamine oxidases in human peripheral tissues. *Life Sci.* 1996,59(16):1341-1349.
47. Lewinsohn R, Glover V, Sandler M. Development of benzylamine oxidase and monoamine oxidase A and B in man. *Biochem Pharmacol.* 1980,29(9):1221-1230.
48. Bucior I, Mostov K, Engel JN. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated damage requires distinct receptors at the apical and basolateral surfaces of the polarized epithelium. *Infect Immun.* 2010,78(3):939-953.
49. Fleiszig S, Evans DJ, Do N, Vallas V, Shin S, Mostov KE. Epithelial cell polarity affects susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* invasion and cytotoxicity. *Infect Immun.* 1997,65(7):2861-2867.
50. Kim K, Kim KP, Choi J, Lim JA, Lee J, Hwang S, Ryu S. Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol.* 2010,76(15):5188-5198.
51. Ewanowich CA, Melton AR, Weiss AA, Sherburne RK, Peppler MS. Invasion of HeLa 229 cells by virulent *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1989,57(9):2698-2704.
52. Coutte L, Huot L, Antoine R, Slupek S, Merkel TJ, Chen Q, Stibitz S, Hot D, Loch C. The multifaceted RisA regulon of *Bordetella pertussis*. *Sci Rep.* 2016,6:32774.
53. Antoine R, Alonso S, Raze D, Coutte L, Lesjean S, Willery E, Loch C, Jacob-Dubuisson F. New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 2000,182(20):5902-5905.
54. Passerini de Rossi BN, Friedman LE, Belzoni CB, Savino S, Arico B, Rappuoli R, Masignani V, Franco MA. Vir90, a virulence-activated gene coding for a *Bordetella pertussis* iron-regulated outer membrane protein. *Res Microbiol.* 2003,154(6):443-450.
55. Altamirano-Silva P, Meza-Torres J, Castillo-Zeledón A, Ruiz-Villalobos N, Zuñiga-Pereira AM, Chacón-Díaz C, Moreno E, Guzmán-Verri C, Chaves-Olarte E. *Brucella abortus* senses the intracellular environment through the two-component system BvrR/BvrS allowing the adaptation to its replicative niche. *Infect Immun.* 2018:IAI.00713-00717.
56. Roset M, Alefantis T, DelVecchio V, Briones G. Iron-dependent reconfiguration of the proteome underlies the intracellular lifestyle of *Brucella abortus*. *Scientific reports.* 2017,7(1):10637.
57. Moore CH, Foster LA, Gerbig DG, Jr., Dyer DW, Gibson BW. Identification of alcaligin as the siderophore produced by *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *J Bacteriol.* 1995,177(4):1116-1118.
58. Beall B, Sanden GN. A *Bordetella pertussis* fepA homologue required for utilization of exogenous ferric enterobactin. *Microbiology.* 1995,141 (Pt 12):3193-3205.
59. Vanderpool CK, Armstrong SK. The *Bordetella* bhu locus is required for heme iron utilization. *J Bacteriol.* 2001,183(14):4278-4287.

60. Brickman TJ, Armstrong SK. Temporal signaling and differential expression of *Bordetella* iron transport systems: the role of ferrimones and positive regulators. *BioMetals*. 2009,22(1):33-41.
61. Clarke MB, Hughes DT, Zhu C, Boedeker EC, Sperandio V. The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006,103(27):10420-10425.
62. Scheckelhoff MR, Telford SR, Wesley M, Hu LT. *Borrelia burgdorferi* intercepts host hormonal signals to regulate expression of outer surface protein A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007,104(17):7247-7252.
63. Nakano M, Takahashi A, Sakai Y, Nakaya Y. Modulation of pathogenicity with norepinephrine related to the type III secretion system of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Infect Dis*. 2007,195(9):1353-1360.
64. Brickman TJ, Armstrong SK. Essential role of the iron-regulated outer membrane receptor FauA in alcaligin siderophore-mediated iron uptake in *Bordetella* species. *J Bacteriol*. 1999,181(19):5958-5966.
65. Banerjee S, Weerasinghe AJ, Parker Siburt CJ, Kreulen RT, Armstrong SK, Brickman TJ, Lambert LA, Crumbliss AL. *Bordetella pertussis* FbpA binds both unchelated iron and iron siderophore complexes. *Biochemistry*. 2014,53(24):3952-3960.
66. Nairz M, Fritsche G, Brunner P, Talasz H, Hantke K, Weiss G. Interferon-gamma limits the availability of iron for intramacrophage *Salmonella typhimurium*. *Eur J Immunol*. 2008,38(7):1923-1936.
67. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S, Aderem A. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*. 2004,432(7019):917-921.
68. Gail M, Gross U, Bohne W. Transferrin receptor induction in *Toxoplasma gondii*-infected HFF is associated with increased iron-responsive protein 1 activity and is mediated by secreted factors. *Parasitol Res*. 2004,94(3):233-239.
69. Barnewall RE, Ohashi N, Rikihisa Y. *Ehrlichia chaffeensis* and *E. sennetsu*, but not the human granulocytic ehrlichiosis agent, colocalize with transferrin receptor and up-regulate transferrin receptor mRNA by activating iron-responsive protein 1. *Infect Immun*. 1999,67(5):2258-2265.
70. Pan X, Tamilselvam B, Hansen EJ, Daefler S. Modulation of iron homeostasis in macrophages by bacterial intracellular pathogens. *BMC Microbiol*. 2010,10(1):64.
71. Howe D, Mallavia LP. *Coxiella burnetii* infection increases transferrin receptors on J774A. 1 cells. *Infect Immun*. 1999,67(7):3236-3241.

Capítulo 5

**Análisis del rol del transportador de
hierro periplásmico IRP1-3 en la
infección intracelular de *B. pertussis***

5. Análisis del rol del transportador de hierro periplásmico IRP1-3 en la infección intracelular de *B. pertussis*

5.1. Introducción

El hierro es un elemento fundamental para la mayoría de los organismos vivos ya que es cofactor de un gran número de enzimas involucradas en procesos celulares diversos que incluyen la transferencia de electrones, la respiración celular, la duplicación del ADN, el transporte de oxígeno y la protección contra el estrés oxidativo [1, 2]. Como excepción a la necesidad de hierro se encuentra *Borrelia burgdorferi*, el agente causal de la enfermedad de Lyme, un microorganismo que no necesita hierro para su crecimiento ya que es capaz de sustituirlo por manganeso en sus metaloenzimas [3]. La utilidad biológica del hierro reside en su capacidad de alternar entre los estados de oxidación ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}) [4]. De esta manera, puede ser utilizado como un catalizador redox, aceptando o donando electrones, según sea necesario. El hierro también es responsable de generar toxicidad celular ya que puede catalizar la reacción de Fenton a partir de intermedios reactivos de oxígeno, que se generan por la actividad metabólica celular, para generar radicales hidroxilo altamente reactivos que dañan los lípidos, el ADN y las proteínas [4]. Por lo tanto, la concentración y distribución del hierro debe ser controlado de manera precisa por los seres vivos. Aunque el hierro es abundante en la Tierra, su solubilidad es muy baja a pH fisiológico en ambientes aeróbicos, esto se debe a que la presencia de oxígeno convierte rápidamente el hierro Fe^{3+} , altamente soluble en agua, en hidratos de óxido de hierro Fe^{2+} , extremadamente insolubles [2]. Debido a su baja solubilidad y a su potencial toxicidad, los seres vivos han evolucionado mecanismos diversos para poder captar este metal de forma eficiente y almacenarlo en forma segura. La mayoría del hierro presente en los vertebrados se encuentra quelado en la proteína de almacenamiento de hierro intracelular ferritina o formando parte del grupo hemo como un cofactor de la hemoglobina o la mioglobina. A su vez, en el medio extracelular, las proteínas transferrina y lactoferrina unen hierro con una afinidad muy elevada, determinando que la cantidad de hierro disponible para las bacterias invasoras sea mucho menor de lo que se requiere para promover su crecimiento [1]. Estos mecanismos activos de retención de hierro para prevenir el crecimiento bacteriano, junto con el secuestro de

zinc y manganeso, forman parte de una de las primeras líneas de defensa del huésped contra la infección bacteriana denominada inmunidad nutricional [5].

Para sobrevivir y competir, los microorganismos poseen múltiples estrategias para obtener hierro y estos sistemas son esenciales para la patogenicidad bacteriana [2, 6]. Se conocen cuatro tipos de estrategias de adquisición de hierro en microorganismos: la captura mediada por sideróforos, la expresión de receptores de grupos hemo, la expresión de receptores de transferrina o lactoferrina, y los sistemas de adquisición de Fe^{2+} libre. Los sideróforos son compuestos quelantes de hierro de bajo peso molecular que son secretados por las bacterias y se unen a Fe^{3+} con una afinidad que supera a la transferrina y la lactoferrina [7]. El complejo sideróforo-hierro posee un tamaño que impide su difusión a través de las porinas presentes en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, por lo que el transporte de este complejo hacia el interior de la célula es mediado a través de receptores específicos de membrana externa dependientes de la energía proporcionada por el complejo TonB-ExbB-ExbD [8]. El periplasma de bacterias Gram-negativas carece de ATP o gradientes iónicos que puedan impulsar el transporte a través de la membrana externa. El sistema TonB-ExbB-ExbD utiliza la energía del gradiente electroquímico generada en la membrana interna para producir una remodelación mecánica de los receptores de membrana externa dependientes de TonB y promover el transporte de sideróforos hacia el periplasma bacteriano [8, 9]. En el periplasma, el complejo sideróforo-hierro es reconocido y transportado al citoplasma principalmente por transportadores ABC. Estos sistemas están constituidos por una proteína periplásmica de unión a sustrato, que reconoce al complejo sideróforo-hierro y lo transfiere a una permeasa presente en la membrana citoplasmática encargada de transportar el complejo al citoplasma utilizando la energía de una proteína asociada con función ATPasa [10]. Alternativamente, los sideróforos pueden ser transportados por permeasas presentes en la membrana citoplasmática dependientes de la fuerza protón-motriz [2, 11, 12]. Una vez en el citoplasma, el Fe^{3+} de los sideróforos se libera a través de la degradación enzimática de los mismos o mediante la reducción del hierro unido a Fe^{2+} , por el cual los sideróforos tienen baja afinidad [7]. Otro mecanismo para la liberación de hierro de los sideróforos recientemente caracterizado en *Pseudomonas aeruginosa* consiste en la reducción del hierro unido al sideróforo pioverdina directamente en el periplasma. Las proteínas periplásmicas FpvC y FpvF se unen al complejo pioverdina-hierro, produciendo la reducción de hierro de (III) a (II), y el Fe^{2+} liberado es transportado

al citoplasma a través del transportador FpvCDE de tipo ABC [2, 13, 14]. En este mecanismo el sideróforo no ingresa al citoplasma y es liberado al medio extracelular para ser reutilizado [15].

Es importante destacar que si bien los receptores de complejos sideróforo-hierro de membrana externa son específicos para el sideróforo que capturan, el transporte del complejo sideróforo-hierro del periplasma al citoplasma mediado por transportadores ABC es más flexible en cuanto a especificidad de sustrato [8]. Por ejemplo, a pesar de que *Escherichia coli* K-12 posee seis receptores de sideróforo-hierro de membrana externa, sólo posee tres transportadores ABC periplásmicos de unión a estos complejos. En efecto, el receptor FhuD periplásmico de *E. coli* interacciona específicamente con el complejo formado entre el hierro y los grupos hidroxamato presentes en diversos sideróforos, sin intervenir el resto de la estructura del sideróforo en esta interacción. Esto permite a este receptor periplásmico reconocer varios tipos de sideróforos de tipo hidroxamato. Esta situación parece más extrema en *P. aeruginosa*, cuyo genoma codifica para 35 receptores de membrana externa de sideróforos-hierro pero sólo para 4 potenciales transportadores ABC [8].

Otra estrategia utilizada por microorganismos para captar hierro en el hospedador es la adquisición de grupos hemo. El primer paso en el transporte de hemo incluye la unión de hemo, hemoglobina o complejos de hemoglobina-haptoglobina, a receptores de membrana externa dependientes de TonB. El hemo luego es extraído de la hemoglobina y transferido a una proteína periplásmica de unión a grupos hemo asociada con un transportador de la familia ABC que interviene en la translocación del mismo al citoplasma. Además de los receptores unidos a la superficie, algunas bacterias producen proteínas secretadas que unen hemo, que se conocen como hemóforos y son funcionalmente análogos a los sideróforos [16]. Una vez que se unen al hemo, los hemóforos son reconocidos por los receptores específicos de membrana externa y el hemo se internaliza. Tras la translocación al citoplasma bacteriano, el hemo se degrada enzimáticamente con la consiguiente liberación de hierro.

Algunas bacterias también expresan receptores para proteínas de unión a hierro del hospedador, como es el caso de los receptores de transferrina y lactoferrina encontrados en *Neisseria spp.*, *Moraxella catarrhalis* y *Haemophilus influenzae* [17, 18]. Estos receptores dependientes de TonB se unen a transferrina o a lactoferrina, y extraen

el Fe^{3+} unido a las mismas, que luego es transportado a través de la membrana externa hacia el periplasma.

Por último, las bacterias también cuentan con transportadores de Fe^{2+} , que puede ser incorporado sin el uso de intermediarios debido a que este estado de oxidación es relativamente soluble [19]. La estabilidad del estado Fe^{2+} es favorecida en condiciones anaeróbicas o de pH ácido [19]. Se han descrito al menos tres clases diferentes de transportadores de Fe^{2+} en bacterias patógenas de mamíferos: el sistema Feo [19], los sistemas de tipo Yfe / Sit (algunos de los cuales también transportan Mn^{2+}) [20], y los sistemas FtrABCD, EfeUOB y FetMP compuestos por ortólogos de la permeasa de hierro eucariótica Ftr1p [21, 22]. Los sistemas de transporte de Fe^{2+} son requeridos para la colonización del huésped por *Escherichia coli* K-12 [23] y *Salmonella* Typhimurium [24], que habitan el ambiente anaeróbico del intestino, y por *Helicobacter pylori* [25], que coloniza el entorno ácido del estómago. Otro ambiente donde los patógenos pueden encontrar hierro ferroso libre es el entorno intracelular de las células del huésped. Debido a que el citosol contiene agentes reductores tales como glutatión, puede existir hierro libre en la forma ferrosa [26]. A pesar que la mayor parte del hierro dentro de la célula se encuentra en complejos, lo que determina una concentración baja de hierro ferroso intracelular libre, varios patógenos dependen de la actividad de transportadores de Fe^{2+} para su supervivencia o replicación intracelular, como es el caso de *Shigella flexneri* [27], *Yersinia pestis* [28], *Legionella pneumophila* [29], *Campylobacter jejuni* [30], *Francisella tularensis* [31] y *Brucella abortus* [32].

Los huéspedes han evolucionado mecanismos de respuesta que interfieren con los sistemas de captura de hierro de los patógenos y limitan así su crecimiento. En respuesta a la presencia de un patógeno se exacerban los mecanismos de retención de hierro [33]. Por ejemplo, la activación de los macrófagos del huésped por la citoquina IFN- γ , inducida generalmente en un proceso infeccioso, limita la disponibilidad de hierro a las bacterias que habitan compartimentos fagosomales dentro de estas células inmunes. Esto ocurre debido a que esta citoquina reprime la expresión de receptores de transferrina (TfR), que incorpora hierro a la célula, en la superficie de los macrófagos [34] y estimula al transportador DMT-1 para exportar cationes divalentes, incluido el hierro, fuera de los compartimentos fagosomales [35]. El IFN- γ también estimula la expresión del exportador de hierro Ferroportina-1 que provoca un aumento en el eflujo de hierro fuera de los macrófagos [36] y una disminución de las reservas intracelulares de ferritina [37].

Asimismo, la activación de macrófagos por esta citoquina aumenta la producción de Lipocalina-2, una proteína que captura sideróforos bacterianos [36, 38]. Se ha demostrado que la infección por *B. pertussis* tanto en humanos como en un modelo de infección de babuinos cursa con una respuesta proinflamatoria caracterizada por niveles elevados de IL-17 e IFN- γ [39-41]. Por este motivo, es probable que durante la infección del huésped *B. pertussis* interactúe con macrófagos activados por estas citoquinas proinflamatorias.

Tal como fue mencionado en la Introducción (**Capítulo 1**), *B. pertussis* posee varios sistemas que permiten la adquisición de hierro en el hospedador (**Figura 5.1**). Entre ellos se encuentra la producción del sideróforo alcaligina [42], el sistema de captura de xenosideróforos Bfe [43], el sistema de captura de hemo Bhu [44], los receptores de catecolaminas BfrD y BfrE [45], y el sistema Ftr de captura de Fe²⁺ que incluye al transportador IRP1-3 [46] (**Figura 5.1**). El análisis del genoma de *B. pertussis* indica que este microorganismo carece de genes que codifiquen receptores para lactoferrina o transferrina [47]. Sin embargo, este patógeno es capaz de capturar el hierro unido a estas proteínas a través del sideróforo alcaligina y probablemente también a través de las catecolaminas del huésped, según los estudios detallados en el capítulo anterior y resultados de otros grupos [45, 48, 49]. Los sistemas de captura de hierro que utilizan alcaligina, xenosideróforos o los transportadores de Fe³⁺ libre convergen en un receptor periplasmático denominado AfuA (o FbpA), que es parte de un sistema de la familia ABC requerido para transportar este metal desde los receptores de membrana externa hacia el citoplasma [50, 51] (**Figura 5.1**). En lo que se refiere a los receptores BfrD y BfrE, aún no se ha identificado el receptor periplásmico que transporta el hierro que capturan de las catecolaminas hacia el citoplasma.

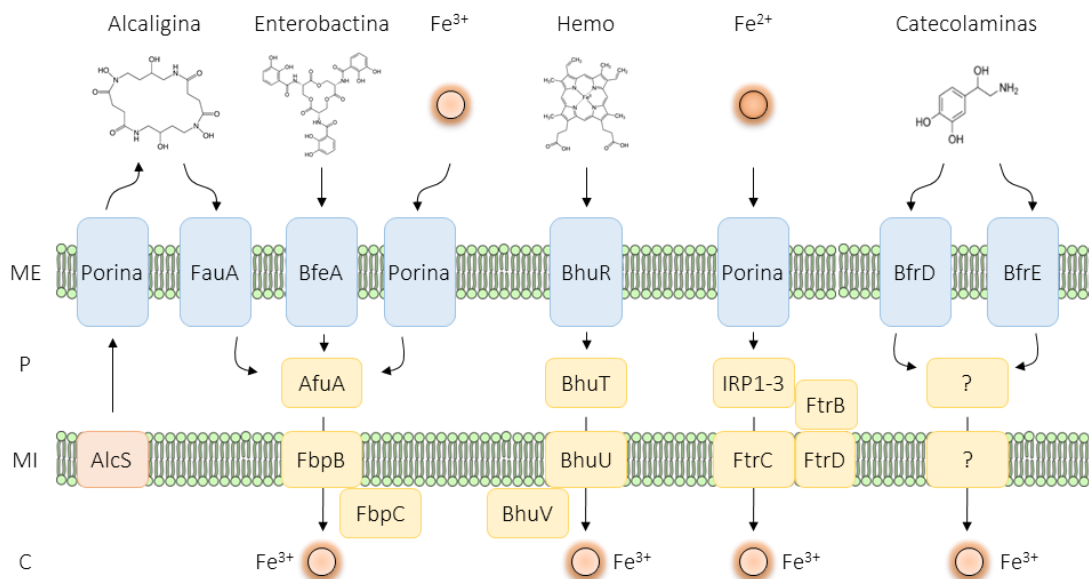


Figura 5.1. Sistemas de captura de hierro presentes en *B. pertussis*. *B. pertussis* sintetiza el sideróforo tipo hidroxamato alcaligina, que es liberado al medio extracelular a través de la permeasa de membrana interna AlcS y a una porina de membrana externa. El complejo alcaligina-hierro es capturado por el receptor de membrana externa FauA. Asimismo, *B. pertussis* puede capturar xenosideróforos como la enterobactina a partir del receptor de membrana externa BfeA. El Fe³⁺ libre ingresa al periplasma de *B. pertussis* a través de porinas presentes en la membrana externa. La proteína periplásmica AfuA captura el Fe³⁺ proveniente de FauA, BfeA y las porinas. En conjunto con la permeasa FbpB de membrana interna y la ATPasa FbpC, AfuA transporta el Fe³⁺ periplásmico al citoplasma. *B. pertussis* puede capturar grupos hemo a través del receptor de membrana externa BhuR. El hemo es transportado del periplasma al citoplasma por el sistema BhuTUV de la familia de transportadores ABC. El Fe²⁺ ingresa al periplasma de *B. pertussis* a través de porinas, en donde es capturado por el sistema FtrABCD (FtrA o IRP1-3), que transporta el hierro al citoplasma en un mecanismo que involucra la oxidación del hierro a Fe³⁺. Los receptores BfrD y BfrE capturan complejos hierro-catecolaminas. El transportador periplásmico asociado a BfrD y BfrE no ha sido identificado. Los receptores de membrana externa FauA, BfeA, BhuR, BfrD y BfrE utilizan la energía provista por el complejo TonB-ExbB-ExbD para transportar sus sustratos al periplasma (no se muestra). ME: membrana externa. P: periplasma. MI: membrana interna. C: citoplasma.

El receptor IRP1-3 fue identificado por primera vez por nuestro grupo en un estudio del proteoma de *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro [52]. Posteriormente, Brickman y col. nombraron a esta proteína como FtrA puesto que encontraron que forma parte de un sistema transportador de Fe²⁺ codificado en el operón *ftrABCD* de *B. pertussis* [46]. Según sus resultados, IRP1-3 o FtrA es miembro de una familia de proteínas periplásmicas bacterianas cuya función estaría relacionada con el transporte de alta afinidad de hierro ferroso. FtrB es una proteína hipotética con un dominio de cupredoxina, lo que sugiere una función redox que involucra cobre. FtrB

podría funcionar como una ferroxidasa en el transporte de hierro ferroso análoga a la de la proteína EfeO, que contiene un dominio de cupredoxina N-terminal homólogo a FtrB, y se requiere para el transporte de hierro a través del sistema de transporte de hierro ferroso EfeUOB de *E. coli* O157: H7 [21, 53]. La homología de secuencias sugiere que, al igual que EfeUOB, el sistema IRP1-3 / FtrABCD podría oxidar el Fe(II) a Fe(III) en el periplasma previo a su transporte hacia el citoplasma. IRP1-3 y FtrB tienen péptidos señal en sus respectivas secuencias que sugiere una localización periplásmica, aunque resultados de nuestro grupo indican que al menos IRP1-3 está parcialmente expuesta en la membrana externa [54]. FtrC es una proteína de membrana interna hipotética de la familia transportadora de hierro ferroso dependiente de oxidasa (OFeT) [55], y es similar a la proteína de permeasa de transporte de hierro Ftr1p de *S. cerevisiae* y al transportador de hierro ferroso EfeU de *E. coli*. FtrD es una poliferredoxina 4Fe-4S que probablemente medie la oxidación de FtrB para restaurar su capacidad ferroxidasa. La **Figura 5.2** muestra el posible mecanismo de funcionamiento del transportador IRP1-3 / FtrABCD de *B. pertussis*.

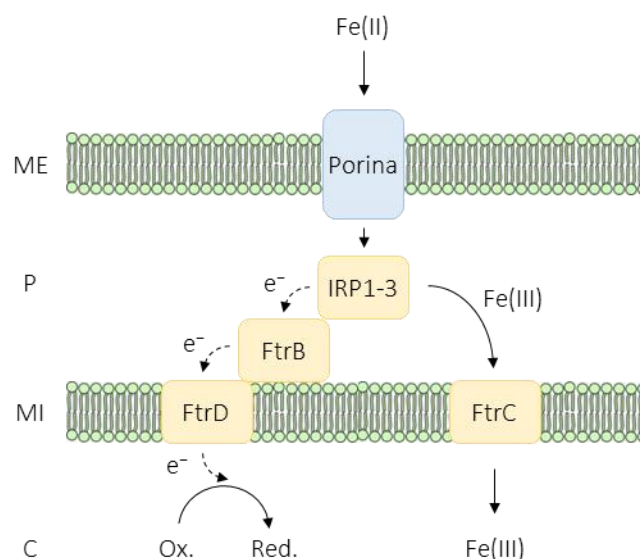


Figura 5.2. Modelo hipotético para la utilización del hierro ferroso dependiente del sistema IRP1-3 / FtrABCD. El hierro ferroso se internaliza a través de porinas en la membrana externa y es capturado por la proteína IRP1-3 (también llamada FtrA) de unión a hierro ferroso en el periplasma. IRP1-3 podría estar expuesta en parte en la membrana externa (no se muestra). El hierro ferroso es oxidado por la proteína tipo cupredoxina FtrB, y el hierro férrico se transfiere a la permeasa FtrC para su translocación a través de la membrana citoplásmica. Los electrones liberados a través de la oxidación del hierro ferroso pasan de FtrB al grupo 4Fe-4S de la poliferredoxina FtrD, que los transfiere a un aceptador de electrones citoplasmático. ME: membrana externa. P: periplasma. MI: membrana interna. C: citoplasma. Adaptado de Brickman y col. [46].

La expresión del sistema de captura IRP1-3 / FtrABCD se induce en limitación de hierro [52, 56] o en entornos con pH ácido [46]. Esta última condición favorece la estabilidad del estado de oxidación Fe(II). Según Brickman y col., IRP1-3 es el único sistema de captura de hierro de alta afinidad funcional en *B. pertussis* a valores de pH 6,0 o inferiores [46]. Las condiciones de acidez que *B. pertussis* encuentra en el entorno *in vivo* durante la infección están poco caracterizadas, pero según nuestros resultados, sobrevive intracelularmente en fagosomas con características de endosomas tempranos [57] en los que el pH es cercano a 6,0 [58]. En este contexto cabe suponer que este sistema de captura podría tener un rol importante en el estadio de persistencia intracelular de esta bacteria. Como se ha mencionado anteriormente, varios patógenos dependen de sistemas de captura de hierro (II) para poder establecer infecciones intracelulares exitosas [27-32]. Dentro de estos patógenos cabe destacar el caso de *Brucella abortus*, dado que posee un sistema de captura de hierro (II) homólogo al sistema de captura IRP1-3 / FtrABCD de *B. pertussis*, que fue encontrado inducido durante la infección intracelular en macrófagos por un estudio proteómico reciente [59]. Además, se ha demostrado que el sistema FtrABCD es necesario para la infección del huésped y duplicación intracelular en macrófagos de *B. abortus* [32].

Resultados previos de nuestro grupo han demostrado la presencia de anticuerpos que reconocen a IRP1-3 en sueros de humanos infectados con *B. pertussis*, sugiriendo que esta proteína se encuentra expresada durante la infección [52]. Asimismo, nuestro grupo ha demostrado que el uso de IRP1-3 como un antígeno vacunal protege contra la colonización por *B. pertussis* [54] y, por último, IRP1-3 se encuentra conservada en aislados clínicos de esta bacteria [54]. Su conservación a lo largo de décadas de evolución sugiere que esta proteína tiene un rol importante en el desarrollo de la infección por este patógeno.

Los estudios del proteoma de *B. pertussis* aislada de compartimientos intracelulares presentados en el **Capítulo 3** mostraron un aumento en la abundancia de los transportadores BfrD y BfrE (involucrados en la adquisición de hierro en un mecanismo dependiente de transferrina y catecolaminas) y del transportador de Fe²⁺ IRP1-3, indicando que este último receptor también podría estar involucrado en la sobrevivencia intracelular de esta bacteria. Asimismo, los resultados presentados en el **Capítulo 4** sugieren que los receptores de membrana externa BfrD y BfrE no son los únicos involucrados en la captura de hierro intracelular de *B. pertussis*. En particular, se

encontró que, si bien a tiempos cortos de infección la sobrevivencia de mutantes defectivos en estos genes se ve significativamente disminuida respecto a la cepa salvaje en macrófagos, a tiempos largos post infección el rol de estos receptores parece ser menos relevante, no encontrándose diferencias significativas en la sobrevivencia intracelular. Si bien no hemos determinado las causas de este fenómeno, se puede especular que a tiempos largos de infección la cepa mutante $\Delta bfrDE$ utiliza o induce la expresión de otros sistemas de captura de hierro que podrían compensar la falta de BfrD/BfrE. La expresión de IRP1-3 en bacterias que han permanecido 48 horas en localización intracelular sugiere que este receptor podría tener un rol en la captura de hierro a tiempos tardíos de infección. En este contexto, en el presente capítulo se describirán los estudios realizados para evaluar esta hipótesis y determinar si IRP1-3 está involucrado en la sobrevivencia de *B. pertussis* dentro de las células del hospedador.

5.2. Resultados

5.2.1. El pH ambiental regula la expresión de los transportadores periplásmicos de hierro en *B. pertussis*

Los patógenos bacterianos Gram-negativos utilizan sistemas de adquisición de hierro que involucran proteínas presentes en la membrana externa, que transportan el hierro capturado del medio extracelular al periplasma, y sistemas de transporte adicionales involucrados en el transporte de hierro del periplasma al citoplasma a través de la membrana interna. En *B. pertussis* se han caracterizado hasta el momento únicamente dos sistemas de transporte encargados de movilizar el hierro del periplasma al citoplasma: un sistema que involucra al transportador AfuA, específico de hierro (III), y un sistema que incluye al transportador IRP1-3, involucrado en la captura de hierro (II). Los resultados del estudio del proteoma presentados en el **Capítulo 3** indican que los niveles de AfuA disminuyen en *B. pertussis*, pudiendo ser detectada únicamente en las bacterias extracelulares (**Tabla Anexa 1**). Por el contrario, IRP1-3 se detectó únicamente en las bacterias intracelulares a las 48 h post infección sugiriendo que hay un aumento en la expresión de esta proteína a medida que la infección progresa. Esta regulación de los transportadores de hierro periplásmicos de *B. pertussis* podría estar relacionada con el entorno intracelular que encuentra esta bacteria y las fuentes de hierro disponibles. Estudios previos indican que *B. pertussis* intracelular habita compartimentos con características de endosomas tempranos [57], que tendrían un pH ligeramente ácido. A este pH la estabilidad del estado de oxidación hierro (II) se ve favorecida por sobre el estado hierro (III) y la expresión del transportador de hierro (II) IRP1-3 aumenta [46]. En este contexto cabe esperar los resultados obtenidos en el **Capítulo 3** que sugieren un aumento de la expresión de IRP1-3 en el estadio intracelular de *B. pertussis*. La disminución de AfuA por su parte puede ser esperable en el contexto del bajo pH que favorece el Fe(II) sobre el Fe(III), pero se desconoce si el pH es un regulador de este receptor. Para evaluar esta posibilidad, *B. pertussis* fue cultivada *in vitro* en medios con pH neutro o ácido y en condiciones de exceso o limitación de hierro. La expresión de AfuA fue determinada mediante RT-qPCR e inmunoblot. Se encontró que la expresión de AfuA se induce en limitación de hierro (**Figura 5.3**), como había sido demostrado previamente [50, 60], pero disminuye cuando las bacterias fueron cultivadas a pH 6,0 tanto en exceso como en limitación de hierro (**Figura 5.3**), sugiriendo que el pH

ligeramente ácido inhibe la expresión de AfuA. Asimismo, se observó que la expresión de IRP1-3 aumenta tanto en limitación de hierro como en estas condiciones de acidez (**Figura 5.3**), tal como fue reportado previamente [46].

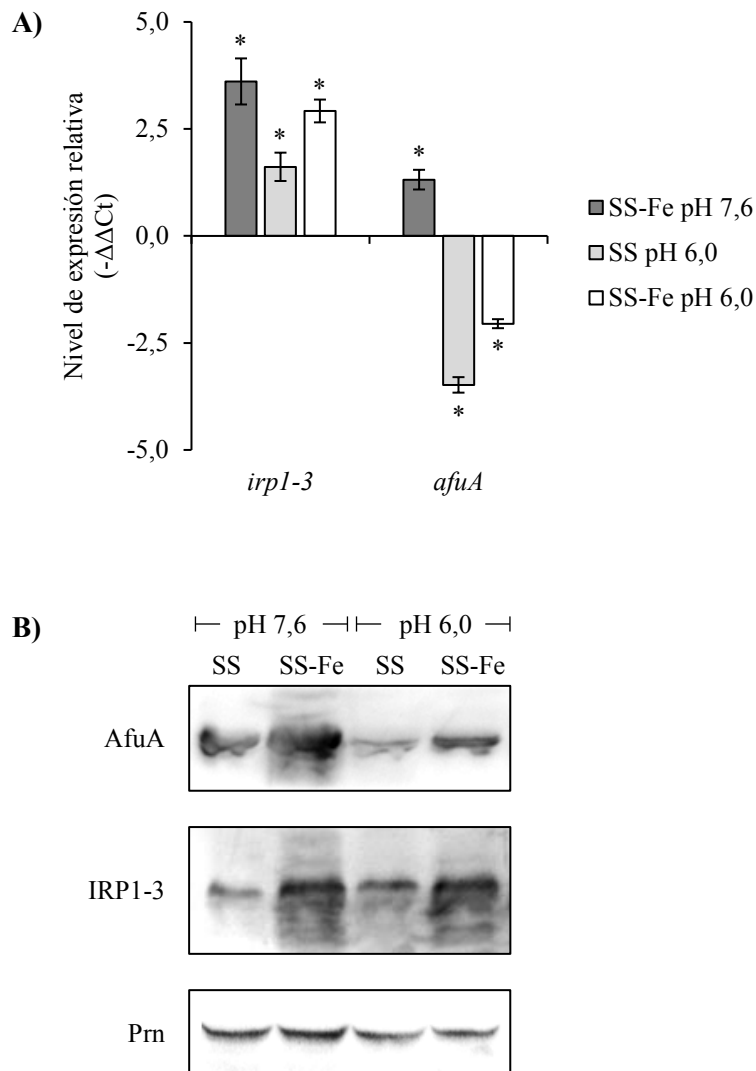


Figura 5.3: Regulación de la expresión de AfuA por disponibilidad de hierro y pH ambiental. **A)** *B. pertussis* fue cultivada en exceso (SS) o en limitación de hierro (SS-Fe) a pH 7,6 ó 6,0 y muestras de ARN fueron tomadas para analizar la expresión de *irp1-3* y *afuA* por RT-qPCR. El gen *rpoD* fue utilizado como control de estandarización y la condición SS pH 7,6 se utilizó como condición control. El nivel de expresión fue calculado utilizando el método $-\Delta\Delta Ct$ [61]. Valores positivos de este parámetro indican sobreexpresión con respecto a la condición control (SS pH 7,6), mientras que valores negativos indican disminución de la expresión. El nivel de expresión de los genes analizados fue significativamente diferente de su respectivo control en SS con exceso de hierro y pH 7,6 (* $p < 0,05$; Test *t* de Student). **B)** *B. pertussis* fue cultivada en exceso (SS) o en limitación de hierro (SS-Fe) a pH 7,6 ó 6,0 y muestras de proteínas bacterianas fueron analizadas por inmunoblot revelado con suero anti-AfuA; anti-IRP1-3 o anti-Pertactina (Prn). La detección de Prn fue utilizada como control de carga.

La modulación de la expresión de AfuA e IRP1-3 por pH coincide con los resultados encontrados en la caracterización del proteoma de *B. pertussis* intracelular (**Capítulo 3**) y sugiere que, tal como se especulaba, esta bacteria enfrenta un entorno levemente ácido en su estadio intracelular, en el cual IRP1-3 podría tener un rol relevante en la adquisición de hierro.

5.2.2. Construcción de una cepa de *B. pertussis* mutante defectiva en la expresión del receptor IRP1-3

Con el fin de poder analizar la relevancia del transportador de Fe^{2+} IRP1-3 en la persistencia intracelular de *B. pertussis* se decidió construir una cepa defectiva en la expresión de este receptor utilizando una estrategia equivalente a la descrita en el **Capítulo 4**. Para ello, se construyó el plásmido pSS4245 Δ *irp1-3* conteniendo la secuencia del gen *irp1-3* con una eliminación interna, junto con regiones circundantes homólogas a ambos extremos de la misma. En la **Figura 5.4A** se muestra el análisis por PCR realizado con cebadores que amplifican el entorno genómico de *irp1-3*, para discriminar entre clones salvajes y mutantes de las colonias obtenidas después de dos recombinaciones homólogas con el plásmido pSS4245 Δ *irp1-3*. La región del genoma que incluye la eliminación fue secuenciada confirmando que la misma era la esperada. En la **Figura 5.4B** se muestra un análisis por PCR usando cebadores específicos para el gen *irp1-3*, en donde no se observa amplificación de este gen en los clones mutantes obtenidos, confirmándose la eliminación del mismo en estas cepas.

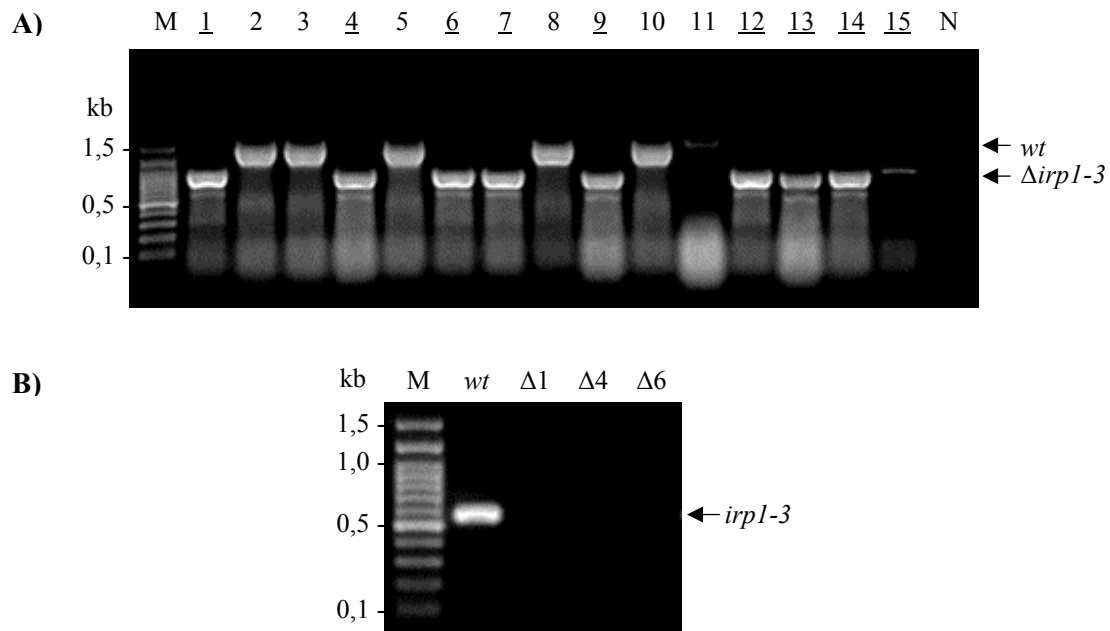


Figura 5.4: Obtención de una cepa mutante por eliminación de IRP1-3. **A)** Electroforesis en gel de agarosa de amplificaciones por PCR con los cebadores *irp1-3-5F* y *irp1-3-3R* que amplifican el entorno genómico de *irp1-3* para discriminar entre clones salvajes y clones mutantes de las colonias obtenidas después de dos recombinaciones homólogas con el vector pSS4245 Δ *irp1-3*. Los clones en las calles sin subrayar muestran la amplificación esperada para una región genómica salvaje de *irp1-3* (*wt*; aprox. 1,5 kb) y los clones en las calles subrayadas muestran la amplificación esperada para una región genómica mutante por eliminación de *irp1-3* (Δ ; aprox. 1 kb). M: marcador de peso molecular. N: control negativo. **B)** Electroforesis en gel de agarosa de amplificaciones por PCR usando los cebadores *irp1-3-CF* y *irp1-3-CR* (específicos para el gen *irp1-3*) de la cepa salvaje (*wt*) y mutantes en *irp1-3* (Δ ; clones 1, 4 y 6). Se obtuvo la amplificación esperada para *irp1-3* en la cepa salvaje (aprox. 0,6 kb) mientras que no se obtuvo amplificación en las cepas mutantes para *irp1-3*. M: marcador de peso molecular.

Para confirmar la ausencia de expresión de IRP1-3, la cepa salvaje parental y la cepa mutante Δ *irp1-3* fueron cultivadas en exceso y limitación de hierro y se obtuvieron muestras de proteínas celulares. Mediante inmunoblot se confirmó la ausencia de expresión de IRP1-3 en la cepa mutante, mientras que en la cepa salvaje se detectó la presencia de este transportador tanto en exceso como en limitación de hierro (**Figura 5.5**). Además, se observó un aumento de la expresión de esta proteína en limitación de hierro, tal como se esperaba según resultados previos de nuestro grupo [52, 56].

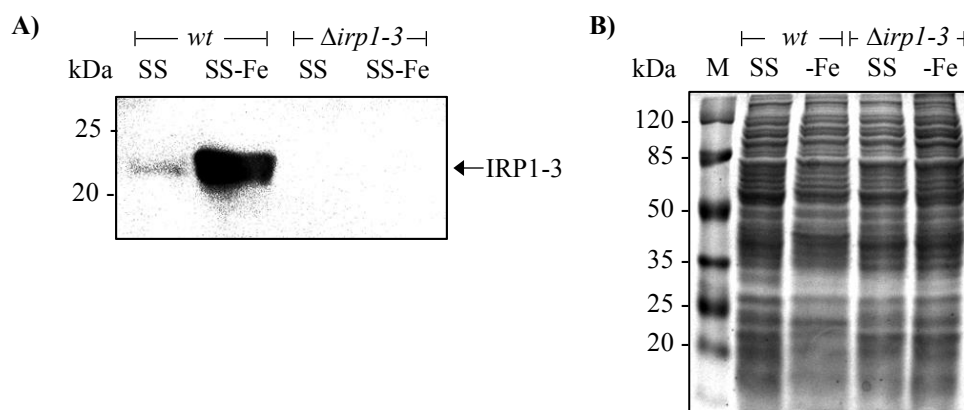


Figura 5.5: La cepa mutante $\Delta irp1-3$ no expresa la proteína IRP1-3. **A)** *B. pertussis* cepa salvaje (*wt*) y cepa mutante en IRP1-3 ($\Delta irp1-3$) fueron cultivadas en medio SS en exceso (SS) o ausencia de hierro (SS-Fe). Cantidades equivalentes de bacterias cultivadas en las distintas condiciones fueron lisadas y las muestras proteicas obtenidas fueron separadas mediante electroforesis desnaturizante SDS-PAGE. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF y se detectó la proteína IRP1-3 utilizando anticuerpos de ratón anti-IRP1-3 seguido de incubación con anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con fosfatasa alcalina y NBT/BCIP como sustrato de reacción. **B)** Como control de carga, las muestras proteicas utilizadas en el inmunoblot presentado en el panel A fueron separadas por electroforesis SDS-PAGE y teñidas con Coomassie Blue.

5.2.3. Cinética de crecimiento *in vitro* de la cepa mutante $\Delta irp1-3$

Para analizar si la falta de IRP1-3 afecta el crecimiento *in vitro* de *B. pertussis* en medios sintéticos, se analizó la cinética de crecimiento en medio SS de la cepa salvaje y mutante $\Delta irp1-3$ (**Figura 5.6**). No se observaron diferencias significativas en la cinética de crecimiento entre las cepas analizadas, sugiriendo que la mutación en *irp1-3* no afecta el crecimiento de *B. pertussis* en estas condiciones (**Figura 5.6**). Este resultado concuerda con los obtenidos previamente por otro grupo que indican que la falta de IRP1-3 sólo afecta el crecimiento de *B. pertussis* en condiciones de limitación de hierro y pH ligeramente ácido [46].

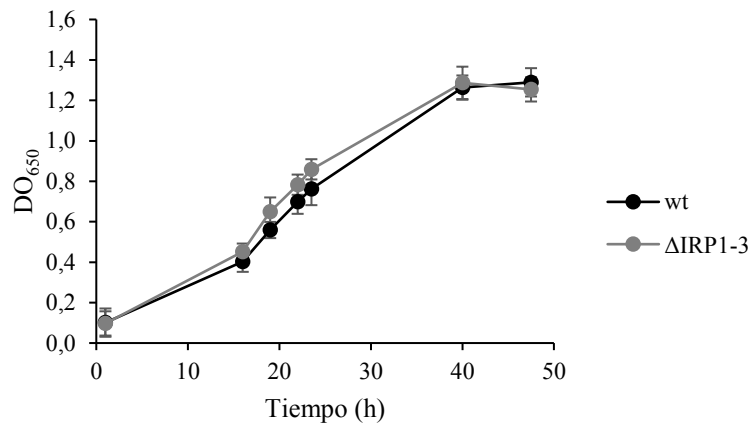


Figura 5.6: La ausencia de expresión de IRP1-3 no afecta el crecimiento *in vitro* de *B. pertussis*. *B. pertussis* cepa salvaje (*wt*) o mutante en IRP1-3 ($\Delta irp1-3$) fueron cultivadas en medio SS y el crecimiento bacteriano fue determinado a distintos tiempos mediante medidas de densidad óptica a λ 650nm (DO₆₅₀).

5.2.4. Caracterización de la sobrevida intracelular de la cepa $\Delta irp1-3$ en macrófagos humanos

Para analizar si el receptor IRP1-3 está involucrado en la sobrevida intracelular de *B. pertussis* se realizó una infección de macrófagos THP-1 con la cepa salvaje o la cepa mutante $\Delta irp1-3$. En primer lugar, se analizó si existían diferencias entre las cepas en la adhesión a macrófagos THP-1 y posterior fagocitosis, que constituyen los primeros eventos en el proceso de infección. Se observó que tanto el nivel de adhesión a macrófagos THP-1 como el de fagocitosis no fueron significativamente diferentes entre las cepas, sugiriendo que IRP1-3 no está involucrado en ninguno de estos procesos (**Figura 5.7**).

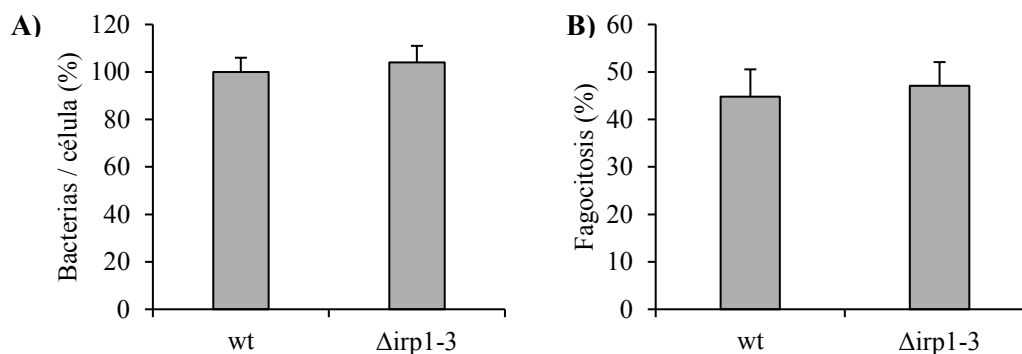


Figura 5.7: IRP1-3 no está involucrado en la adhesión ni en la fagocitosis de *B. pertussis* en macrófagos THP-1. Células THP-1 diferenciadas con PMA fueron incubadas con *B. pertussis* (R_b/c 100) cepa salvaje (*wt*) o mutante en *irp1-3* ($\Delta irp1-3$) durante 2 h y posteriormente fueron lavadas y fijadas con paraformaldehído. El número de bacterias extracelulares (rojas y verdes) e intracelulares (verdes) fue discriminado con doble marcación fluorescente y microscopía de fluorescencia. **A)** Bacterias totales (rojas y verdes) adheridas por célula. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de bacterias/célula respecto a la cepa salvaje (*wt*). Se muestran la media \pm DE de dos experimentos independientes. **B)** Porcentaje de fagocitosis (bacterias verdes \times 100 / bacterias totales) por célula. Se muestra la media \pm DE de dos experimentos independientes.

Para evaluar el rol de IRP1-3 en la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en macrófagos, se diferenciaron células THP-1 con PMA y posteriormente se infectaron con la cepa salvaje o la cepa mutante $\Delta irp1-3$. El número de bacterias intracelulares viables fue determinado mediante recuento de UFC a diferentes tiempos post infección (**Figura 5.8**). En las condiciones de experimentación utilizadas no se observó que la falta de expresión de IRP1-3 afecte significativamente la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en macrófagos THP-1 (**Figura 5.8**).

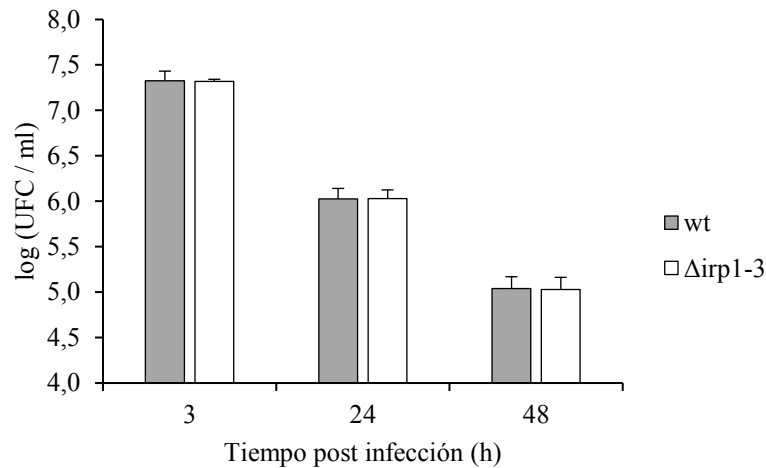


Figura 5.8: IRP1-3 no está involucrado en la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en macrófagos THP-1. *B. pertussis* cepa salvaje (*wt*) o cepa mutante en *irp1-3* ($\Delta irp1-3$) fueron incubadas por 2 h a 37 °C con células THP-1 diferenciadas con PMA (R;b/c 100). Después de tres lavados, las células fueron incubadas durante 1 h con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares y el número de UFC de *B. pertussis* por ml fue determinado a los distintos tiempos post infección. La polimixina B fue mantenida durante todo el tiempo del ensayo. Los datos representan la media \pm DE de dos experimentos independientes.

5.2.5. Estudio del rol de IRP1-3 en la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en macrófagos estimulados con IFN- γ

Como se mencionó anteriormente, la infección por *B. pertussis* produce una respuesta proinflamatoria en el huésped caracterizada por la presencia de niveles elevados de IFN- γ e IL-17 [39-41, 62]. La presencia de estas citoquinas podría alterar la interacción de *B. pertussis* con los macrófagos, modificando la dependencia bacteriana de los sistemas de captura de hierro de alta afinidad para establecer una infección intracelular. En particular, el IFN- γ induce mecanismos de restricción del hierro disponible en la célula huésped [34, 37], que podrían interferir en la sobrevivencia de esta bacteria. Para analizar si el transportador de hierro IRP1-3 está involucrado en la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* bajo estas condiciones, se realizó un ensayo de infección con macrófagos THP-1 preincubados con IFN- γ . Como control del efecto de esta citoquina en las células THP-1 se evaluó el nivel de expresión en superficie del marcador HLA-DR, cuyos niveles aumentan en macrófagos activados por IFN- γ [63]. En la **Figura 5.9** se muestran resultados de citometría de flujo que indican que el tratamiento de los macrófagos THP-1 con la citoquina IFN- γ en las condiciones experimentales utilizadas aumentó los niveles en superficie del marcador HLA-DR en comparación a los macrófagos no tratados.

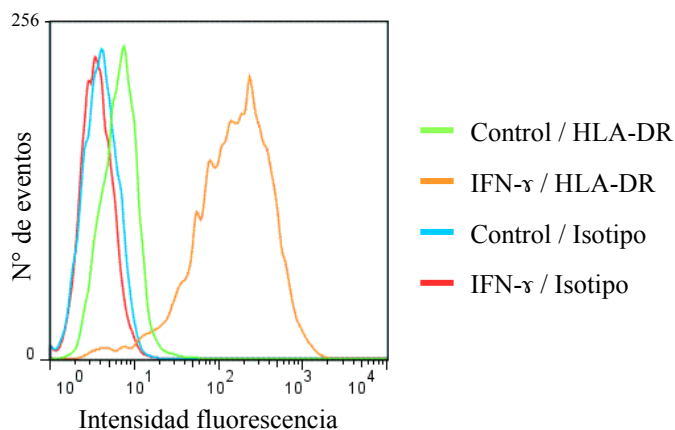


Figura 5.9: La exposición a IFN- γ aumenta los niveles de HLA-DR en la superficie de células THP-1 diferenciadas a macrófagos. Células THP-1 fueron diferenciadas con PMA y tratadas durante 24 h con IFN- γ 150 U/ml o incubadas en medio de cultivo celular sin el agregado de IFN- γ (Control). Las células fueron desprendidas de las placas de cultivo por tratamiento con PBS-EDTA, fijadas con paraformaldehído, marcadas con un anticuerpo anti HLA-DR o con el respectivo anticuerpo control de isotipo, y analizadas por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos.

En los ensayos de infección se evaluó en primer lugar el efecto del IFN- γ en la fagocitosis tanto de la cepa salvaje como de la cepa mutante *$\Delta irp1-3$* . Se observó que el tratamiento con IFN- γ produjo un aumento estadísticamente significativo en la fagocitosis de ambas cepas (**Figura 5.10**), un efecto que había sido reportado previamente para el caso de otros patógenos [64]. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el nivel de fagocitosis de la cepa salvaje y la cepa mutante *$\Delta irp1-3$* (**Figura 5.10**) indicando que IRP1-3 no está involucrado en el aumento de la fagocitosis de *B. pertussis* en estas condiciones.

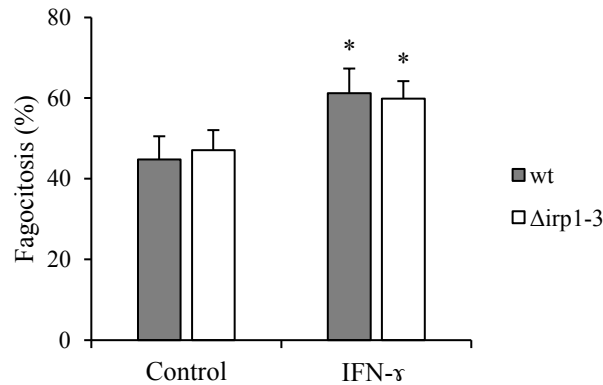


Figura 5.10: La exposición de los macrófagos THP-1 a IFN- γ aumenta la fagocitosis de *B. pertussis*. Células THP-1 fueron diferenciadas con PMA y tratadas durante 24 h con IFN- γ 150 U/ml o incubadas en medio de cultivo celular sin el agregado de IFN- γ (Control). Posteriormente fueron incubadas con *B. pertussis* (R;b/c 100) cepa salvaje (*wt*) o mutante en *irp1-3* (Δ *irp1-3*) durante 2 h. El número de bacterias extracelulares (rojas y verdes) e intracelulares (verdes) fue discriminado con doble marcación fluorescente y cuantificado mediante microscopía de fluorescencia. Porcentaje de fagocitosis (bacterias verdes \times 100 / bacterias totales) por célula. Se muestra la media \pm DE de dos experimentos independientes. El porcentaje de fagocitosis en condiciones de estimulación con IFN- γ difiere significativamente de su respectivo control sin tratar (* p <0,05; Test *t* de Student).

Los estudios de sobrevivencia intracelular indicaron que el receptor de hierro IRP1-3 no está involucrado en la persistencia de *B. pertussis* en macrófagos estimulados con IFN- γ (**Figura 5.11**). Por otro lado, teniendo en cuenta que la preincubación con IFN- γ aumenta la fagocitosis bacteriana en células THP1 (**Figura 5.10**), se puede considerar que a las 3 h post infección existe una tendencia a una menor sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en macrófagos activados en comparación a macrófagos sin activar (**Figura 5.11**), probablemente debido a una mayor capacidad bactericida de la célula huésped. Sin embargo, es interesante destacar que esta tendencia se pierde a tiempos tardíos post infección, sugiriendo que *B. pertussis* es capaz de contrarrestar los efectos microbicidas inducidos por IFN- γ en macrófagos (**Figura 5.11**).

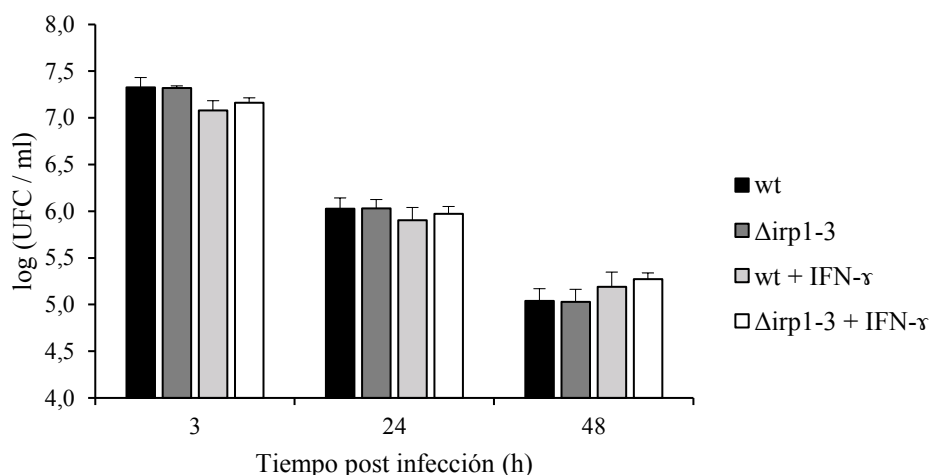


Figura 5.11: IRP1-3 no está involucrado en la sobrevida intracelular de *B. pertussis* en macrófagos THP-1 activados con IFN- γ . Células THP-1 fueron diferenciadas con PMA y tratadas durante 24 h con IFN- γ 150 U/ml o incubadas en medio de cultivo celular sin el agregado de IFN- γ (Control). Posteriormente, los macrófagos fueron incubados con *B. pertussis* (R;b/c 100) cepa salvaje (*wt*) o mutante en *irp1-3* ($\Delta irp1-3$) durante 2 h. Después de tres lavados, las células fueron incubadas durante 1 h con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares y el número de UFC de *B. pertussis* por ml fue determinado a los distintos tiempos post infección. La polimixina B y el IFN- γ se mantuvieron durante todo el tiempo de infección. Los datos representan la media \pm DE de dos experimentos independientes.

5.2.6. Efecto de la adaptación a la limitación de hierro sobre la sobrevida intracelular de *B. pertussis*. Rol de IRP1-3

En limitación de hierro *B. pertussis* aumenta la expresión del transportador IRP1-3 en un nivel aproximadamente 50 veces mayor en comparación a condiciones de exceso de hierro [46, 52]. Durante la infección *in vivo*, *B. pertussis* se encuentra limitada en hierro debido a la inmunidad nutricional del hospedador mencionada anteriormente. En este contexto, es posible que la sobrevida intracelular sea modificada por esta adaptación y que, en este nuevo escenario, IRP1-3 tenga un rol en este mecanismo de patogénesis. Para investigar esta hipótesis, se cultivó *B. pertussis* cepa salvaje y mutante defectiva en IRP1-3 en limitación de hierro y se analizó la sobrevida intracelular de cada cepa empleando macrófagos en reposo o activados previamente por incubación con IFN- γ . En estas condiciones experimentales no se encontraron diferencias significativas en la fagocitosis por células THP-1 entre la cepa salvaje y la cepa mutante $\Delta irp1-3$, sugiriendo nuevamente que este transportador de hierro no está involucrado en las etapas iniciales de la infección (**Figura 5.12**). Sin embargo, se observó que el tratamiento con IFN- γ produjo un aumento significativo en la fagocitosis de ambas cepas (**Figura 5.12**), un

resultado similar al encontrado en la infección con *B. pertussis* en condiciones de exceso de hierro (**Figura 5.10**).

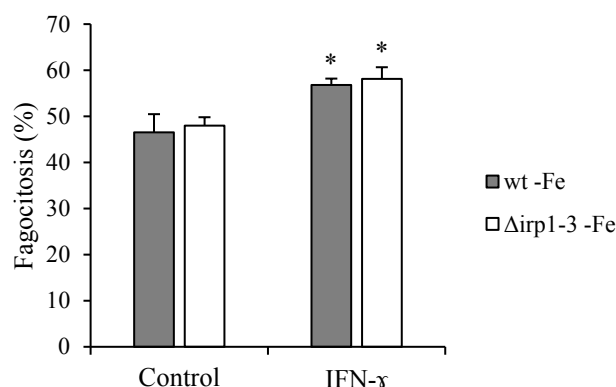


Figura 5.12: La exposición de los macrófagos THP-1 a IFN- γ aumenta la fagocitosis de *B. pertussis* cultivada bajo limitación de hierro. Células THP-1 fueron diferenciadas con PMA y tratadas durante 24 h con IFN- γ 150 U/ml o incubadas en medio de cultivo celular sin el agregado de IFN- γ (Control). Posteriormente, los macrófagos fueron incubados durante 2 h con *B. pertussis* (R;b/c 100) cepa salvaje (*wt*) o mutante en *irp1-3* (Δ *irp1-3*) cultivadas bajo limitación de hierro (-Fe). El número de bacterias extracelulares (rojas y verdes) e intracelulares (verdes) fue discriminado con doble marcación fluorescente y cuantificado mediante microscopía de fluorescencia. Porcentaje de fagocitosis (bacterias verdes \times 100 / bacterias totales) por célula. Se muestra la media \pm DE de dos experimentos independientes. El porcentaje de fagocitosis en condiciones de estimulación con IFN- γ difiere significativamente de su respectivo control sin tratar (* $p < 0,05$; Test de Student).

Con respecto a la persistencia intracelular, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la sobrevivencia entre la cepa salvaje y la cepa mutante Δ *irp1-3* en macrófagos THP-1 utilizando inóculos bacterianos cultivados en limitación de hierro, ya sea en condiciones de reposo o en macrófagos incubados con IFN- γ (**Figura 5.13**). En conjunto, estos resultados indican que bajo estas condiciones experimentales el transportador IRP1-3 no es relevante para el establecimiento de infecciones intracelulares por *B. pertussis* en macrófagos (**Figura 5.13**). Con respecto al efecto del IFN- γ en la infección intracelular, se encontró un resultado similar al observado previamente utilizando inóculos bacterianos cultivados en exceso de hierro (**Figura 5.11**). Así, a pesar del aumento en la fagocitosis observado en los macrófagos activados con IFN- γ (**Figura 5.12**), se recuperó un número significativamente menor de *B. pertussis* viable a las 3 h post infección en comparación a las células control, sugiriendo que el IFN- γ aumenta la capacidad bactericida de los macrófagos a corto plazo (**Figura 5.13**). No obstante, a las 24 y 48 h post infección no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en

el número de *B. pertussis* viable recuperadas de macrófagos control en comparación a las células activadas con IFN- γ , indicando que a tiempos tardíos post infección esta citoquina no modifica la persistencia de *B. pertussis* en este tipo celular (**Figura 5.13**).

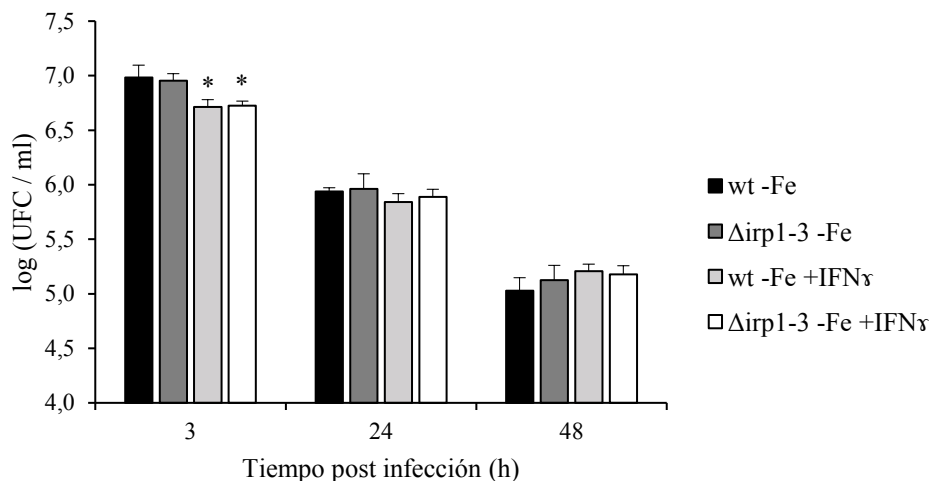


Figura 5.13: La sobreexpresión de IRP1-3 no afecta la sobrevida intracelular de *B. pertussis* en macrófagos THP-1 activados con IFN- γ . Células THP-1 fueron diferenciadas con PMA y tratadas durante 24 h con IFN- γ 150 U/ml o incubadas en medio de cultivo celular sin el agregado de IFN- γ (Control). Posteriormente, los macrófagos fueron incubados durante 2 h con *B. pertussis* (R_b/c 100) cepa salvaje (*wt*) o mutante en *irp1-3* ($\Delta irp1-3$) adaptadas a la limitación de hierro. Después de tres lavados, las células fueron incubadas durante 1 h con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares y el número de UFC de *B. pertussis* por ml fue determinado a los distintos tiempos post infección. La polimixina B y el IFN- γ se mantuvieron durante todo el tiempo de infección. Los datos representan la media \pm DE de dos experimentos independientes. El número de UFC de *B. pertussis* recuperadas a las 3 h post infección en macrófagos estimulados con IFN- γ difiere significativamente de su respectivo control sin estimular (* $p < 0,05$; Test de ANOVA).

5.2.7. Estudio del rol del transportador IRP1-3 en la sobrevida intracelular de *B. pertussis* en células del epitelio respiratorio

Como se mencionó previamente, resultados de nuestro grupo indican que las células del epitelio respiratorio podrían constituir un reservorio intracelular de *B. pertussis* en el hospedador [65]. Asimismo, estudios previos indican la relevancia de los transportadores de hierro ferroso en la persistencia intracelular de varios patógenos en células epiteliales [27, 30], indicando que este tipo celular también emplea mecanismos de deprivación de hierro que los patógenos bacterianos deberán sobrellevar para persistir. Con el fin de analizar si el receptor IRP1-3 está involucrado en la persistencia de *B. pertussis* en células epiteliales, se realizaron infecciones de la línea celular de epitelio respiratorio humano 16HBE14o- con la cepa salvaje y con la cepa mutante $\Delta irp1-3$.

Mediante el uso de microscopía de fluorescencia se determinó que el nivel de adhesión e internalización bacteriana no difirió significativamente entre las cepas, sugiriendo que el receptor IRP1-3 no estaría involucrado en este proceso inicial de la infección (**Figura 5.14**).

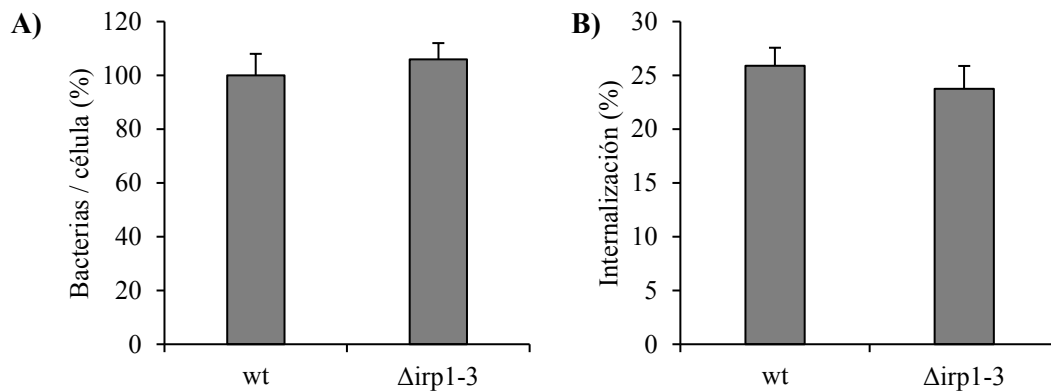


Figura 5.14: La falta de expresión del receptor IRP1-3 no afecta la adhesión ni la internalización de *B. pertussis* en células del epitelio respiratorio. Células 16HBE14o- fueron incubadas con *B. pertussis* (R;b/c 30) cepa salvaje (*wt*) o mutante en *irp1-3E* ($\Delta irp1-3$) durante 3 h. Luego las células fueron lavadas y fijadas con paraformaldehído. El número de bacterias extracelulares e intracelulares fue discriminado con doble marcación inmunofluorescente y cuantificado mediante microscopía de fluorescencia. **A)** Bacterias totales (rojas y verdes) adheridas por célula. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de bacterias/célula respecto a la cepa salvaje (*wt*). Se muestran la media \pm DE de dos experimentos independientes. **B)** Porcentaje de invasión (bacterias verdes \times 100 / bacterias totales) por célula. Se muestra la media \pm DE de dos experimentos independientes.

Ensayos de protección al antibiótico polimixina B y recuento de UFC mostraron que la sobrevivencia intracelular de la cepa mutante $\Delta irp1-3$ en células epiteliales no difirió significativamente de la cepa salvaje en ninguno de los tiempos de infección analizados. Estos resultados indican que este receptor, bajo las condiciones experimentales utilizadas, no está involucrado en la adquisición de hierro en el estadio intracelular de *B. pertussis* en células epiteliales (**Figura 5.15**).

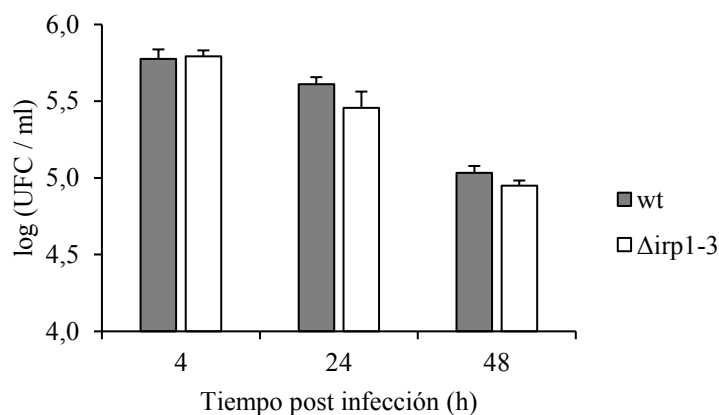


Figura 5.15: El receptor IRP1-3 no está involucrado en la sobrevida intracelular de *B. pertussis* en células del epitelio respiratorio. Células 16HBE14o- fueron incubadas con *B. pertussis* (R_ib/c 30) cepa salvaje (wt) o mutante en *irp1-3* ($\Delta irp1-3$) durante 3 h. Después de tres lavados, las células fueron incubadas durante 1 h con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares y el número de UFC de *B. pertussis* por ml fue determinado a los distintos tiempos post infección. La polimixina B se mantuvo durante todo el tiempo de infección. Los datos representan la media \pm DE de dos experimentos independientes

5.2.8. Construcción de una cepa de *B. pertussis* mutante en IRP1-3 y BfrD/BfrE

En el **Capítulo 4** se demostró que los receptores BfrD y BfrE juegan un rol en la persistencia intracelular de *B. pertussis* a las 24 horas post infección en macrófagos THP-1. Sin embargo, a las 48 horas post infección no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la sobrevida intracelular entre la cepa mutante $\Delta bfrDE$ y la cepa salvaje, posiblemente debido a la expresión de receptores de hierro alternativos en la cepa mutante. Para analizar si IRP1-3 está involucrado en este mecanismo de compensación, se decidió analizar la sobrevida intracelular de una cepa defectiva tanto en BfrD y BfrE como en IRP1-3. Para ello, se construyó una cepa mutante $\Delta bfrDE \Delta irp1-3$ utilizando como cepa parental la cepa $\Delta bfrDE$ en la cual se eliminó el gen *irp1-3* utilizando el plásmido pSS4245 $\Delta irp1-3$. La **Figura 5.16** muestra el análisis por PCR de las colonias obtenidas luego de dos recombinaciones homólogas con el plásmido pSS4245 $\Delta irp1-3$, que confirmaron la obtención de una cepa mutante por eliminación en estos tres receptores.

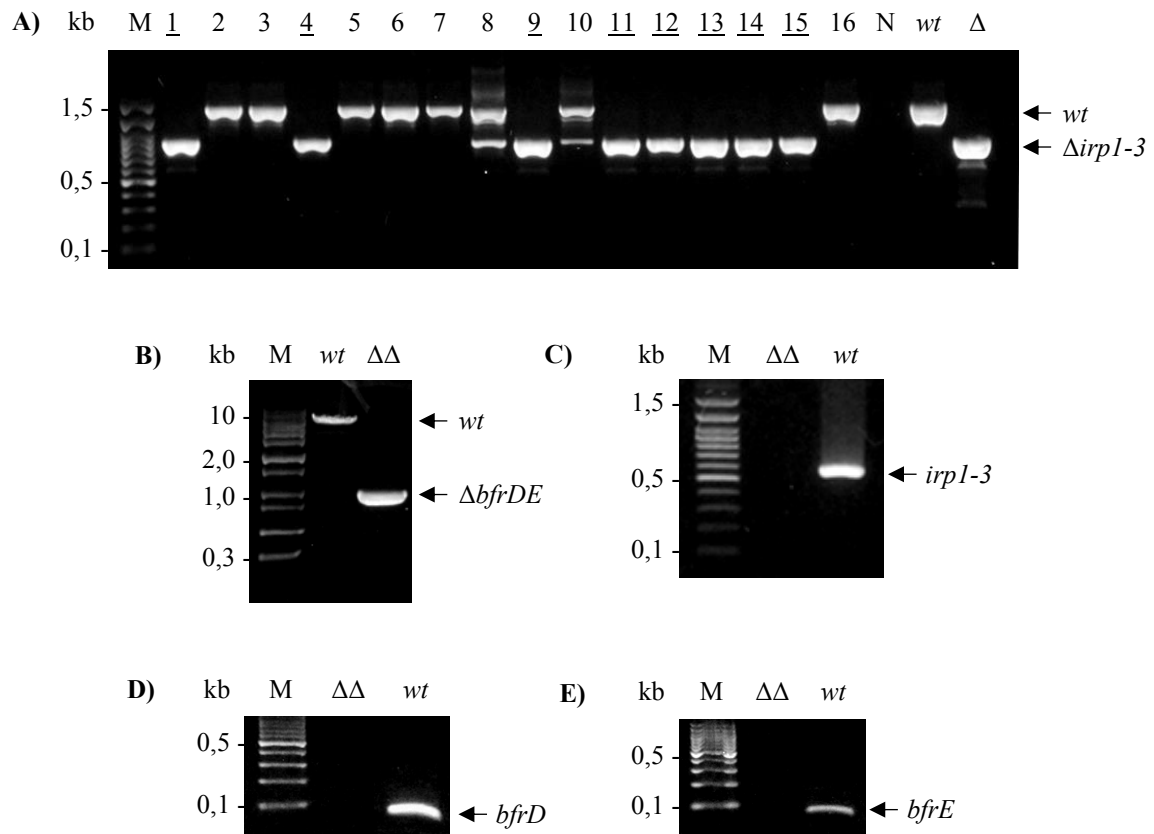


Figura 5.16: Obtención de una cepa mutante por eliminación en IRP1-3 y BfrDE. **A)** Electroforesis en gel de agarosa de amplificaciones por PCR con los cebadores *irp1-3-5F* y *irp1-3-3R* que amplifican la región genómica que contiene a *irp1-3* para discriminar entre clones salvajes y clones mutantes de las colonias obtenidas después de dos recombinaciones homólogas con el vector pSS4245Δ*irp1-3* utilizando la cepa Δ*bfrDE* como parental. Los clones en las calles sin subrayar muestran la amplificación esperada para una región genómica salvaje de *irp1-3* (wt; aprox. 1,5 kb) y los clones en las calles subrayadas muestran la amplificación esperada para una región genómica mutante por eliminación de *irp1-3* (Δ; aprox. 1 kb). La calle wt contiene una amplificación por PCR a partir de una muestra de ADN genómico de *B. pertussis* Tohama cepa salvaje. La calle Δ contiene una amplificación por PCR a partir del plásmido pSS4245Δ*irp1-3*. M: marcador de peso molecular. N: control negativo. **B)** Electroforesis en gel de agarosa de amplificaciones por PCR con los cebadores *bfrDE-5F* y *bfrDE-3R* que amplifican la región genómica que contiene a *bfrDE*, utilizando como molde ADN genómico de *B. pertussis* cepa salvaje (wt) o de un clon mutante Δ*bfrDE* Δ*irp1-3* elegido al azar (ΔΔ). La cepa salvaje dio la amplificación esperada para un entorno genómico *bfrDE* de tipo salvaje (wt; aprox. 10 kb) y el mutante Δ*bfrDE* Δ*irp1-3* la esperada para un entorno mutante por eliminación de *bfrDE* (ΔΔ; aprox. 1 kb). M: marcador de peso molecular. **C)** Electroforesis en gel de agarosa de amplificaciones por PCR usando los cebadores *irp1-3-CF* y *irp1-3-CR* específicos para el gen *irp1-3* utilizando como molde ADN genómico de *B. pertussis* cepa salvaje (wt) o de un clon mutante Δ*bfrDE* Δ*irp1-3* (ΔΔ). Se obtuvo la amplificación esperada para *irp1-3* en la cepa salvaje (aprox. 0,6 kb) mientras que no se obtuvo amplificación en la cepa mutante. M: marcador de peso molecular. **D-E)** Electroforesis en gel de agarosa de amplificaciones por PCR usando los cebadores *bfrD-RTF* y *bfrD-RTR* específicos para un fragmento interno del gen *bfrD* (**D)**

o los cebadores *bfrE*-RTF y *bfrE*-RTR específicos para un fragmento interno del gen *bfrE* (**E**) utilizando como molde ADN genómico de *B. pertussis* cepa salvaje (*wt*) o un clon mutante $\Delta bfrDE \Delta irp1-3$ ($\Delta\Delta$). Se obtuvo la amplificación esperada para *bfrD* y *bfrE* en la cepa salvaje (aprox. 0,1 kb) mientras que no se obtuvo amplificación en la cepa mutante. M: marcador de peso molecular.

Para analizar si la eliminación simultánea de los receptores de hierro BfrD, BfrE e IRP1-3 afecta el crecimiento de *B. pertussis*, se realizaron cultivos *in vitro* en medio sintético SS, y la biomasa en fase estacionaria fue estimada mediante medidas de densidad óptica. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las respectivas cinéticas de crecimiento ni en la densidad óptica en fase estacionaria entre las cepas salvaje, $\Delta irp1-3$, $\Delta bfrDE$ ni $\Delta bfrDE \Delta irp1-3$, indicando que estas mutaciones no afectan el crecimiento de *B. pertussis* bajo estas condiciones (**Figura 5.17**).

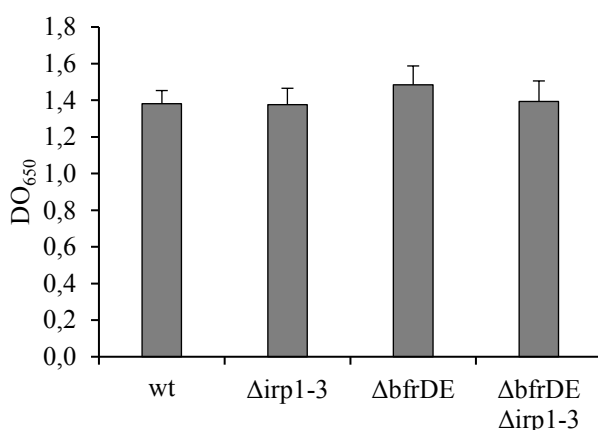


Figura 5.17: La mutación en *irp1-3* y/o en *bfrDE* no afecta el crecimiento *in vitro* de *B. pertussis*. Se realizaron cultivos líquidos en medio SS de la cepa salvaje (*wt*), $\Delta irp1-3$, $\Delta bfrDE$ y $\Delta bfrDE \Delta irp1-3$. La biomasa en fase estacionaria a las 48 h de cultivo fue estimada mediante medidas de densidad óptica a λ 650nm (DO₆₅₀).

5.2.9. Estudio de la sobrevivencia intracelular de la cepa $\Delta irp1-3 \Delta bfrDE$ en macrófagos humanos

Con el fin de caracterizar la contribución de los receptores de hierro IRP1-3, BfrD y BfrE en la persistencia intracelular de *B. pertussis* se realizaron infecciones de macrófagos THP-1 con las cepas descritas anteriormente. En primer lugar, se evaluó la adhesión bacteriana y la fagocitosis a los macrófagos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la adhesión ni en la fagocitosis por los macrófagos THP-1 entre las distintas cepas utilizadas, sugiriendo que estos receptores no afectan esta primera etapa de la infección (**Figura 5.18**).

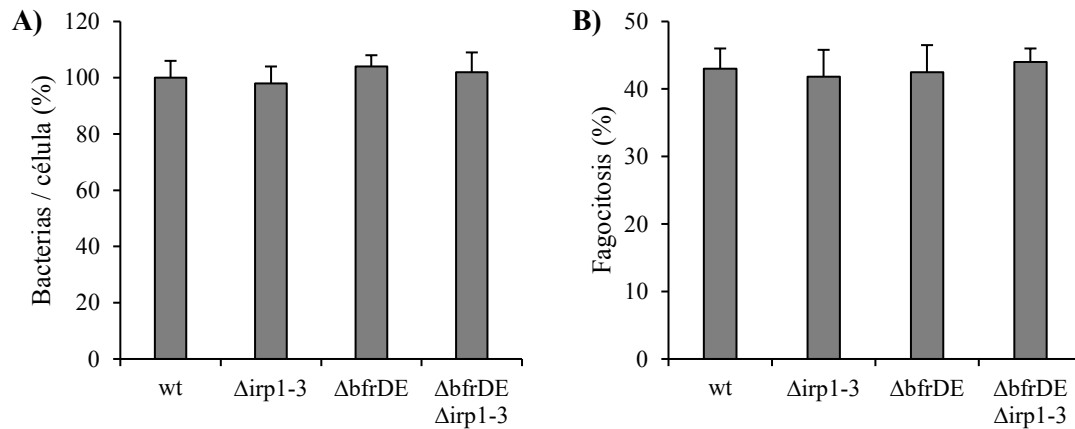


Figura 5.18: La falta de IRP1-3 y de BfrDE no afecta la adhesión ni la fagocitosis de *B. pertussis* en macrófagos THP-1. Células THP-1 diferenciadas con PMA fueron incubadas con *B. pertussis* (R;b/c 100) cepa salvaje (*wt*), cepa mutante en *irp1-3* ($\Delta irp1-3$), cepa mutante en *bfrDE* ($\Delta bfrDE$) o cepa mutante en *bfrDE* y en *irp1-3* ($\Delta bfrDE \Delta irp1-3$) durante 2 h y posteriormente fueron lavadas y fijadas con paraformaldehído. El número de bacterias extracelulares (rojas y verdes) e intracelulares (verdes) fue discriminado con doble marcación fluorescente y cuantificado mediante microscopía de fluorescencia. **A)** Bacterias totales (rojas y verdes) adheridas por célula. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de bacterias/célula respecto a la cepa salvaje (*wt*). Se muestran la media \pm DE de tres experimentos independientes. **B)** Porcentaje de fagocitosis (bacterias verdes \times 100 / bacterias totales) por célula. Se muestra la media \pm DE de tres experimentos independientes.

La sobrevida intracelular de las cepas salvaje, mutante $\Delta irp1-3$, mutante $\Delta bfrDE$ y mutante $\Delta bfrDE \Delta irp1-3$ fue evaluada mediante ensayos de protección al antibiótico polimixina B en macrófagos THP-1 y recuento de UFC (**Figura 5.19**). Tal como se había observado anteriormente (**Capítulo 4 Figura 4.6**), la sobrevida intracelular de la cepa $\Delta bfrDE$ fue significativamente menor que la cepa salvaje sólo a las 24 horas post infección (**Figura 5.19**). Asimismo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la cepa salvaje y la mutante $\Delta irp1-3$ en ningún tiempo post infección (**Figura 5.19**). Sin embargo, la sobrevida intracelular de la cepa $\Delta bfrDE \Delta irp1-3$ fue significativamente menor que la sobrevida del resto de las cepas a las 24 horas post infección. Este resultado sugiere que, en ausencia de los receptores BfrD y BfrE, *B. pertussis* intracelular utiliza el receptor IRP1-3 para adquirir hierro. A las 48 horas post infección no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la sobrevida intracelular de ninguna de las cepas indicando que otros mecanismos compensatorios podrían participar en la captura de hierro en ausencia de BfrD, BfrE e IRP1-3. También parecen sugerir que IRP1-3 no está involucrado en el restablecimiento de la sobrevida intracelular de la cepa $\Delta bfrDE$ a niveles similares a los observados para la cepa salvaje.

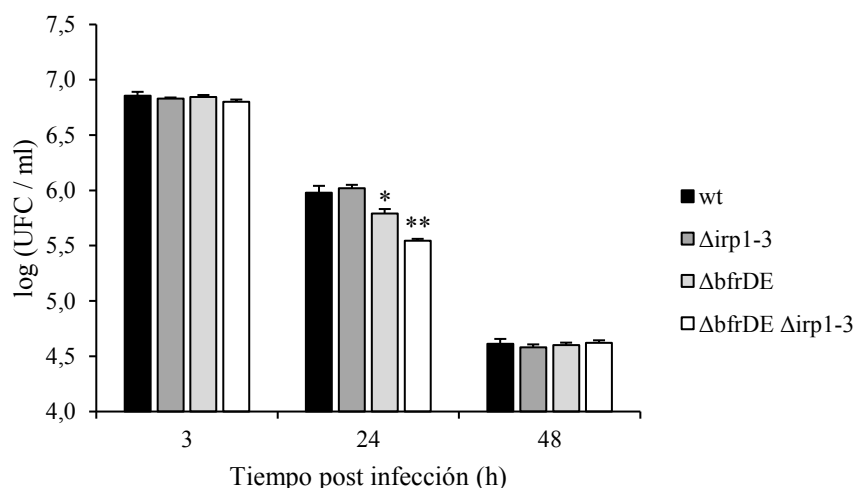


Figura 5.19: *B. pertussis* utiliza el transportador IRP1-3 para adquirir hierro en macrófagos humanos en ausencia de los transportadores BfrD y BfrE. *B. pertussis* cepa salvaje (*wt*), cepa mutante en *irp1-3* ($\Delta irp1-3$), cepa mutante en *bfrDE* ($\Delta bfrDE$) o cepa mutante en *bfrDE* y en *irp1-3* ($\Delta bfrDE \Delta irp1-3$) fueron incubadas por 2 h a 37 °C con células THP-1 diferenciadas con PMA (R_ib/c 100). Después de tres lavados, las células fueron incubadas durante 1 h con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares y el número de UFC por ml de *B. pertussis* fue determinado a los distintos tiempos post infección. La polimixina B fue mantenida durante todo el tiempo del ensayo. Los datos representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. La sobrevida intracelular de la cepa $\Delta bfrDE$ es significativamente diferente a la de las cepas salvaje y $\Delta irp1-3$ a las 24 h post infección (* $p < 0,05$; Test de ANOVA). La sobrevida intracelular de la cepa $\Delta bfrDE \Delta irp1-3$ es significativamente diferente a la del resto de las cepas a las 24 h post infección. (** $p < 0,05$; Test de ANOVA).

5.2.10. Análisis de la sobrevida intracelular de la cepa $\Delta irp1-3 \Delta bfrDE$ en células del epitelio respiratorio

El rol del transportador IRP1-3 en la sobrevida intracelular de *B. pertussis* en ausencia de los receptores BfrD y BfrE también fue analizado en células de origen epitelial. Para ello, se realizaron infecciones de la línea celular de epitelio respiratorio 16HBE14o- con la cepa salvaje, mutante $\Delta irp1-3$, mutante $\Delta bfrDE$ y mutante $\Delta bfrDE \Delta irp1-3$. En primer lugar, debió evaluarse un eventual efecto de la falta de estas proteínas en la interacción inicial de la bacteria con este tipo de células. Con este fin, se empleó microscopía de fluorescencia para determinar el nivel de adhesión e internalización de las diferentes cepas a las células epiteliales. Los resultados indicaron que no hay diferencias estadísticamente significativas en este nivel de interacción entre las cepas estudiadas (Figura 5.20).

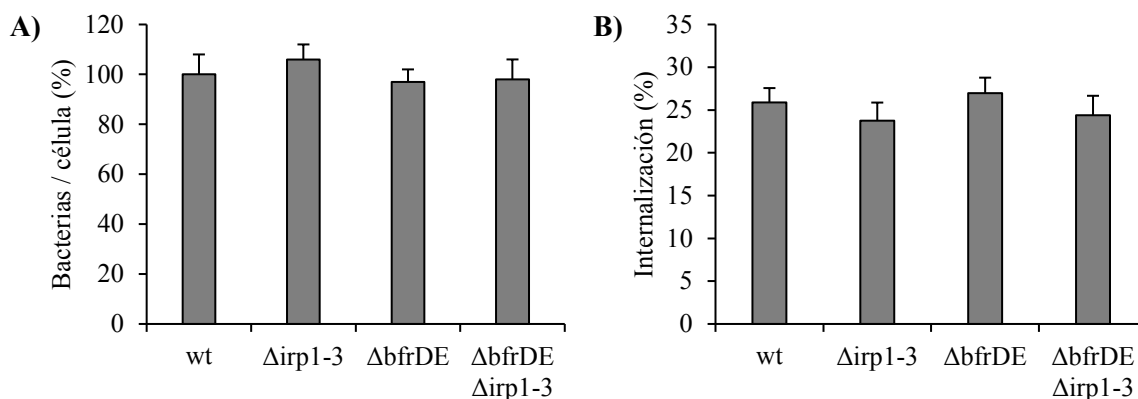


Figura 5.20: La falta de expresión de IRP1-3, BfrD y BfrE no afectan la adhesión ni la internalización de *B. pertussis* a células del epitelio respiratorio. Células 16HBE14o- fueron incubadas con *B. pertussis* (R₁b/c 30) cepa salvaje (*wt*), cepa mutante en *irp1-3* ($\Delta irp1-3$), cepa mutante en *bfrDE* ($\Delta bfrDE$) o cepa mutante en *bfrDE* y en *irp1-3* ($\Delta bfrDE \Delta irp1-3$) durante 3 h. Luego las células fueron lavadas y fijadas con paraformaldehído. El número de bacterias extracelulares e intracelulares fue discriminado con doble marcación inmunofluorescente y cuantificado mediante microscopía de fluorescencia. **A)** Bacterias totales (rojas y verdes) adheridas por célula. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de bacterias/célula respecto a la cepa salvaje (*wt*). Se muestran la media \pm DE de dos experimentos independientes. **B)** Porcentaje de internalización (bacterias verdes \times 100 / bacterias totales) por célula. Se muestra la media \pm DE de dos experimentos independientes

La sobrevida intracelular de las cepas fue evaluada mediante ensayos de protección al antibiótico polimixina B y recuento de UFC en células epiteliales 16HBE14o- (**Figura 5.21**). La sobrevida intracelular de la cepa $\Delta bfrDE$ fue significativamente menor que la cepa salvaje sólo a las 48 horas post infección como se había demostrado previamente (**Capítulo 4 Figura 4.8**). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la cepa salvaje y la mutante $\Delta irp1-3$, tal como se había observado anteriormente (**Figura 5.15**). Sin embargo, la sobrevida intracelular de la cepa $\Delta bfrDE \Delta irp1-3$ fue significativamente menor en comparación con la cepa salvaje y la cepa $\Delta irp1-3$ a las 24 horas post infección y significativamente menor al resto de las cepas a las 48 horas post infección (**Figura 5.21**). Este resultado indica que, al igual que en macrófagos, *B. pertussis* es capaz de utilizar al transportador IRP1-3 para adquirir hierro en células epiteliales durante su estadio intracelular en ausencia de los transportadores BfrD y BfrE. Asimismo, a diferencia de lo observado en macrófagos, se observaron diferencias en la persistencia intracelular tanto a las 24 como a las 48 horas post infección en las cepas analizadas.

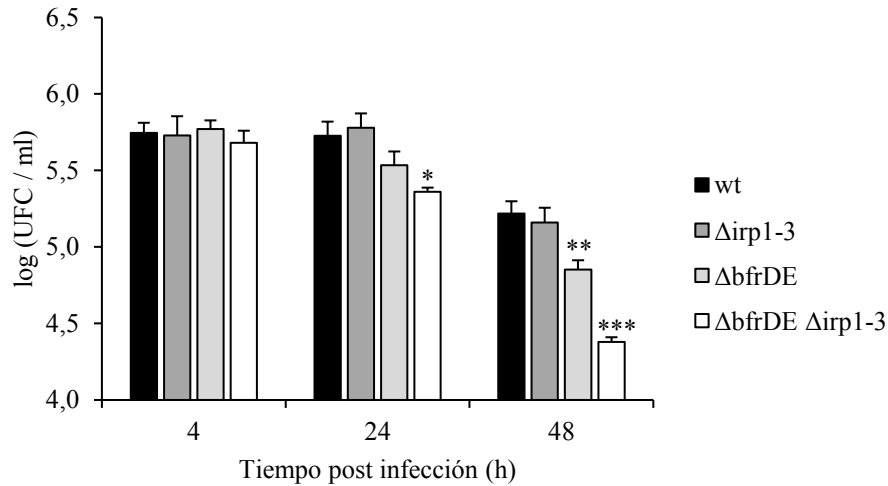


Figura 5.21: *B. pertussis* utiliza al transportador IRP1-3 para adquirir hierro en células del epitelio respiratorio en ausencia de los transportadores BfrD y BfrE. Células 16HBE14o- fueron incubadas con *B. pertussis* (R_ib/c 30) cepa salvaje (*wt*), cepa mutante en *irp1-3* ($\Delta irp1-3$), cepa mutante en *bfrDE* ($\Delta bfrDE$) o cepa mutante en *bfrDE* y en *irp1-3* ($\Delta bfrDE \Delta irp1-3$) durante 3 h. Después de tres lavados, las células fueron incubadas durante 1 h con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares y el número de UFC de *B. pertussis* por célula fue determinado a los distintos tiempos post infección. La polimixina B se mantuvo durante todo el tiempo de infección. Los datos representan la media \pm DE de dos experimentos independientes. La sobrevida intracelular de la cepa mutante $\Delta bfrDE \Delta irp1-3$ es significativamente diferente de las cepas salvaje y mutante $\Delta irp1-3$ a las 24 h post infección (* $p < 0,05$; test de ANOVA) y significativamente diferente al resto de las cepas a las 48 h post infección (** $p < 0,05$; test de ANOVA). La sobrevida intracelular de la cepa mutante $\Delta bfrDE$ difiere significativamente de las cepas salvaje e $\Delta irp1-3$ a las 48 h post infección (** $p < 0,05$; test de ANOVA).

5.3. Discusión

B. pertussis posee varios sistemas de alta afinidad de adquisición de hierro que facilitan la captura de este nutriente a partir de las distintas fuentes presentes en el huésped [66, 67]. En el **Capítulo 4** del presente trabajo se demostró que los receptores de catecolaminas BfrD y BfrE están involucrados en la captura de hierro intracelular de *B. pertussis* tanto en macrófagos como en células del epitelio respiratorio. Los resultados presentados en este capítulo sugieren que, además de estos receptores, *B. pertussis* posee otros mecanismos que median la captura de hierro durante el estadio intracelular. En particular, hemos demostrado mediante la construcción de una cepa mutante en tres receptores de hierro (BfrD, BfrE e IRP1-3) que el transportador periplásmico de Fe^{2+} IRP1-3 podría tener un rol relevante en la captura de este metal en el ambiente intracelular. Cabe destacar, sin embargo, que tanto los estudios de proteómica como los funcionales antes descritos sugieren que la captura de hierro a partir de los receptores BfrD y BfrE es una ruta importante de adquisición de este nutriente en el estadio intracelular de *B. pertussis*. En este sentido, los estudios indicaron que no hay diferencias estadísticamente significativas en la persistencia en células del hospedador entre una cepa defectiva en la expresión de IRP1-3 y la cepa salvaje, probablemente debido a la presencia de BfrD y BfrE, y tal vez otros receptores, que abastecen de hierro aun en ausencia de IRP1-3. Sin embargo, la sobrevida intracelular de una cepa mutante en estos tres receptores fue significativamente menor que la cepa salvaje, indicando que *B. pertussis* podría utilizar tanto Fe^{2+} como complejos hierro-catecolaminas como fuentes de hierro en su estadio intracelular. Estos estudios sugieren que IRP1-3 podría actuar como un receptor secundario de hierro requerido para la sobrevida intracelular de *B. pertussis* en células del hospedador, en ambientes donde el sustrato que transportan BfrD y BfrE no se encuentre disponible o sea insuficiente para suplir las necesidades de hierro de la bacteria.

IRP1-3 captura el hierro (II) que ingresa al periplasma a través de porinas presentes en la membrana externa de *B. pertussis* [46]. Las porinas son proteínas con estructura de barril β que se ubican en la membrana externa bacteriana y forman canales llenos de agua, que permiten la difusión de moléculas hidrofílicas pequeñas, como iones, azúcares y aminoácidos, hacia el espacio periplásmico mediante difusión pasiva [68]. En *Bordetella* se han caracterizado dos porinas mayoritarias: OmpP y OmpQ [69, 70]. OmpP

es una porina de expresión constitutiva en *B. pertussis* y con selectividad por sustratos con carga negativa [70]. Por otro lado, OmpQ es una porina cuya expresión se encuentra regulada positivamente por BvgAS [71]. OmpQ fue caracterizada en *B. bronchiseptica* como una porina probablemente involucrada en el transporte de sustratos con carga positiva debido a que la distribución de cargas dentro del canal que forma es predominantemente negativa [69], a diferencia de OmpP cuyas cargas predominantes son positivas [69]. La proteína OmpQ de *B. pertussis* tiene una similitud de secuencia del 100% con OmpQ de *B. bronchiseptica*, sugiriendo que cumplen una función similar en ambas especies. OmpQ podría ser la porina encargada de permitir el ingreso al periplasma de *B. pertussis* de cationes hierro (en estado Fe^{2+} o Fe^{3+}), así como también de otros cationes restringidos por el huésped como Mn^{2+} y Zn^{2+} [5]. En apoyo de esta hipótesis, el estudio del proteoma de *B. pertussis* presentado en el **Capítulo 3** mostró que la porina OmpQ no modifica su abundancia a las 3 horas post infección en bacterias intracelulares con respecto a las bacterias control, sin embargo, aumenta significativamente a las 48 horas post infección. Este resultado indica que OmpQ podría permitir el paso de un nutriente esencial para la persistencia intracelular de *B. pertussis*, como podría ser el Fe^{2+} , entre otros.

Los receptores BfrD y BfrE están potencialmente involucrados en la captura de hierro en *B. pertussis* intracelular a partir de compuestos catecoles producidos por el huésped (**Capítulo 4**). Como se mencionó en la Introducción de este capítulo, los receptores de hierro de membrana externa de bacterias Gram-negativas transportan el hierro o el complejo sustrato-hierro que capturan del medio extracelular al periplasma, donde otro sistema transportador es encargado de enviarlo al citoplasma. Dado que IRP1-3 es parte de un sistema encargado de transportar hierro ferroso al citoplasma [46], podría actuar en conjunto con los receptores de membrana externa BfrD y BfrE, si es que el hierro férrico capturado por estos receptores es reducido a hierro ferroso en el periplasma, de una manera análoga al sistema FpvCDEF de *Pseudomonas aeruginosa* [2, 13, 14], descrito anteriormente. Sin embargo, los resultados presentados en este capítulo no parecieran indicar que IRP1-3 actúe en conjunto con los receptores BfrD y BfrE, o al menos no sería el único sistema involucrado, dado que una cepa mutante en IRP1-3 no presenta un defecto en la sobrevivencia intracelular en células del hospedador, mientras que una cepa defectiva en BfrD y BfrE sí. La proteína AfuA pertenece a otro sistema de adquisición de hierro encargado de transportar hierro férrico del periplasma al citoplasma

en *B. pertussis* [50]. La expresión del receptor AfuA desaparece a lo largo de la sobrevida intracelular de *B. pertussis* (**Capítulo 3**), por lo que es poco probable que sea este el sistema de transporte que actúe en conjunto con los receptores BfrD y BfrE. Por lo tanto, estos resultados indican que debe existir otro sistema de transporte de hierro periplasmático aún no caracterizado involucrado en enviar hacia el citoplasma el hierro liberado en el periplasma por BfrD y BfrE [8].

La diversidad y redundancia de sistemas de adquisición de hierro potencialmente involucrados en la sobrevida de *B. pertussis* dentro de células del hospedador no es una característica única de esta bacteria. Diversos patógenos intracelulares utilizan estrategias múltiples para captar este micronutriente de diversas fuentes [27, 31]. Por ejemplo, se demostró que en *Francisella tularensis*, el agente etiológico de la tularemia, la inactivación individual del sistema de transporte de hierro ferroso (Feo) o del transportador de sideróforos-hierro férrico (Fsl) no modifica la replicación intracelular de este patógeno en macrófagos [31]. Sin embargo, un doble mutante $\Delta fslA \Delta feoB$ es incapaz de replicar en macrófagos y tiene una virulencia atenuada en un modelo murino de infección, indicando que *F. tularensis* utiliza simultáneamente los sideróforos y el Fe^{2+} como fuentes de hierro en su estadio intracelular y en la colonización del huésped [31]. Asimismo, se ha demostrado en *Shigella flexneri* que la inactivación individual de la síntesis del sideróforo aerobactina (*iucD*) o del transportador de hierro ferroso (*feoB*) o del transportador de Mn^{2+}/Fe^{2+} (*sitA*), no modifican la capacidad de este patógeno de replicar intracelularmente en células epiteliales [27]. Sin embargo, mutaciones simultáneas en dos de estos transportadores ($\Delta sitA \Delta iucD$; $\Delta sitA \Delta feoB$ ó $\Delta feoB \Delta iucD$) generan una replicación intracelular disminuida con respecto a la cepa salvaje, y la inactivación simultánea de estos tres transportadores elimina la capacidad de *S. flexneri* de replicar en células epiteliales del hospedador [27]. *S. flexneri* contiene, además del transportador SitA, un sistema de alta afinidad de transporte de Mn^{2+} llamado MntH [72], con lo cual los fenotipos observados por la mutación en el transportador SitA se deben a falta de Fe^{2+} y no de Mn^{2+} . En definitiva, *S. flexneri* en su estadio intracelular captaría hierro simultáneamente a partir de sideróforos y de Fe^{2+} libre, al igual que *F. tularensis*. Por último, mutaciones individuales en los transportadores de hierro ferroso Yfe y Feo no modifican la capacidad de crecimiento en macrófagos de *Yersinia pestis*, el agente causal de la peste bubónica [28]. Sin embargo, la inactivación simultánea de ambos sistemas impiden que *Y. pestis* multiplique en macrófagos, indicando que este patógeno

posee dos sistemas redundantes para la adquisición de Fe^{2+} en su estadio intracelular, y que éste sería su fuente principal de hierro en las células del hospedador [28]. En este sentido, nuestros resultados sugieren que *B. pertussis* también utiliza dos o más sistemas de captura de distintas fuentes de hierro en simultáneo durante su persistencia intracelular. De ellos podemos deducir que utiliza al menos el Fe^{2+} , a través del transportador IRP1-3, y los complejos hierro-catecolaminas, a través de BfrD y BfrE, entre otros sistemas que aún no hemos caracterizado.

Con respecto a los resultados obtenidos en macrófagos THP-1, es importante destacar que a tiempos tardíos post infección no se observaron defectos en la sobrevivencia intracelular de ninguna de las cepas mutantes analizadas ($\Delta irp1-3$, $\Delta bfrDE$ o $\Delta bfrDE \Delta irp1-3$), lo cual indica que esta bacteria tiene la capacidad de usar otras fuentes de hierro durante su persistencia intracelular. Una de ellas podría ser la captura de hemo a través del sistema Bhu [44] o bien a partir de un sistema de adquisición de hierro todavía no caracterizado. Es importante remarcar que el sistema de captura Bhu utiliza un transportador periplásmico específico (BhuTUV) para movilizar el hemo hacia el citoplasma, es decir, no depende de los transportadores periplásmicos IRP1-3 o AfuA [44, 50]. Por lo tanto, la cepa mutante en IRP1-3 utilizada en este estudio mantiene la capacidad de usar hemo como fuente de hierro. En relación a la disponibilidad de hemo dentro de la célula inmune, los niveles de este compuesto pueden alcanzar valores elevados debido al rol central que tienen los macrófagos en el reciclaje de esta fuente de hierro en el huésped [73]. Por un lado, los macrófagos se encargan de degradar a los eritrocitos senescentes [74, 75], en un proceso denominado eritrofagocitosis [76]. Este mecanismo involucra la fagocitosis de los eritrocitos senescentes y la fusión del fagosoma generado con vesículas lisosomales [76]. Allí los glóbulos rojos son degradados y su contenido, incluido el hemo presente en la hemoglobina, es posteriormente importado al citoplasma del macrófago para su almacenamiento o reciclaje [76]. Por otro lado, los macrófagos funcionan conjuntamente con las proteínas hemopexina y haptoglobina para recolectar el hemo y la hemoglobina liberada de las células dañadas, para evitar que las concentraciones de estos compuestos alcancen niveles tóxicos [77]. En el modelo de infección *in vitro* utilizado en este estudio podría haber disponibilidad de hemo debido a que la hemoglobina se encuentra presente en el suero fetal bovino utilizado en el medio de cultivo celular. Si bien la concentración de hemo en este medio es baja, es posible suponer que podría sostener la vida intracelular de esta bacteria. Se ha demostrado que

algunos patógenos intracelulares utilizan la captura de hemo para suplir sus necesidades de hierro, como es el caso de *Brucella abortus*, que dentro de los macrófagos adquiere este compuesto a partir de su receptor BhuA [78]. Si bien en el caso de *B. pertussis* se desconoce si el sistema Bhu tiene un papel en la captura de hierro intracelular, los diferentes resultados de sobrevivencia obtenidos usando células epiteliales y macrófagos sugieren que este sistema podría tener un rol relevante. En particular, a diferencia de lo que ocurre en macrófagos, las cepas $\Delta bfrDE$ y $\Delta bfrDE \Delta irp1-3$ presentan en células epiteliales una menor capacidad de sobrevivencia con respecto a las cepas salvaje tanto a las 24 como a las 48 horas post infección. Por el contrario, en los macrófagos se observó que, si bien hay diferencias en la sobrevivencia a las 24 horas post infección, las mismas desaparecen a las 48 horas. Este resultado sugiere que existen mecanismos compensatorios de adquisición de hierro en los macrófagos que están ausentes en las células epiteliales. De hecho, una diferencia importante entre estos dos tipos celulares es el mayor nivel de hemo intracelular en macrófagos, debido al rol que cumplen estos fagocitos en la homeostasis de este compuesto [74], característica que nos lleva a suponer que en los macrófagos el sistema Bhu podría tener un rol importante en la captura de hierro y que a través de este sistema *B. pertussis* es capaz de compensar la ausencia de BfrDE y de IRP1-3 a tiempos prolongados de infección. Asimismo, de las proteínas que componen el sistema Bhu, la única identificada en el estudio proteómico de bacterias aislada de macrófagos presentado en el **Capítulo 3** fue BhuS, una proteína potencialmente involucrada en la degradación de hemo [44]. BhuS fue identificada en todas las condiciones y no mostró un cambio de abundancia estadísticamente significativo, sugiriendo que en *B. pertussis* cepa salvaje este receptor no sería inducido en el estadio intracelular, probablemente debido a que la captura de hierro es mediada principalmente por BfrD y BfrE. En futuros ensayos se espera verificar si *B. pertussis* utiliza hemo como una fuente secundaria de hierro en su estadio intracelular en macrófagos mediante la construcción de mutantes defectivos en Bhu, en combinación con mutantes en BfrDE e IRP1-3, y su estudio en pruebas funcionales. Además, se planea realizar un estudio proteómico de bacterias aisladas de localización intracelular utilizando los distintos mutantes en dichos receptores de hierro, con el fin de analizar si existe una inducción diferencial de los distintos sistemas de captura de este micronutriente en estas cepas, que expliquen los resultados de sobrevivencia presentados en este trabajo.

Los resultados de infecciones de macrófagos en presencia de IFN- γ mostrados en este capítulo son indicativos de que *B. pertussis* es capaz de sobrevivir a la estimulación de las células huésped con esta citoquina, destacando la capacidad que tiene este patógeno para evadir la respuesta defensiva del huésped, al menos en este modelo experimental. Estos resultados diferencian a *B. pertussis* de otros patógenos cuya duplicación o persistencia intracelular es impedida mediante la estimulación de las células huésped con IFN- γ , que involucra mecanismos dependientes de la limitación de hierro, la limitación de triptófano y/o la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno [34, 79-86]. En este sentido, el efecto del IFN- γ en la persistencia intracelular de *B. pertussis* sería similar a lo encontrado para *Listeria monocytogenes* [87], *Salmonella Typhimurium* [87] y *Brucella melitensis* [88], para las cuales la estimulación de los macrófagos únicamente con IFN- γ no es suficiente para limitar la replicación intracelular de las mismas. Como se mencionó anteriormente, resultados previos de nuestro grupo han demostrado que *B. pertussis* es capaz de inhibir la acción bactericida y la respuesta proinflamatoria de los macrófagos durante la infección intracelular, principalmente a partir de la acción de la toxina pertussis (PT) y adenilato ciclasa (CyaA), generando un ambiente más permisivo para su persistencia [89]. Se están llevando a cabo nuevos estudios para evaluar si en el caso de *B. pertussis* la manipulación de la respuesta del macrófago también involucra mecanismos de retención de hierro, con el posible aumento en los niveles disponibles de este nutriente, y si esta respuesta se ve modificada por la estimulación con IFN- γ .

En este capítulo se muestran resultados que indican un rol de IRP1-3 en la adquisición de hierro en el estadio intracelular de *B. pertussis*, sin embargo, este transportador también podría ser importante para la supervivencia de este patógeno en su estadio extracelular en el tracto respiratorio. Las superficies del epitelio respiratorio tienen un pH que varía entre 7,9 y 5,5; siendo más ácidas bajo condiciones inflamatorias [90, 91]. En este sentido, es importante destacar que los ambientes ácidos favorecen la estabilidad del hierro (II), que es capturado por IRP1-3 [46], sugiriendo que este receptor podría estar involucrado en la adquisición de hierro en determinados sitios de la superficie del epitelio respiratorio en el hospedador. Por este motivo, se están llevando a cabo estudios para investigar si el transportador IRP1-3 cumple un rol en la infección y patogénesis *in vivo* de *B. pertussis*.

Los resultados presentados en este capítulo permiten explicar observaciones del estudio del proteoma de *B. pertussis* intracelular aislada de macrófagos humanos

presentado en el **Capítulo 3**. En el mismo se describe que de las más de 40 proteínas caracterizadas como inducidas bajo limitación de hierro [56] sólo se encontró un aumento significativo en la abundancia de los receptores BfrD y BfrE en las muestras intracelulares a las 3 h y 48 h post infección, y del transportador IRP1-3 a las 48 h post infección. Asimismo, se observó que la abundancia del receptor de hierro AfuA disminuyó hasta no ser detectado en tiempos tardíos post infección. En el **Capítulo 4** de esta Tesis se demostró que *B. pertussis* aumenta la expresión los receptores BfrD y BfrE *in vitro* en entornos ácidos y en donde la disponibilidad de hierro es escasa, que explicarían los resultados del estudio del proteoma, y que son requeridos para la sobrevivencia intracelular de esta bacteria. En este capítulo se muestra además que la expresión del receptor IRP1-3 también sigue estos patrones de expresión, es decir, aumenta sus niveles en entornos ácidos y/o limitados en hierro, como había sido demostrado previamente [46], y que forma parte de un mecanismo de captura de hierro involucrado en la persistencia intracelular de *B. pertussis*, independiente de los receptores BfrD y BfrE. Asimismo, los resultados presentados en este capítulo demuestran por primera vez que la expresión del receptor AfuA es regulada por el pH ambiental, siendo su expresión disminuida en entornos ligeramente ácidos. La regulación negativa de AfuA y la regulación positiva de IRP1-3 mediada por pH ácido podría ser explicada por el hecho que a bajo pH se favorece el estado ferroso del hierro, que captura IRP1-3, y disminuye la estabilidad del estado férrico, el cual es capturado por AfuA, determinando que los receptores de hierro férrico de *B. pertussis* no serían los indicados para la captura de este metal bajo estas condiciones. Esta regulación de los receptores BfrD, BfrE, IRP1-3 y AfuA indica que *B. pertussis* es capaz de detectar la acidez de su entorno y de adaptar, al menos, la expresión de sus sistemas de captura de hierro. Teniendo en cuenta que *B. pertussis* podría encontrar condiciones de acidez y limitación de hierro en su estadio intracelular en los compartimentos con características de endosomas tempranos en los que habita, se puede especular que estas señales químicas disparen una respuesta adaptativa en *B. pertussis* que posibilite su persistencia en células del hospedador, una estrategia que compartiría con otros patógenos intracelulares como *Brucella abortus* [92] y *Salmonella Typhimurium* [93].

5.4. Conclusiones

Los resultados presentados en este capítulo indican que el transportador IRP1-3 es utilizado para adquirir hierro en el estadio intracelular de *B. pertussis* en ausencia de los receptores BfrD y BfrE, tanto en macrófagos como en células del epitelio respiratorio de origen humano. Además, los resultados obtenidos sugieren que existen mecanismos compensatorios para la captura de hierro en ausencia de los receptores IRP1-3, BfrD y BfrE durante la persistencia intracelular de *B. pertussis* en macrófagos humanos, probablemente mediante la captura de hemo a través del sistema Bhu. Por otro lado, se mostró que *B. pertussis* es capaz de sobrevivir intracelularmente en macrófagos activados con la citoquina proinflamatoria IFN- γ . Por último, se observó que la expresión de los transportadores periplásmicos de hierro AfuA e IRP1-3 está regulada tanto por la limitación de hierro como por el pH ambiental.

5.5. Referencias

1. Skaar EP. The Battle for Iron between Bacterial Pathogens and Their Vertebrate Hosts. *PLoS Path.* 2010,6(8):e1000949.
2. Schalk IJ, Guillon L. Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways. *Amino Acids.* 2013,44(5):1267-1277.
3. Posey JE, Gherardini FC. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science.* 2000,288(5471):1651-1653.
4. Cassat JE, Skaar EP. Iron in infection and immunity. *Cell host & microbe.* 2013,13(5):509-519.
5. Kehl-Fie TE, Skaar EP. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Curr Opin Chem Biol.* 2010,14(2):218-224.
6. Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007,71(3):413-451.
7. Hood MI, Skaar EP. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol.* 2012,10(8).
8. Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quíñones F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev.* 2003,27(2-3):215-237.
9. Hickman SJ, Cooper RE, Bellucci L, Paci E, Brockwell DJ. Gating of TonB-dependent transporters by substrate-specific forced remodelling. *Nature Communications.* 2017,8:14804.
10. Cui J, Davidson AL. ABC solute importers in bacteria. *Essays Biochem.* 2011,50:85-99.
11. Cuiv PO, Clarke P, Lynch D, O'Connell M. Identification of *rhtX* and *fptX*, novel genes encoding proteins that show homology and function in the utilization of the siderophores rhizobactin 1021 by *Sinorhizobium meliloti* and pyochelin by *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. *J Bacteriol.* 2004,186(10):2996-3005.
12. Hannauer M, Barda Y, Mislin GL, Shanzer A, Schalk IJ. The ferrichrome uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa* involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and recycling of the modified desferrichrome. *J Bacteriol.* 2010,192(5):1212-1220.
13. Greenwald J, Hoegy F, Nader M, Journet L, Mislin GL, Graumann PL, Schalk IJ. Real Time Fluorescent Resonance Energy Transfer Visualization of Ferric Pyoverdine Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. A role for ferrous iron. *J Biol Chem.* 2007,282(5):2987-2995.
14. Brillet K, Ruffenach F, Adams H, Journet L, Gasser Vr, Hoegy F, Guillon L, Hannauer MI, Page A, Schalk IJ. An ABC transporter with two periplasmic binding proteins involved in iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem Biol.* 2012,7(12):2036-2045.
15. Imperi F, Tiburzi F, Visca P. Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2009,106(48):20440-20445.
16. Cescau S, Cwerman H, Létoffé S, Delepelaire P, Wandersman C, Biville F. Heme acquisition by hemophores. *BioMetals.* 2007,20(3):603.
17. Cornelissen CN. Transferrin-iron uptake by Gram-negative bacteria. *Front Biosci.* 2003,8:d836-847.
18. Schryvers AB, Bonnah R, Yu R-h, Wong H, Retzer M, Bacterial lactoferrin receptors, in *Advances in Lactoferrin Research.* 1998, Springer. p. 123-133.
19. Cartron ML, Maddocks S, Gillingham P, Craven CJ, Andrews SC. Feo--transport of ferrous iron into bacteria. *BioMetals.* 2006,19(2):143-157.

20. Perry RD, Craig SK, Abney J, Bobrov AG, Kirillina O, Mier Jr I, Truszczynska H, Fetherston JD. Manganese transporters Yfe and MntH are Fur-regulated and important for the virulence of *Yersinia pestis*. *Microbiology*. 2012,158(3):804-815.
21. Rajasekaran MB, Nilapwar S, Andrews SC, Watson KA. EfeO-cupredoxins: major new members of the cupredoxin superfamily with roles in bacterial iron transport. *BioMetals*. 2010,23(1):1.
22. Koch D, Chan AC, Murphy ME, Lilie H, Grass G, Nies DH. Characterization of a dipartite iron uptake system from uropathogenic *Escherichia coli* strain F11. *J Biol Chem*. 2011,286(28):25317-25330.
23. Stojiljkovic I, Cobeljic M, Hantke K. *Escherichia coli* K-12 ferrous iron uptake mutants are impaired in their ability to colonize the mouse intestine. *FEMS Microbiol Lett*. 1993,108(1):111-115.
24. Tsolis RM, Bäumlér AJ, Heffron F, Stojiljkovic I. Contribution of TonB-and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infect Immun*. 1996,64(11):4549-4556.
25. Velayudhan J, Hughes NJ, McColm AA, Bagshaw J, Clayton CL, Andrews SC, Kelly DJ. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol Microbiol*. 2000,37(2):274-286.
26. Payne SM. Iron acquisition in microbial pathogenesis. *Trends Microbiol*. 1993,1(2):66-69.
27. Runyen-Janecky L, Reeves S, Gonzales E, Payne S. Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, Iuc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition in vitro and in cultured cells. *Infect Immun*. 2003,71(4):1919-1928.
28. Perry RD, Mier I, Fetherston JD. Roles of the Yfe and Feo transporters of *Yersinia pestis* in iron uptake and intracellular growth. *BioMetals*. 2007,20(3-4):699.
29. Robey M, Cianciotto NP. *Legionella pneumophila* feoAB promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. *Infect Immun*. 2002,70(10):5659-5669.
30. Naikare H, Palyada K, Panciera R, Marlow D, Stintzi A. Major role for FeoB in *Campylobacter jejuni* ferrous iron acquisition, gut colonization, and intracellular survival. *Infect Immun*. 2006,74(10):5433-5444.
31. Pérez NM, Ramakrishnan G. The reduced genome of the *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) encodes two iron acquisition systems essential for optimal growth and virulence. *PLoS ONE*. 2014,9(4):e93558.
32. Elhassanny AE, Anderson ES, Menscher EA, Roop RM, 2nd. The ferrous iron transporter FtrABCD is required for the virulence of *Brucella abortus* 2308 in mice. *Mol Microbiol*. 2013,88(6):1070-1082.
33. Schaible UE, Kaufmann SH. Iron and microbial infection. *Nature Reviews Microbiology*. 2004,2(12):946.
34. Byrd TF, Horwitz MA. Interferon gamma-activated human monocytes downregulate transferrin receptors and inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron. *J Clin Invest*. 1989,83(5):1457-1465.
35. Ludwiczek S, Aigner E, Theurl I, Weiss G. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood*. 2003,101(10):4148-4154.
36. Nairz M, Fritsche G, Brunner P, Talasz H, Hantke K, Weiss G. Interferon-gamma limits the availability of iron for intramacrophage *Salmonella typhimurium*. *Eur J Immunol*. 2008,38(7):1923-1936.
37. Byrd TF, Horwitz MA. Regulation of transferrin receptor expression and ferritin content in human mononuclear phagocytes. Coordinate upregulation by iron transferrin and downregulation by interferon gamma. *The Journal of Clinical Investigation*. 1993,91(3):969-976.

38. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S, Aderem A. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*. 2004,432(7019):917-921.
39. Warfel JM, Merkel TJ. *Bordetella pertussis* infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates. *Mucosal Immunol*. 2013,6(4):787-796.
40. Mascart F, Verscheure V, Malfroot A, Hainaut M, Piérard D, Temerman S, Peltier A, Debie A-S, Levy J, Del Giudice G, Locht C. *Bordetella pertussis* Infection in 2-Month-Old Infants Promotes Type 1 T Cell Responses. *The Journal of Immunology*. 2003,170(3):1504-1509.
41. Ryan M, Murphy G, Gothefors L, Nilsson L, Storsaeter J, Mills KHG. *Bordetella pertussis* Respiratory Infection in Children Is Associated with Preferential Activation of Type 1 T Helper Cells. *The Journal of Infectious Diseases*. 1997,175(5):1246-1250.
42. Moore CH, Foster LA, Gerbig DG, Jr., Dyer DW, Gibson BW. Identification of alcaligin as the siderophore produced by *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *J Bacteriol*. 1995,177(4):1116-1118.
43. Beall B, Sanden GN. A *Bordetella pertussis* *fepA* homologue required for utilization of exogenous ferric enterobactin. *Microbiology*. 1995,141 (Pt 12):3193-3205.
44. Vanderpool CK, Armstrong SK. The *Bordetella* *bhu* locus is required for heme iron utilization. *J Bacteriol*. 2001,183(14):4278-4287.
45. Brickman TJ, Suhadolc RJ, Armstrong SK. Interspecies variations in *Bordetella* catecholamine receptor gene regulation and function. *Infect Immun*. 2015,83(12):4639-4652.
46. Brickman TJ, Armstrong SK. Iron and pH-responsive FtrABCD ferrous iron utilization system of *Bordetella* species. *Mol Microbiol*. 2012,86(3):580-593.
47. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MT, y col. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet*. 2003,35(1):32-40.
48. Gorringer AR, Woods G, Robinson A. Growth and siderophore production by *Bordetella pertussis* under iron-restricted conditions. *FEMS Microbiol Lett*. 1990,54(1-3):101-105.
49. Menozzi FD, Gantiez C, Locht C. Identification and purification of transferrin- and lactoferrin-binding proteins of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun*. 1991,59(11):3982-3988.
50. Brickman TJ, Cummings CA, Liew SY, Relman DA, Armstrong SK. Transcriptional profiling of the iron starvation response in *Bordetella pertussis* provides new insights into siderophore utilization and virulence gene expression. *J Bacteriol*. 2011,193(18):4798-4812.
51. Banerjee S, Weerasinghe AJ, Parker Siburt CJ, Kreulen RT, Armstrong SK, Brickman TJ, Lambert LA, Crumbliss AL. *Bordetella pertussis* FbpA binds both unchelated iron and iron siderophore complexes. *Biochemistry (Mosc)*. 2014,53(24):3952-3960.
52. Vidakovics ML, Paba J, Lamberti Y, Ricart CA, de Sousa MV, Rodriguez ME. Profiling the *Bordetella pertussis* proteome during iron starvation. *J Proteome Res*. 2007,6(7):2518-2528.
53. Cao J, Woodhall MR, Alvarez J, Cartron ML, Andrews SC. EfeUOB (YcdNOB) is a tripartite, acid-induced and CpxAR-regulated, low-pH Fe²⁺ transporter that is cryptic in *Escherichia coli* K-12 but functional in *E. coli* O157: H7. *Mol Microbiol*. 2007,65(4):857-875.
54. Alvarez Hayes J, Erben E, Lamberti Y, Ayala M, Maschi F, Carbone C, Gatti B, Parisi G, Rodriguez ME. Identification of a new protective antigen of *Bordetella pertussis*. *Vaccine*. 2011,29(47):8731-8739.
55. Debut AJ, Dumay QC, Barabote RD, Saier Jr MH. The iron/lead transporter superfamily of Fe³⁺/Pb²⁺ uptake systems. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2006,11(1-2):1-9.

56. Alvarez Hayes J, Lamberti Y, Surmann K, Schmidt F, Volker U, Rodriguez ME. Shotgun proteome analysis of *Bordetella pertussis* reveals a distinct influence of iron availability on the bacterial metabolism, virulence, and defense response. *Proteomics*. 2015,15(13):2258-2266.
57. Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovics ML, Harvill ET, Rodriguez ME. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun*. 2010,78(3):907-913.
58. Huynh KK, Grinstein S. Regulation of vacuolar pH and its modulation by some microbial species. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007,71(3):452-462.
59. Altamirano-Silva P, Meza-Torres J, Castillo-Zeledón A, Ruiz-Villalobos N, Zuñiga-Pereira AM, Chacón-Díaz C, Moreno E, y col. *Brucella abortus* senses the intracellular environment through the two-component system BvrR/BvrS allowing the adaptation to its replicative niche. *Infect Immun*. 2018:IAI. 00713-00717.
60. Alvarez Hayes J, Erben E, Lamberti Y, Principi G, Maschi F, Ayala M, Rodriguez ME. *Bordetella pertussis* iron regulated proteins as potential vaccine components. *Vaccine*. 2013,31(35):3543-3548.
61. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. 2001,25(4):402-408.
62. Warfel JM, Zimmerman LI, Merkel TJ. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013.
63. Basham TY, Merigan TC. Recombinant interferon-gamma increases HLA-DR synthesis and expression. *The Journal of Immunology*. 1983,130(4):1492-1494.
64. Maródi L, Schreiber S, Anderson DC, MacDermott RP, Korchak HM, Johnston RB, Jr. Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors. *The Journal of Clinical Investigation*. 1993,91(6):2596-2601.
65. Lamberti Y, Gorgojo J, Massillo C, Rodriguez ME. *Bordetella pertussis* entry into respiratory epithelial cells and intracellular survival. *Pathog Dis*. 2013,69(3):194-204.
66. Brickman TJ, Anderson MT, Armstrong SK. *Bordetella* iron transport and virulence. *BioMetals*. 2007,20(3-4):303-322.
67. Brickman TJ, Hanawa T, Anderson MT, Suhadolc RJ, Armstrong SK. Differential expression of *Bordetella pertussis* iron transport system genes during infection. *Mol Microbiol*. 2008,70(1):3-14.
68. Achouak W, Heulin T, Pagès J-M. Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiol Lett*. 2001,199(1):1-7.
69. Cattelan N, Villalba MI, Parisi G, Arnal L, Serra DO, Aguilar M, Yantorno O. Outer membrane protein OmpQ of *Bordetella bronchiseptica* is required for mature biofilm formation. *Microbiology*. 2016,162(2):351-363.
70. Armstrong S, Parr T, Parker C, Hancock R. *Bordetella pertussis* major outer membrane porin protein forms small, anion-selective channels in lipid bilayer membranes. *J Bacteriol*. 1986,166(1):212-216.
71. Finn TM, Li Z, Kocsis E. Identification of a *Bordetella pertussis* bvg-regulated porin-like protein. *J Bacteriol*. 1995,177(3):805-809.
72. Runyen-Janecky L, Dzenski E, Hawkins S, Warner L. Role and regulation of the *Shigella flexneri* Sit and MntH systems. *Infect Immun*. 2006,74(8):4666-4672.
73. Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Biochem*. 2002,91(1):9-18.
74. Bratosin D, Mazurier J, Tissier J, Estaquier J, Huart J, Ameisen J, Aminoff D, Montreuil J. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie*. 1998,80(2):173-195.

75. Bennett G, Kay M. Homeostatic removal of senescent murine erythrocytes by splenic macrophages. *Exp Hematol*. 1981,9(3):297-307.
76. Korolnek T, Hamza I. Macrophages and iron trafficking at the birth and death of red cells. *Blood*. 2015,125(19):2893-2897.
77. Taketani S. Aquisition, mobilization and utilization of cellular iron and heme: endless findings and growing evidence of tight regulation. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2005,205(4):297-318.
78. Paulley JT, Anderson ES, Roop RM, 2nd. *Brucella abortus* requires the heme transporter BhuA for maintenance of chronic infection in BALB/c mice. *Infect Immun*. 2007,75(11):5248-5254.
79. Bhardwaj N, Nash T, Horwitz M. Interferon-gamma-activated human monocytes inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *The Journal of Immunology*. 1986,137(8):2662-2669.
80. Denis M. Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. *Cell Immunol*. 1991,132(1):150-157.
81. Pfefferkorn E. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1984,81(3):908-912.
82. Pollok RC, Farthing MJ, Bajaj-Elliott M, Sanderson IR, McDonald V. Interferon gamma induces enterocyte resistance against infection by the intracellular pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Gastroenterology*. 2001,120(1):99-107.
83. Murray H, Rubin B, Rothermel C. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *The Journal of clinical investigation*. 1983,72(4):1506-1510.
84. Dimier I, Bout D. Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication: a role for intracellular iron. *Immunology*. 1998,94(4):488.
85. Jiang X, Baldwin CL. Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. *Infect Immun*. 1993,61(1):124-134.
86. Anthony L, Morrissey P, Nano F. Growth inhibition of *Francisella tularensis* live vaccine strain by IFN-gamma-activated macrophages is mediated by reactive nitrogen intermediates derived from L-arginine metabolism. *The Journal of Immunology*. 1992,148(6):1829-1834.
87. Van Dissel J, Stikkelbroeck J, Michel B, Van den Barselaar MT, Leijh P, Van Furth R. Inability of recombinant interferon-gamma to activate the antibacterial activity of mouse peritoneal macrophages against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *The Journal of Immunology*. 1987,139(5):1673-1678.
88. Eze MO, Yuan L, Crawford RM, Paranaivitana CM, Hadfield TL, Bhattacharjee AK, Warren RL, Hoover DL. Effects of opsonization and gamma interferon on growth of *Brucella melitensis* 16M in mouse peritoneal macrophages in vitro. *Infect Immun*. 2000,68(1):257-263.
89. Valdez HA, Oviedo JM, Gorgojo JP, Lamberti Y, Rodriguez ME. *Bordetella pertussis* modulates human macrophage defense gene expression. *Pathog Dis*. 2016,74(6).
90. Ng AW, Bidani A, Heming TA. Innate host defense of the lung: effects of lung-lining fluid pH. *Lung*. 2004,182(5):297-317.
91. Fischer H, Widdicombe JH. Mechanisms of acid and base secretion by the airway epithelium. *J Membr Biol*. 2006,211(3):139-150.
92. Boschiroli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazevieille C, Liautard JP, Ramuz M, O'Callaghan D. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002,99(3):1544-1549.

93. Aranda CA, Swanson JA, LooMIs WP, Miller SI. *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992,89(21):10079-10083.

Capítulo 6

**Estudio del factor MgtC y su
contribución en la persistencia
intracelular de *B. pertussis***

6. Estudio del factor MgtC y su contribución en la persistencia intracelular de *B. pertussis*

6.1 Introducción

El magnesio (Mg^{2+}) es el catión divalente más abundante en las células y el segundo catión más abundante después del potasio (K^+) [1]. El Mg^{2+} desempeña varias funciones esenciales, que incluyen la estabilización de las membranas celulares y de los complejos macromoleculares, como los ribosomas, la neutralización de los ácidos nucleicos y nucleótidos, y es utilizado además como cofactor en diversas reacciones enzimáticas [2, 3]. Las propiedades químicas del Mg^{2+} lo hacen único entre los cationes biológicos. Su tamaño, densidad de carga, estructura y química en solución acuosa difieren considerablemente de otros cationes monovalentes o divalentes de relevancia biológica [4]. Debido a estas propiedades químicas las interacciones biológicas donde interviene Mg^{2+} son diferentes de las de otros cationes [3]. Por estos motivos, si bien ciertos cationes pueden reemplazar al Mg^{2+} en algunas de las funciones, otras actividades dependen estrictamente de este catión, determinando que las células posean mecanismos específicos para garantizar los niveles fisiológicos de este micronutriente [2].

Las primeras investigaciones sobre el metabolismo del Mg^{2+} en procariotas demostraron que este catión es esencial para el crecimiento bacteriano [5]. Estudios posteriores han demostrado que las bacterias detectan los niveles de Mg^{2+} , tanto en su entorno como dentro del citoplasma, y regulan a través de estas señales una serie de respuestas para mantener el Mg^{2+} en los niveles requeridos [2]. Se han identificado cuatro clases diferentes de transportadores de Mg^{2+} en procariotas: CorA [6], MgtE [7], MgtA [8] y un transportador descrito recientemente relacionado con el transportador eucariota de cationes divalentes Nramp [9]. CorA fue identificado como un sistema basal de captura de Mg^{2+} en *Escherichia coli*, y nombrado así debido a su capacidad para intervenir en la incorporación de cobalto (Co^{2+}), que es tóxico (*Cobalt resistance*) [10]. El transportador CorA también puede mediar el eflujo de Mg^{2+} , aunque la relevancia fisiológica de esta capacidad es incierta [3]. MgtE fue identificado por primera vez en *Bacillus firmus* como un transportador de Mg^{2+} [7]. Aunque MgtE no está relacionado con CorA en su secuencia o estructura, tanto CorA como MgtE utilizan el gradiente electroquímico a

través de la membrana citoplásmica para transportar sus sustratos [4]. Por lo tanto, pueden ser considerados canales en vez de transportadores. El gradiente electroquímico a través de la membrana bacteriana es altamente negativo por dentro y, por ende, proporciona la energía potencial necesaria para producir el influjo de Mg^{2+} incluso cuando la concentración extracelular de este catión es baja (micromolar) [4]. Debido a la dependencia de CorA y MgtE del potencial de membrana, el transporte a través de ellos puede verse influenciado por cambios en el pH externo, en la actividad de los componentes de la cadena de transporte de electrones o en fluctuaciones en las concentraciones de otros iones [2]. La apertura de los canales CorA y MgtE se encuentra regulada, y concentraciones elevadas de Mg^{2+} en el citoplasma producen el cierre de los mismos [11]. Por último, MgtA pertenece al grupo de ATPasas tipo P [2]. Esta familia de proteínas utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para transportar una variedad de moléculas cargadas. La transferencia del grupo fosfato del ATP a MgtA da como resultado un cambio conformacional en el mismo que promueve el transporte de Mg^{2+} [12]. A diferencia de otras ATPasas de tipo P, que utilizan energía derivada de la hidrólisis de ATP para transportar sus sustratos en contra de un gradiente electroquímico, el transportador MgtA moviliza Mg^{2+} a favor de un gradiente, con lo cual la necesidad de acoplar a este proceso la hidrólisis del ATP es incierta [4]. Sin embargo, se ha demostrado que en cepas patogénicas de *Escherichia coli*, bajo ciertas condiciones ambientales, se produce una reversión del potencial de membrana a través de la activación del sistema de dos componentes PhoPQ [13]. La activación de PhoPQ en estas cepas produce un aumento en la expresión de MgtA. Bajo estas condiciones, en las que los gradientes electroquímicos son desfavorables para el movimiento de Mg^{2+} a través de un canal, sería crucial la actividad del transportador MgtA que podría introducir Mg^{2+} en el citoplasma utilizando la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP [2]. CorA y MgtE, que se consideran los principales transportadores de Mg^{2+} en procariotas, tienen una amplia distribución filogenética, mientras que MgtA se produce solamente en un grupo de bacterias [2]. En general CorA está ausente en organismos con genomas muy pequeños en los que prevalece MgtE [4]. Además de los importadores de Mg^{2+} , existen otras proteínas cuya función es exportar Mg^{2+} del citoplasma al medio extracelular, como son CorB, CorC y CorD, identificados en *Salmonella enterica* [14], y el transportador MpfA de *Staphylococcus aureus* [15]. La relevancia fisiológica de la exportación de Mg^{2+} aún no ha sido establecida.

Una parte significativa del contenido total de Mg^{2+} de bacterias Gram-negativas está presente en la envoltura celular [16], destacando la necesidad de mantener la homeostasis de Mg^{2+} en compartimentos subcelulares distintos del citoplasma, como son el periplasma y la membrana externa. De hecho, un tercio del contenido total de Mg^{2+} de *E. coli* se encuentra presente en su LPS [17]. El LPS está cargado negativamente debido a los residuos de fosfato presentes tanto en el lípido A como en las regiones centrales. El Mg^{2+} , y en menor medida otros cationes divalentes, normalmente neutralizan estas cargas negativas, evitando así la repulsión electrostática entre moléculas de LPS. Se ha observado que en condiciones de limitación de Mg^{2+} el LPS está modificado de manera tal que la carga negativa neta del mismo es menor. De esta manera, estas modificaciones liberan Mg^{2+} , aumentando su disponibilidad para otras funciones celulares que tienen una dependencia estricta por este catión. Así, el LPS podría funcionar como un reservorio de Mg^{2+} para las bacterias [2].

La regulación de la expresión de transportadores de Mg^{2+} en bacterias depende de la detección de los niveles de este catión tanto en localización extracelular como en el citoplasma. El Mg^{2+} extracelular es detectado principalmente por sistemas de dos componentes. Este es el caso del sistema PhoPQ de *Salmonella enterica* [18] y del sistema CsrRS de *Streptococcus* Grupo A (GAS) [19], cuya actividad es regulada por los niveles extracelulares de Mg^{2+} , con la consiguiente inducción de la expresión tanto de transportadores de Mg^{2+} como de otros genes relacionados con la virulencia. Con respecto a la regulación en el citoplasma, niveles elevados de Mg^{2+} pueden impedir el proceso de traducción del ARNm que codifica para transportadores involucrados en la adquisición de este catión [20, 21]. En esta regulación interviene la región 5' no codificante del ARNm que funciona como un dispositivo sensor de Mg^{2+} (*riboswitch*). Esta región del ARNm cambia su conformación cuando une iones Mg^{2+} , impidiendo su traducción. Este es el caso de la regulación de los genes *mgtA* y *mgtB* de *Salmonella enterica* y del gen *mgtE* de *Bacillus subtilis* [20, 21]. Este mecanismo permite que se apague la expresión de transportadores de Mg^{2+} cuando se han suplido las necesidades de Mg^{2+} en el citoplasma.

Varios estudios muestran que los transportadores de Mg^{2+} están involucrados en la virulencia bacteriana. Por ejemplo, el transportador de Mg^{2+} CorA es requerido para la virulencia de *Salmonella enterica* en ratones así como también para la invasión y replicación intracelular de esta patógeno en células epiteliales [22]. Mediante el uso de

cepas mutantes, se demostró que la eliminación de CorA está relacionada con una disminución en la expresión de genes de virulencia regulados por los niveles de Mg^{2+} intracelulares, como el sistema de secreción de tipo III (SST3) [22]. Asimismo, se ha reportado que el transportador MgtE de *Pseudomonas aeruginosa* está involucrado en la regulación de la expresión del SST3, en un mecanismo que relaciona la disponibilidad de Mg^{2+} con la virulencia de este patógeno [23]. Por otro lado, se ha documentado que el transportador MgtE, y por lo tanto los niveles de Mg^{2+} , estaría involucrado en la capacidad de movilidad de *Aeromonas hydrophila*, un patógeno de peces y anfibios, y que este defecto afecta dos mecanismos de patogenicidad relacionados con la movilidad, como son la adhesión a las células del hospedador y la formación de *biofilm* [24].

Otro factor implicado en la virulencia de diversos patógenos que se encuentra relacionado con el metabolismo de Mg^{2+} es MgtC [25]. Este factor de virulencia ha sido adquirido a través de transferencia horizontal de genes durante la evolución de numerosas bacterias [26]. Se ha demostrado que MgtC favorece la sobrevivencia intracelular en células del hospedador de un gran número de patógenos entre los que se encuentran *Salmonella Typhimurium* [27], *Salmonella Typhi* [28], *Mycobacterium tuberculosis* [29], *Brucella suis* [30], *Yersinia pestis* [31], *Burkholderia cenocepacia* [32], *Pseudomonas aeruginosa* [25], *Mycobacterium abscessus* [33] y *Mycobacterium marinum* [34]. Esta promoción de la sobrevivencia intracelular estaría relacionada con la capacidad de MgtC de favorecer el crecimiento bacteriano en ambientes ácidos y/o limitados en magnesio [35].

Si bien MgtC ha sido considerado inicialmente un transportador de magnesio [36], estudios recientes sugieren que esta proteína no está directamente involucrada con el transporte de este catión sino que cumple un rol relevante en la homeostasis del ATP [37]. En particular, se encontró que MgtC es capaz de inhibir la actividad de la ATP sintasa bacteriana [37]. Las ATP sintasas utilizan el gradiente electroquímico de protones como fuente de energía para sintetizar ATP [38]. En las bacterias Gram-negativas, la ATP sintasa se encuentra en la membrana interna, mientras que los protones son exportados al periplasma para generar un gradiente electroquímico entre este compartimento y el citoplasma (**Figura 6.1**). La membrana externa de las bacterias es permeable a los protones [39], lo que significa que cuando éstas experimentan una disminución en el pH del medio, también habrá un aumento de concentración de protones en el periplasma. Para evitar una producción excesiva de ATP como consecuencia del elevado gradiente de protones, se produce un aumento en la expresión de MgtC como un mecanismo para

modular la actividad de la ATP sintasa, evitando así un desbalance metabólico (**Figura 6.1**). Por otro lado, una alta proporción del magnesio celular está quelado por nucleótidos trifosfato, incluido el ATP [2]. Se ha encontrado que MgtC también es producido en condiciones de limitación de Mg^{2+} [35]. El aumento de MgtC en estas condiciones, y la consiguiente inhibición de la ATP sintasa, produce una disminución de la concentración de ATP y resulta en un aumento en la biodisponibilidad del magnesio (**Figura 6.1**). De esta manera, MgtC tendría un efecto dual evitando por un lado un desbalance metabólico por formación excesiva de ATP y aumentando por el otro la biodisponibilidad de Mg^{2+} en condiciones de crecimiento adversas.

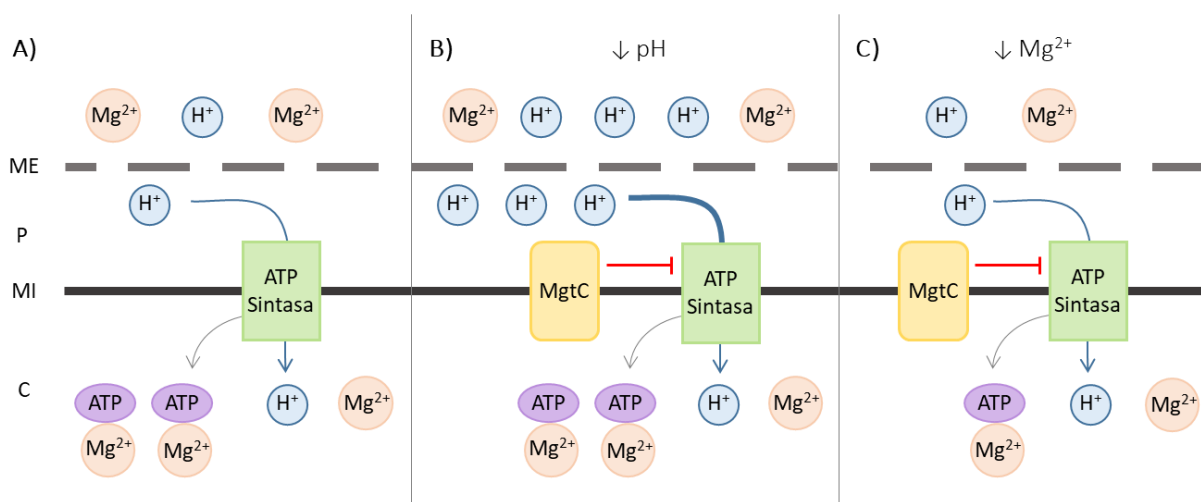


Figura 6.1. Modelo del rol propuesto para MgtC. **A)** En condiciones de pH neutro y exceso de Mg^{2+} , la ATP sintasa utiliza el gradiente electroquímico de H^+ para sintetizar ATP a partir de ADP y P_i (no se muestra). En estas condiciones MgtC no se produce. **B)** En condiciones de acidez, el gradiente electroquímico de H^+ entre el periplasma y el citoplasma aumenta. MgtC en estas condiciones se expresa e inhibe la ATP sintasa, evitando así un incremento excesivo en la producción de ATP. **C)** En ambientes limitados en Mg^{2+} , MgtC se expresa y disminuye la actividad de la ATP sintasa. De esta manera se reducen los niveles citoplasmáticos de ATP y se produce una liberación del Mg^{2+} que estaba unido a ellos, con el fin de aumentar su biodisponibilidad. ME: membrana externa. P: periplasma. MI: membrana interna. C: citoplasma.

El genoma de *B. pertussis* codifica para varias proteínas con homología a factores involucrados en la homeostasis de Mg^{2+} , como son MgtC (BP0414), el transportador de Mg^{2+} MgtE (BP2806) y los exportadores de Mg^{2+} CorC (BP1038) y CorD (BP3267, también llamado ApaG). Sin embargo, no existen estudios que investiguen la homeostasis de Mg^{2+} en *Bordetella*, el rol que cumplen estas proteínas en este proceso, ni la relación entre los niveles de Mg^{2+} y la virulencia de este patógeno. En este sentido, el estudio del

proteoma de *B. pertussis* intracelular ha brindado información relevante en cuanto a los mecanismos de adaptación de esta bacteria al microambiente intracelular. En particular, BP0414 fue identificada solamente en muestras de *B. pertussis* aislada a las 48 hs post infección, sugiriendo que su expresión se induce en localización intracelular y a tiempos tardíos de infección. Esta proteína, cuya expresión en *B. pertussis* no había sido reportada anteriormente, presenta homología con el factor de virulencia MgtC que, como se mencionó anteriormente, es relevante para el establecimiento de infecciones intracelulares exitosas en diversos patógenos [25].

Como ya se mencionó, trabajos previos de nuestro grupo indican que *B. pertussis* sobrevive en compartimentos con características de endosomas tempranos dentro de macrófagos humanos [40], cuyo pH es moderadamente ácido [41]. La concentración de magnesio en los fagosomas es controversial, pero existen estudios que sugieren que este catión tendría una concentración baja en estos compartimentos [42]. En este contexto, la detección de BP0414 en las bacterias intracelulares sugiere que este homólogo de MgtC podría tener un rol relevante en la adaptación de *B. pertussis* al interior fagosomal, ya que es un factor crítico para la adaptación de otros patógenos a este tipo de ambientes [35]. En este contexto, se decidió evaluar si BP0414 (en adelante MgtC) está involucrado en la adaptación de *B. pertussis* a las condiciones de estrés que se encuentran en el interior de las células del hospedador, y su eventual contribución a la sobrevivencia intracelular de este patógeno.

6.2. Resultados

6.2.1. Caracterización bioinformática de MgtC y su región genómica

El gen BP0414 de *B. pertussis* codifica para una proteína con homología a MgtC de posible localización en la membrana interna bacteriana. Este gen está situado en el genoma de *B. pertussis* entre un pseudogen (BP0413) y el gen *terC* (BP0415) que codifica una proteína de membrana hipotética implicada en la resistencia a telurio (**Figura 6.2**). Este contexto genómico, así como las regiones promotoras y terminadoras de la transcripción predichas mediante métodos bioinformáticos, sugieren que MgtC de *B. pertussis* no es parte de un operón sino que es monocistrónico como MgtC de *Burkholderia cenocepacia* [32]. Datos de un transcriptoma primario de *B. pertussis* recientemente publicado [43] muestran que *mgtC* se expresa a partir de su propio promotor como un transcripto monocistrónico, confirmando el análisis bioinformático.

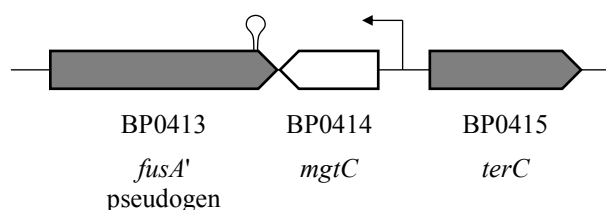


Figura 6.2. Organización genética de la región que contiene a *mgtC* en *B. pertussis*. Los genes se representan con flechas que indican la dirección predicha de la transcripción. El gen *mgtC* parece ser una unidad de transcripción discreta situada corriente abajo de un pseudogen *fusA*. El posible promotor y terminador de la transcripción de *mgtC* determinados según métodos bioinformáticos se indican con una flecha vertical y un símbolo de horquilla, respectivamente.

La secuencia de aminoácidos de MgtC de *B. pertussis* es 23% idéntica a la secuencia de MgtC de *Salmonella* Typhimurium, 23% a MgtC de *Burkholderia cenocepacia*, y 21% idéntica a MgtC de *Mycobacterium tuberculosis*, tres patógenos en los cuales se determinó que MgtC interviene en la persistencia intracelular y en la adaptación a ambientes limitados en Mg^{2+} o ligeramente ácidos [27, 29, 32]. Cabe destacar que la secuencia de MgtC de *B. cenocepacia* es 21% idéntica a MgtC de *S. Typhimurium* y 19% idéntica en comparación con MgtC de *M. tuberculosis*, sugiriendo que incluso con un bajo porcentaje de identidad, este factor cumple funciones similares en estos patógenos. Asimismo, mediante un análisis de secuencia de las proteínas MgtC

caracterizadas de diferentes patógenos y MgtC de *B. pertussis*, se determinó que todas contienen el dominio MgtC hidrofóbico conservado en el extremo N-terminal (**Figura 6.3**). Estos resultados sugieren que BP0414 es un homólogo de MgtC.



Figura 6.3. Análisis de secuencias proteicas de MgtC caracterizadas en diversos patógenos.

Se realizó un análisis de secuencia de las proteínas MgtC caracterizadas en diferentes patógenos y MgtC de *B. pertussis*. La alineación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas se realizó utilizando Clustal Omega [44]. Los aminoácidos conservados están sombreados de azul oscuro (> 80% de identidad) mientras que los aminoácidos semiconservados están sombreados de azul (60%-80% de identidad) o celeste (40%-60% de identidad). *B. pertussis* conserva varios aminoácidos del dominio MgtC N-terminal. Las secuencias de proteínas utilizadas para la alineación son de *Burkholderia cenocepacia* K56-2 (EPZ84702.1), *Bordetella pertussis* Tohama I (CAE44745.1), *Brucella suis* 1330 (KFJ26613.1), *Mycobacterium tuberculosis* Erdman (BAL65794.1), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (NP_253325.1), *Salmonella* Typhimurium 14028s (AAD16960.1) y *Salmonella* Typhi STH2370 (ETZ13253.1).

6.2.2. Estudio de la expresión de MgtC en *B. pertussis*

En el estudio del proteoma presentado en el **Capítulo 3** se detectó en *B. pertussis* intracelular la presencia de un péptido derivado de MgtC en bacterias recuperadas a las 48 horas post infección. Debido a que la expresión de esta proteína no había sido reportada anteriormente y a su potencial relevancia en la sobrevivencia intracelular, se decidió confirmar su expresión mediante un método de monitorización de reacción seleccionada (SRM) aplicado a un péptido prototípico de dicha proteína. En la secuencia proteica de MgtC de *B. pertussis* sólo existe un péptido con las condiciones necesarias para ser

analizado por esta técnica. Esto se debe a que la mayoría de los péptidos que derivan de una digestión *in silico* con tripsina de MgtC tienen una longitud inadecuada para ser analizados por SRM (>1500 Da), están sesgados por sitios solapados de corte por la enzima o tienen en su secuencia metionina y cisteína, aminoácidos propensos a modificaciones químicas que pueden afectar la cuantificación final. Por este motivo, de los 8 péptidos producidos por el corte *in silico* con tripsina, sólo un péptido correspondiente a los residuos 104 a 111 de MgtC, cuya secuencia es LGNEGEIR, tiene las propiedades teóricas adecuadas para ser analizado por esta técnica [45]. Este péptido se encuentra presente únicamente en MgtC y no se repite en ninguna otra proteína codificada por el genoma de *B. pertussis*. Asimismo, dado que las muestras de bacterias aisladas de localización intracelular pueden contener proteínas derivadas de las células THP-1, se confirmó que este péptido no se encontrara codificado en ninguna de las proteínas del genoma humano. Los resultados de SRM confirmaron que MgtC en realidad se expresa tanto en bacterias extracelulares como en bacterias intracelulares, tanto a las 3 como a las 48 horas post infección (**Figura 6.4**). Además, según estos resultados, el nivel de abundancia de MgtC en bacterias intracelulares tiende a aumentar con el tiempo, aunque de manera no significativa. Estos resultados demuestran por primera vez que *B. pertussis* expresa MgtC y que su expresión se mantiene en las bacterias intracelulares.

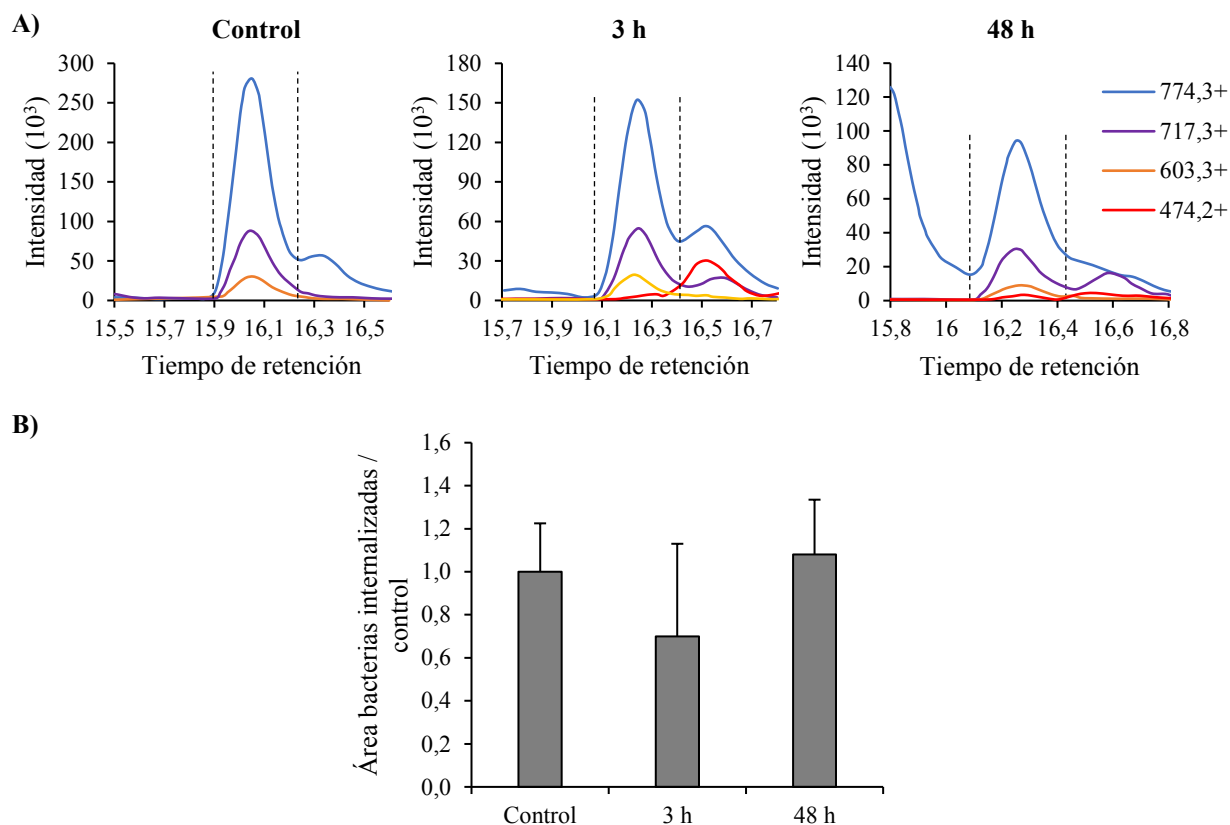


Figura 6.4: *B. pertussis* expresa MgtC. A) *B. pertussis* aislada de macrófagos THP-1 a las 3 h y 48 h post infección o bacterias incubadas en medio de cultivo RPMI-BSA durante 3 h (Control) fueron procesadas para analizar su expresión proteica por espectroscopia de masas. El péptido LGNEGEIR, correspondiente a los residuos 104 a 111 de la proteína MgtC, fue cuantificado mediante SRM. Se muestran cromatogramas representativos de las transiciones para el péptido LGNEGEIR. Las líneas coloreadas indican los cromatogramas resultantes para los distintos iones producidos a partir de dicho péptido. B) Cuantificación del nivel de expresión de MgtC mediante SRM. Los valores de expresión fueron normalizados a las bacterias extracelulares (Control).

6.2.3. Obtención de una cepa mutante en la expresión de MgtC

Con el fin de estudiar si MgtC tiene algún rol en la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis*, se construyó un mutante defectivo en la expresión de este gen. Para ello, se realizó una estrategia equivalente a la empleada en los **Capítulos 4 y 5**, construyendo el plásmido pSS4245 Δ mgtC que contiene un alelo truncado de *mgtC* junto a regiones adyacentes homólogas. En la **Figura 6.5** se muestra el análisis por PCR con cebadores que amplifican la región genómica que contiene a *mgtC* de un clon de *B. pertussis* mutante obtenido después de dos recombinaciones homólogas con el vector pSS4245 Δ mgtC. El peso molecular del producto de PCR observado en la cepa Δ mgtC resulta compatible con el esperado para una cepa mutante por eliminación en este gen.

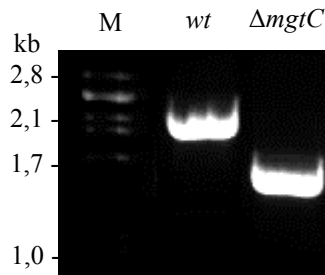


Figura 6.5: Obtención de un mutante por eliminación de MgtC. Electroforesis en gel de agarosa de amplificaciones por PCR utilizando los cebadores *mgtC*-5F y *mgtC*-3R que amplifican la región genómica que contiene a *mgtC* de un clon mutante en este gen obtenido después de dos recombinaciones homólogas con el vector pSS4245 Δ *mgtC*. La cepa salvaje presenta la amplificación esperada para una región genómica salvaje (*wt*; aprox. 2kb) y la cepa mutante presenta la amplificación esperada para una región genómica mutante por eliminación en *mgtC* (Δ *mgtC*; aprox. 1,5kb). M: marcador de peso molecular.

6.2.4. Obtención de una cepa complementada en la expresión de MgtC

Como estrategia de complementación se construyó un plásmido duplicativo en *B. pertussis*, pBBR1MCS-*mgtC*, que contiene el gen que codifica para MgtC junto con sus respectivas secuencias promotoras y terminadoras de la transcripción. En la **Figura 6.6** se muestra un análisis por PCR con cebadores que amplifican *mgtC* de un clon obtenido luego de conjugar este plásmido a la cepa mutante para obtener una cepa complementada en la expresión de este gen, denominada pBBR1MCS-*mgtC*. La cepa *B. pertussis* Δ *mgtC* también se transformó con el vector pBBR1MCS como control (**Figura 6.6**).

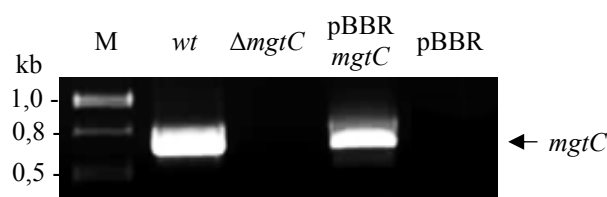


Figura 6.6: Obtención de una cepa complementada en la expresión de MgtC. Electroforesis en gel de agarosa de amplificaciones por PCR con los cebadores *mgtC*-CF y *mgtC*-CR que amplifican el gen *mgtC*. Como molde se utilizó ADN de la cepa salvaje (*wt*), mutante en *mgtC* (Δ *mgtC*), mutante en *mgtC* complementada con el plásmido pBBR1MCS-*mgtC* (pBBR-*mgtC*) y cepa mutante en *mgtC* conteniendo el plásmido de complementación vacío (pBBR). Se obtuvo la amplificación esperada para *mgtC* en la cepa salvaje y complementada (aprox. 0,7kb) mientras que no se obtuvo amplificación en la cepa mutante Δ *mgtC* y cepa mutante con el plásmido de complementación vacío. M: marcador de peso molecular.

6.2.5. Caracterización del rol de MgtC en la sobrevivida intracelular de *B. pertussis* en macrófagos humanos

Para analizar el rol de MgtC en la sobrevivida intracelular de *B. pertussis* se realizó una infección de células THP-1 diferenciadas a macrófagos utilizando la cepa salvaje parental (*wt*), la cepa mutante (Δ *mgtC*), la cepa complementada (pBBR-*mgtC*) o la cepa mutante Δ *mgtC* conteniendo el plásmido de complementación vacío (pBBR). Mediante microscopía de fluorescencia se comprobó que el nivel de adhesión y de fagocitosis a los macrófagos THP-1 no difirió significativamente entre las cepas, indicando que MgtC no está involucrado en este proceso inicial de la infección (**Figura 6.8**).

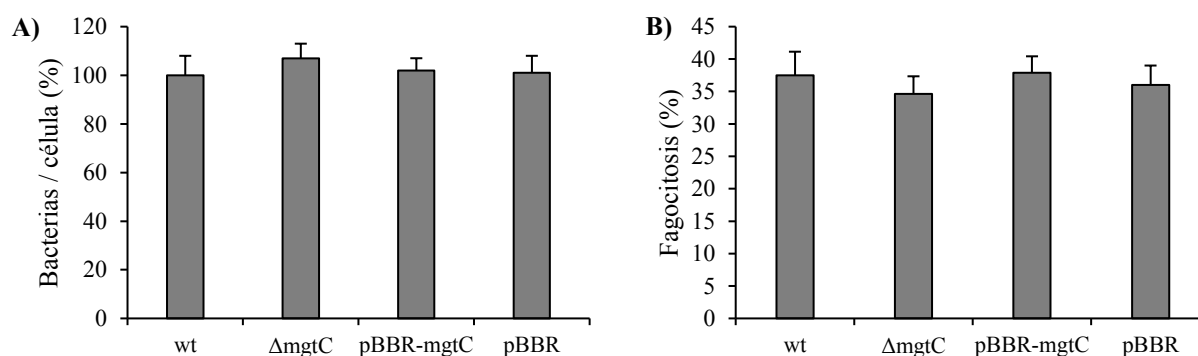


Figura 6.8: MgtC no está involucrado en la adhesión ni en la fagocitosis de *B. pertussis* en macrófagos THP-1. Células THP-1 fueron diferenciadas con PMA durante 24 h y posteriormente incubadas con *B. pertussis* (R_i /b/c 100) cepa salvaje (*wt*), mutante en *mgtC* (Δ *mgtC*), cepa mutante complementada con el plásmido pBBR1MCS-*mgtC* (pBBR-*mgtC*) o cepa mutante conteniendo el plásmido de complementación vacío (pBBR) durante 2 h. Luego las células fueron lavadas y fijadas. El número de bacterias extracelulares (rojas y verdes) e intracelulares (verdes) fue discriminado con doble marcación fluorescente y cuantificado mediante microscopía de fluorescencia. **A)** Bacterias totales (rojas y verdes) adheridas por célula. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de bacterias/célula respecto a la cepa salvaje (*wt*). Se muestran la media \pm DE de tres experimentos independientes. **B)** Porcentaje de fagocitosis (bacterias verdes \times 100 / bacterias totales) por célula. Se muestra la media \pm DE de tres experimentos independientes.

En ensayos de protección a polimixina B se estudió la persistencia intracelular de estas cepas en macrófagos THP-1. En la **Figura 6.9** se puede observar que las cepas ensayadas no presentaron diferencias estadísticamente significativas a las 3 horas post infección en macrófagos THP-1. Sin embargo, la sobrevivida intracelular de la cepa deficiente en *mgtC* fue significativamente menor a las 24 y a las 48 horas post infección comparada con la cepa salvaje, indicando que este factor contribuye a la sobrevivida de *B. pertussis* en macrófagos THP-1 a tiempos tardíos de infección. Dado que la sobrevivida

intracelular de la cepa complementada en *mgtC* fue similar a la de la cepa salvaje en todos los tiempos analizados, se puede afirmar que la disminución en la sobrevida del mutante $\Delta mgtC$ es debido a la falta de expresión de este gen y no a un efecto polar causado por la mutación (**Figura 6.9**). Asimismo, como la persistencia intracelular de la cepa $\Delta mgtC$ pBBR no fue significativamente diferente de la cepa $\Delta mgtC$ (**Figura 6.9**), se puede afirmar que la presencia del plásmido de complementación no afecta la sobrevida intracelular de *B. pertussis*, al menos en las condiciones experimentales utilizadas.

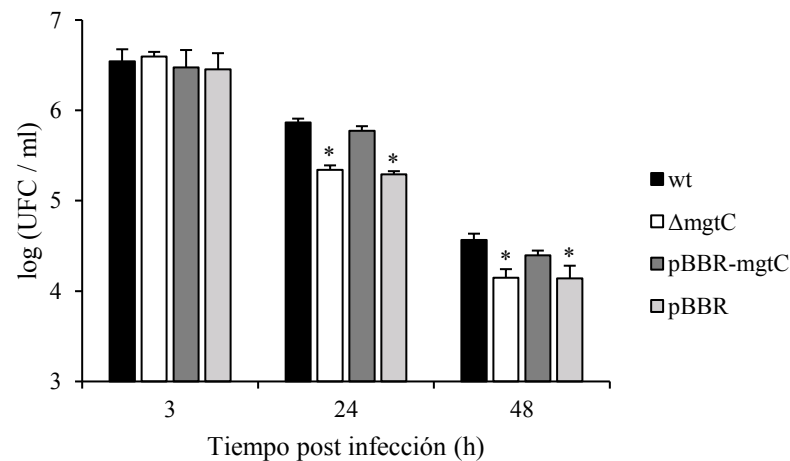


Figura 6.9: MgtC está involucrado en la sobrevida intracelular de *B. pertussis* en macrófagos THP-1. Células THP-1 fueron diferenciadas con PMA durante 24 h y posteriormente incubadas con *B. pertussis* (R_ib/c 100) cepa salvaje (*wt*), mutante en *mgtC* ($\Delta mgtC$), cepa mutante complementada con el plásmido pBBR1MCS-*mgtC* (pBBR-*mgtC*) o cepa mutante conteniendo el plásmido de complementación vacío (pBBR) durante 2 h. Después de tres lavados, las células fueron incubadas durante 1 h con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares y el número de UFC de *B. pertussis* por ml fue determinado a los distintos tiempos post infección. La polimixina B se mantuvo durante todo el tiempo de infección. Los datos representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. El número de UFC por ml de las cepas $\Delta mgtC$ y pBBR fue significativamente diferente del número de UFC por ml de las cepas *wt* y pBBR-*mgtC* a las 24 h y 48 h post infección (* $p < 0,05$; Test de ANOVA).

Estudios previos indican que un porcentaje elevado de bacterias fagocitadas por los macrófagos es dirigido a compartimentos lisosomales donde las bacterias son inactivadas [40]. Sin embargo, aproximadamente un cuarto de las bacterias internalizadas evade el tráfico a lisosomas y permanece viable en compartimentos con características de endosomas tempranos [40], los cuales se caracterizan por presentar un pH moderadamente ácido. Asimismo, en este trabajo de Tesis se describe que las bacterias intracelulares que no colocan con lisosomas se encuentran metabólicamente activas (**Capítulo 3**). Debido a la importancia del tráfico no bactericida en la persistencia

intracelular de *B. pertussis*, se decidió analizar si existen diferencias en el tráfico de la cepa salvaje y la cepa $\Delta mgtC$. Para ello, se realizó una infección de macrófagos THP-1 y se evaluó la colocalización de bacterias con el marcador de lisosomas LysoTracker utilizando microscopía confocal. En la **Figura 6.10** se observa que la falta de expresión de MgtC conduce a un mayor porcentaje de bacterias en compartimentos ácidos a las 24 y a las 48 horas post infección. Estos resultados sugieren que MgtC está involucrado en promover la persistencia de *B. pertussis* en macrófagos humanos, dado que su ausencia disminuye la supervivencia intracelular de este patógeno con el consecuente incremento en las bacterias en compartimentos lisosomales.

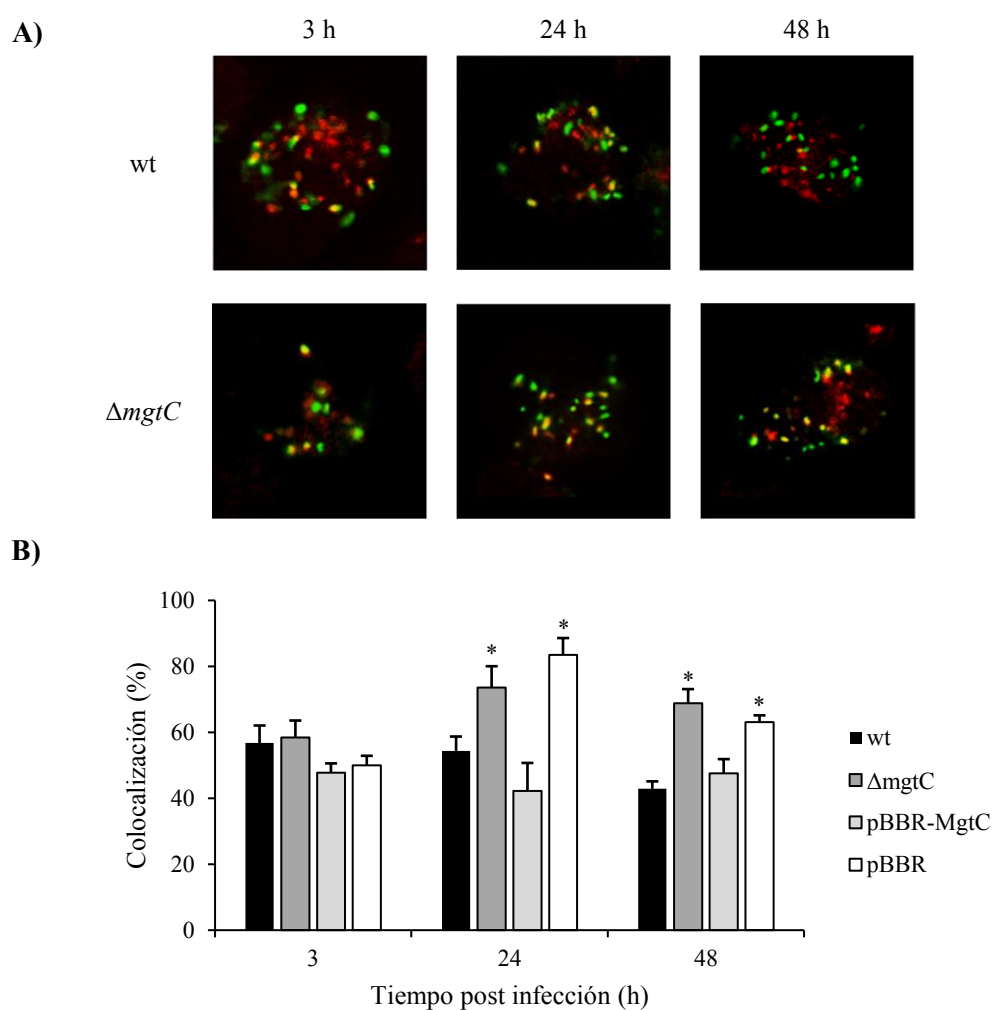


Figura 6.10: La falta de expresión de MgtC aumenta el tráfico de *B. pertussis* a lisosomas. Células THP-1 fueron diferenciadas con PMA durante 24 h y posteriormente incubadas con *B. pertussis* (R_ib/c 100) cepa salvaje (*wt*), mutante en *mgtC* ($\Delta mgtC$), cepa mutante complementada con el plásmido pBBR1MCS-*mgtC* (pBBR-*mgtC*) o cepa mutante conteniendo el plásmido de complementación vacío (pBBR) durante 2 h. Después de tres lavados, las células fueron incubadas durante 1 h con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares. A distintos tiempos post infección los macrófagos fueron

incubados con LysoTracker por 20 minutos para teñir los lisosomas de rojo. Las muestras fueron luego fijadas, permeabilizadas y procesadas para su visualización en microscopio confocal. *B. pertussis* fue detectada por incubación con anticuerpos policlonales de conejo anti-*B. pertussis* seguido por fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con FITC (verde). **A)** Imágenes representativas de dos experimentos independientes **B)** El grado de colocalización con LysoTracker fue verificado mediante la realización de escaneos de intensidades de fluorescencia roja y verde a lo largo del eje z en los sitios en donde se encuentra una determinada bacteria. El porcentaje de bacterias de las cepas $\Delta mgtC$ y pBBR que colocalizan con LysoTracker es significativamente diferente de las cepas salvaje y pBBR-*mgtC* a las 24 y 48 horas post infección (*p<0,05; Test de ANOVA)

6.2.6. Estudio de la contribución de MgtC en el crecimiento de *B. pertussis* en medios moderadamente ácidos

Diversos estudios indican que MgtC tiene un rol relevante en la adaptación de patógenos bacterianos a ambientes ácidos [29], que podría estar relacionado con el rol que cumple este factor en promover la persistencia bacteriana en el ambiente intracelular. Para analizar la contribución de MgtC al crecimiento de *B. pertussis* en medios ácidos, primero se evaluó la capacidad de crecimiento de la cepa salvaje en medio de cultivo ajustado a diferentes valores de pH. Para ello, *B. pertussis* fue cultivada en un medio de cultivo SS modificado (SS-MES), en donde el *buffer* Tris fue reemplazado por MES dado que éste tiene capacidad *buffer* adecuada para trabajar a pH ligeramente ácido, y el crecimiento bacteriano se determinó mediante medidas de densidad óptica. Los resultados indicaron que *B. pertussis* fue capaz de crecer en medio de cultivo con pH 6,0 aunque la densidad óptica alcanzada fue significativamente menor que en los cultivos con pH 7,6 (**Figura 6.11**). Asimismo, cuando el pH del medio fue ajustado a 5,0 no se detectó crecimiento bacteriano (**Figura 6.11**). Estos resultados sugieren que el pH ligeramente ácido es perjudicial para el crecimiento de esta bacteria. Por estos motivos, se eligió el medio con pH 6,0 para analizar la contribución de MgtC al crecimiento de *B. pertussis* en medios ligeramente ácidos, ya que permite el crecimiento de la cepa salvaje y además es un valor de pH equivalente al encontrado en los endosomas tempranos que habita este patógeno en su estadio intracelular [40].

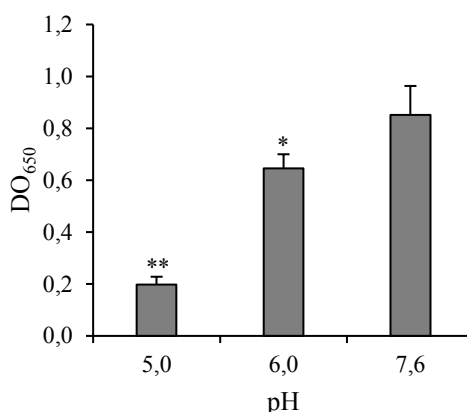


Figura 6.11. *B. pertussis* es capaz de crecer en ambientes con pH ligeramente ácido. *B. pertussis* cepa salvaje fue cultivada en medio SS-MES ajustado a diferentes valores de pH y el crecimiento bacteriano fue cuantificado a las 48 h de incubación mediante medidas de densidad óptica con un espectrofotómetro ajustado a 650nm (DO₆₅₀). Se muestran valores de media \pm DE de valores máximos de DO₆₅₀ alcanzados en uno de dos experimentos independientes realizados por triplicado. La DO₆₅₀ alcanzada en pH 6,0 difiere estadísticamente de la alcanzada en pH 7,6 y en pH 5,0 (* $p < 0,05$; Test de ANOVA). La DO₆₅₀ alcanzada en pH 5,0 difiere estadísticamente de la alcanzada en pH 7,6 y en pH 6,0 (** $p < 0,05$; Test de ANOVA).

Con el fin de analizar si MgtC está involucrado en el crecimiento de *B. pertussis* en ambientes levemente ácidos, se analizó la curva de crecimiento de la cepa salvaje y la cepa mutante $\Delta mgtC$ en medios de cultivo neutros (pH 7,6) o ligeramente ácidos (pH 6,0). Como control se incluyeron las cepas $\Delta mgtC$ complementada (pBBR-*mgtC*) y la cepa $\Delta mgtC$ con el plásmido de complementación vacío (pBBR). No se encontraron diferencias en el crecimiento entre las cepas cuando fueron cultivadas en medios con pH 7,6 (**Figura 16.2**). Sin embargo, se observó un defecto en el crecimiento de la cepa mutante $\Delta mgtC$ en medios de cultivo ajustados a pH 6,0 en comparación a la cepa salvaje (**Figura 6.12**), indicando que MgtC está involucrada en la adaptación al estrés ácido. Asimismo, la curva de crecimiento de la cepa complementada fue equivalente a la de la cepa salvaje, mientras que la curva de crecimiento de la cepa $\Delta mgtC$ pBBR fue similar a la de la cepa $\Delta mgtC$, sugiriendo que los efectos observados se deben a la falta de *mgtC* y no a un efecto polar causado por la mutación o por la presencia del plásmido de complementación (**Figura 6.12**).

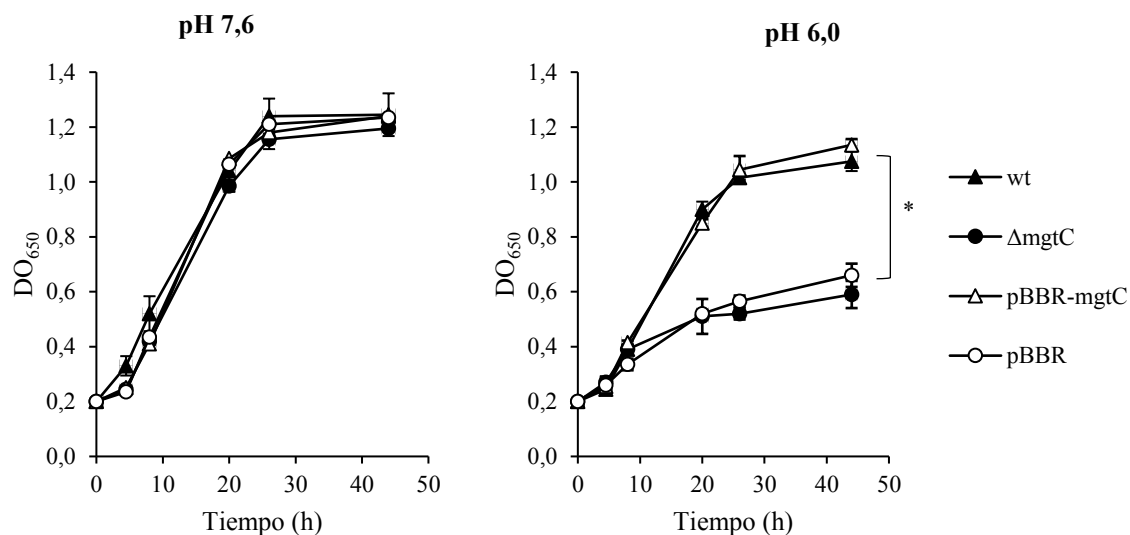


Figura 6.12: MgtC está involucrado en el crecimiento de *B. pertussis* en entornos moderadamente ácidos. *B. pertussis* cepa salvaje (*wt*), mutante en *mgtC* (Δ *mgtC*), mutante complementada con el plásmido pBBR1MCS-*mgtC* (pBBR-*mgtC*) o cepa mutante conteniendo el plásmido de complementación vacío (pBBR) fueron cultivadas en medio SS-MES ajustado a pH 7,6 ó 6,0. El crecimiento bacteriano fue evaluado mediante medidas de densidad óptica utilizando un espectrofotómetro ajustado a 650nm (DO₆₅₀). Se verificó que el pH de los cultivos no variara con el crecimiento bacteriano. Se muestran valores de media \pm DE de duplicados de un experimento representativo de dos realizados. La DO₆₅₀ máxima de las cepas *wt* y pBBR-*mgtC* cultivadas a pH 6,0 fue significativamente diferente de la DO₆₅₀ máxima de las cepas Δ *mgtC* y pBBR (* $p < 0,05$; Test de ANOVA).

Asimismo, mediante RT-qPCR se observó un aumento en el transcripto de *mgtC* cuando *B. pertussis* fue cultivada a pH 6,0 en comparación con pH 7,6 (Figura 6.13), sugiriendo que existe una regulación transcripcional de *mgtC* por acidez y que el crecimiento en entornos ligeramente ácidos induce su expresión. Se encontró un nivel similar de inducción de la expresión de *mgtC* en la cepa complementada, que es esperable dado que posee dicho gen bajo el control de su promotor nativo (Figura 6.13). Por último, no se detectó la expresión de *mgtC* en la cepa mutante Δ *mgtC* ni en la cepa mutante que posee el plásmido de complementación vacío (pBBR), confirmando los resultados obtenidos con la cepa salvaje y la complementada (Figura 6.13).

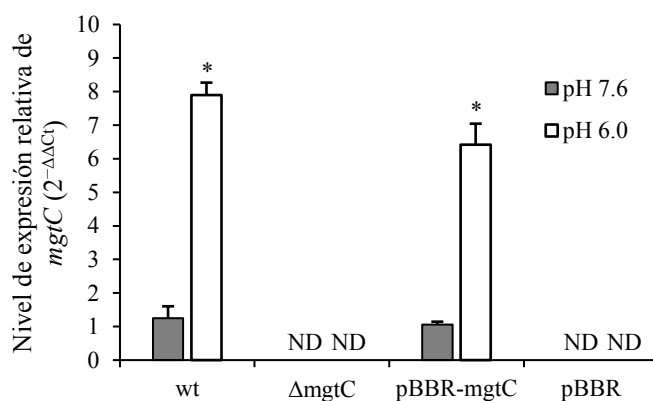


Figura 6.13. El pH ligeramente ácido induce la expresión de *mgtC*. *B. pertussis* cepa salvaje (*wt*), mutante en *mgtC* ($\Delta mgtC$), mutante complementada con el plásmido pBBR1MCS-*mgtC* (pBBR-*mgtC*) o cepa mutante conteniendo el plásmido de complementación vacío (pBBR) fueron cultivadas en medio SS-MES ajustado a pH 7,6 ó pH 6,0. El nivel de expresión de *mgtC* fue cuantificado mediante RT-qPCR en muestras de bacterias en fase exponencial. El gen *recA* fue utilizado como control de estandarización y la condición SS pH 7,6 de cada cepa se utilizó como condición control. El nivel de expresión fue calculado utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [46]. Se muestran valores de media \pm DE de un experimento realizado en duplicado representativo de dos realizados. El nivel de expresión de *mgtC* a pH 6,0 difiere significativamente de su nivel de expresión a pH 7,6 tanto en la cepa salvaje como en la cepa complementada en *mgtC* (* $p < 0,05$; Test de Student). ND: no detectado.

6.2.7. Análisis del rol que cumple MgtC en el crecimiento de *B. pertussis* en condiciones de baja disponibilidad de magnesio

Varios estudios indican que MgtC promueve el crecimiento de bacterias en condiciones de limitación de magnesio [35]. Para analizar la contribución de MgtC a la adaptación a ambientes limitados en magnesio en *B. pertussis* se determinó en primer lugar la concentración de $MgCl_2$ a partir de la cual este nutriente se vuelve limitante para el crecimiento bacteriano. Para ello, se realizaron cultivos de *B. pertussis* cepa salvaje en medio SS con distintas concentraciones de $MgCl_2$ (**Figura 6.14**). Se determinó que concentraciones de $MgCl_2$ de 10 μM o menores limitan el crecimiento de *B. pertussis*. Por este motivo, se seleccionó el cultivo en medio SS con $MgCl_2$ 10 μM para evaluar el crecimiento en limitación de Mg^{2+} . Asimismo, esta concentración de Mg^{2+} coincide con la utilizada para evaluar la contribución de MgtC al crecimiento en limitación de magnesio en diversos patógenos bacterianos [25, 27, 28, 30]. La condición de exceso de Mg^{2+} se realizó con $MgCl_2$ 500 μM , que es la concentración en el medio SS [47].

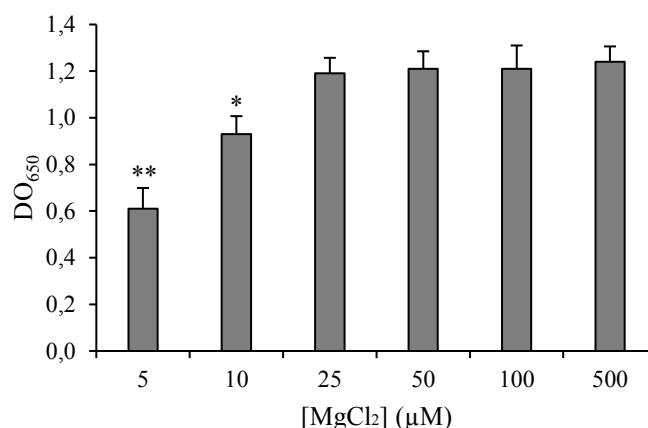


Figura 6.14: Crecimiento de *B. pertussis* en medios limitados en MgCl₂. *B. pertussis* cepa salvaje fue cultivada en medio SS modificado con distintas concentraciones de MgCl₂ y el crecimiento bacteriano fue cuantificado a las 48 h de incubación mediante medidas de densidad óptica con un espectrofotómetro ajustado a 650nm (DO₆₅₀). Se muestran valores de media ± DE de un experimento realizado en triplicado representativo de dos realizados. El crecimiento de *B. pertussis* en SS con MgCl₂ 10 µM difiere significativamente del resto de las condiciones (*p<0,05, ANOVA). El crecimiento de *B. pertussis* en SS con MgCl₂ 5 µM difiere significativamente del resto de las condiciones (**p<0,05; ANOVA).

Con el fin de evaluar si MgtC está involucrado en el crecimiento de *B. pertussis* en condiciones de baja disponibilidad de Mg²⁺, se comparó la capacidad de crecimiento en medios limitados en este nutriente entre la cepa salvaje y la cepa mutante Δ *mgtC*. Si bien no se detectaron diferencias en la curva de crecimiento de ambas cepas en condiciones de exceso de magnesio, se observó que la cepa mutante Δ *mgtC* tuvo un crecimiento significativamente menor que la cepa salvaje en condiciones de limitación de este nutriente (**Figura 6.15**). Además, este defecto fue revertido por la presencia del plásmido pBBR-*mgtC* en la cepa complementada (**Figura 6.15**). Este resultado sugiere que MgtC está involucrado en el crecimiento de *B. pertussis* en condiciones de baja disponibilidad de magnesio.

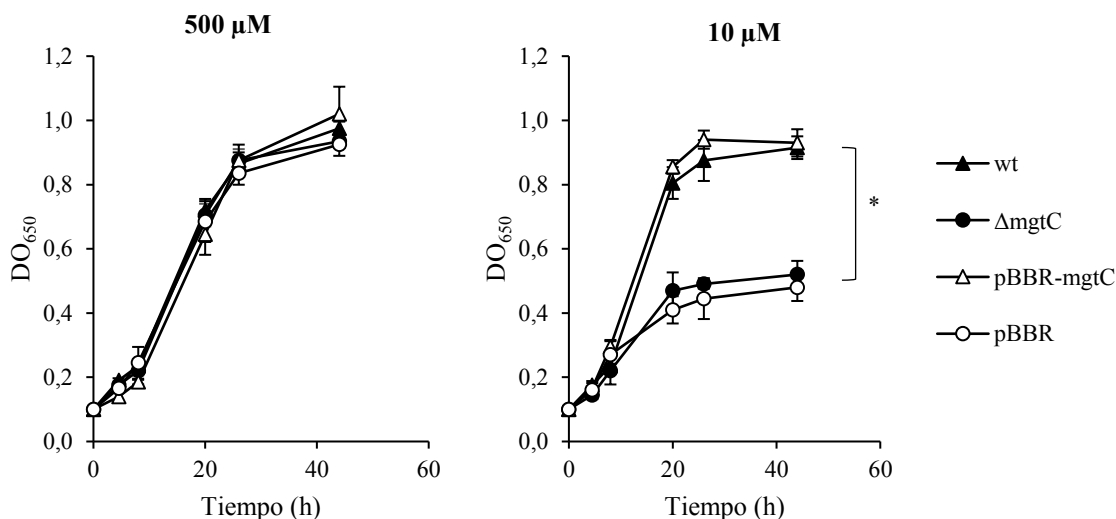


Figura 6.15. MgtC está involucrado en el crecimiento de *B. pertussis* en limitación de magnesio. *B. pertussis* cepa salvaje (*wt*), mutante en *mgtC* (Δ *mgtC*), mutante complementada con el plásmido pBBR1MCS-*mgtC* (pBBR-*mgtC*) o cepa mutante conteniendo el plásmido de complementación vacío (pBBR) fueron cultivadas en medio SS en condiciones de exceso (MgCl_2 500 μM) o limitación (MgCl_2 10 μM) de magnesio. El crecimiento bacteriano fue evaluado mediante medidas de densidad óptica utilizando un espectrofotómetro ajustado a 650nm (DO_{650}). Se muestran valores de media \pm DE de duplicados de un experimento representativo de dos realizados. La DO_{650} máxima de las cepas *wt* y pBBR-*mgtC* cultivadas en limitación de magnesio fue significativamente diferente de la DO_{650} máxima de las cepas Δ *mgtC* y pBBR en la misma condición (* $p < 0,05$; Test de ANOVA).

Posteriormente se analizó el nivel de expresión de *mgtC* por RT-qPCR en condiciones de crecimiento con exceso o limitación de magnesio. La **Figura 6.16** muestra que el transcripto de *mgtC* se encuentra inducido en limitación de magnesio, lo que sugiere una regulación específica de este factor por la disponibilidad de este ion. Estos resultados indican que la expresión de *mgtC* en *B. pertussis* se encuentra regulada de manera similar a la observada en otros patógenos [35].

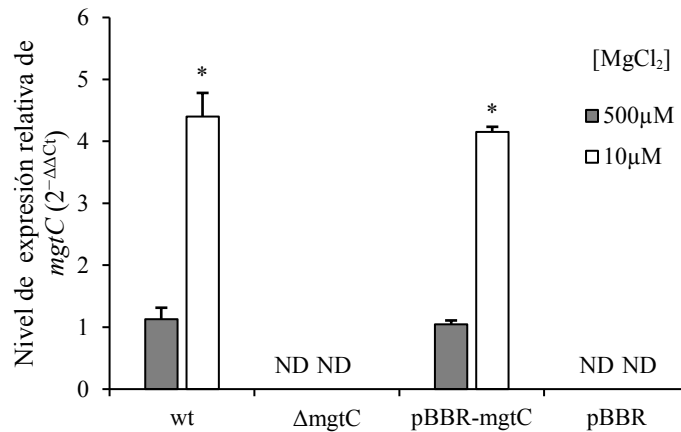


Figura 6.16: La expresión de *mgtC* es inducida en limitación de magnesio. *B. pertussis* cepa salvaje (*wt*), mutante en *mgtC* ($\Delta mgtC$), mutante complementada con el plásmido pBBR1MCS-*mgtC* (pBBR-*mgtC*) o cepa mutante conteniendo el plásmido de complementación vacío (pBBR) fueron cultivadas en medio SS en condiciones de exceso ($MgCl_2$ 500 μM) o limitación ($MgCl_2$ 10 μM) de magnesio. El nivel de expresión de *mgtC* fue cuantificado mediante RT-qPCR en muestras de bacterias en fase exponencial. El gen *recA* fue utilizado como control de estandarización y la condición $MgCl_2$ 500 μM de cada cepa se utilizó como condición control. El nivel de expresión fue calculado utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [46]. Se muestran valores de media \pm DE de un experimento realizado en duplicado representativo de dos realizados. El nivel de expresión de *mgtC* en medio de cultivo con $MgCl_2$ 500 μM difiere significativamente de su nivel de expresión en medio de cultivo con $MgCl_2$ 10 μM tanto en la cepa salvaje como en la cepa complementada en *mgtC* (* $p < 0,05$; Test de Student). ND: no detectado.

Para evaluar mejor la adaptación de *B. pertussis* a condiciones de limitación de magnesio se realizó una búsqueda de genes presentes en esta bacteria que tuvieran homología con importadores de magnesio. Se encontró que el genoma de *B. pertussis* codifica para una proteína (BP2806) con homología al canal de Mg^{2+} MgtE. Se determinó mediante RT-qPCR el nivel de expresión de *mgtE* y se encontró que su expresión se induce bajo limitación de magnesio (**Figura 6.17**). Este resultado indica que *B. pertussis* es capaz de modificar la expresión de al menos dos genes, *mgtC* y *mgtE*, para adaptarse a condiciones de baja disponibilidad de magnesio.

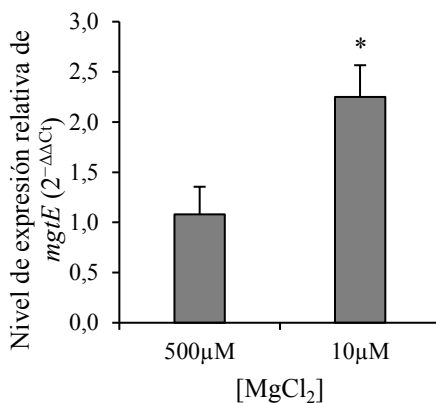


Figura 6.17: La limitación de magnesio induce la expresión de *mgtE*. *B. pertussis* cepa salvaje fue cultivada en medio SS en condiciones de exceso (MgCl₂ 500 μM) o limitación de magnesio (MgCl₂ 10 μM). El nivel de expresión de *mgtE* fue cuantificado mediante RT-qPCR en muestras de bacterias en fase exponencial. El gen *recA* fue utilizado como control de estandarización y la condición MgCl₂ 500 μM se utilizó como condición control. El nivel de expresión fue calculado utilizando el método 2^{-ΔΔCt} [46]. Se muestran valores de media ± DE de un experimento realizado en duplicado representativo de dos realizados. El nivel de expresión de *mgtE* en medio de cultivo con MgCl₂ 500 μM difiere significativamente de su nivel de expresión en medio de cultivo con MgCl₂ 10 μM (*p<0,05; Test de Student).

6.2.8. Estudio del rol de MgtC en la adaptación de *B. pertussis* al pH moderadamente ácido del fagosoma

Como se mencionó anteriormente, *B. pertussis* sobrevive dentro de la célula inmune en compartimientos levemente ácidos LysoTracker negativos con características de endosomas tempranos [40]. La concentración de Mg²⁺ en compartimientos fagosomales es controversial, existiendo estudios que indican que en los mismos hay una limitación de magnesio [42, 48], mientras que otros sugieren que este ion se encontraría en exceso [49, 50]. Por otro lado, los estudios presentados en este capítulo indican que MgtC de *B. pertussis* podría estar implicado tanto en la resistencia a estrés ácido como en la adaptación a baja disponibilidad de Mg²⁺. Para evaluar la contribución de MgtC en la adaptación al bajo pH encontrado en los fagosomas se evaluó la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* cepa salvaje y mutante Δ*mgtC* en macrófagos tratados con bafilomicina A1. Este fármaco es un inhibidor de las ATPasas vacuolares del huésped que bloquea la acidificación de los compartimientos lisosomales y endosomales [51]. El tratamiento de los macrófagos THP-1 con bafilomicina A1 aumentó la viabilidad intracelular de la cepa mutante Δ*mgtC* a niveles equivalentes a los de la cepa salvaje (**Figura 6.18**). Este resultado sugiere que MgtC tiene un rol relevante en la adaptación de *B. pertussis* al

microambiente ácido hallado en el interior del fagosoma. Asimismo, teniendo en cuenta que MgtC es requerido para el crecimiento en limitación de magnesio incluso en medio de cultivo con pH neutro (**Figura 6.15**), este resultado sugiere que la disponibilidad de magnesio no es un factor limitante para la persistencia intracelular de *B. pertussis*. Por último, es interesante destacar que el tratamiento con bafilomicina A1 aumentó significativamente la supervivencia de las cepas utilizadas en comparación con su respectivo control sin tratar (**Figura 6.18**), confirmando estudios previos que sugieren que la acidificación fagosomal es requerida para que los macrófagos eliminen de forma eficiente a este patógeno [52].

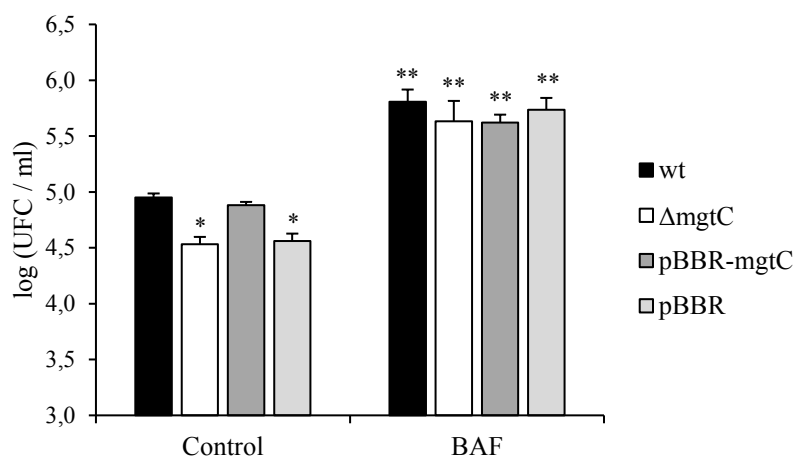


Figura 6.18: El tratamiento con Bafilomicina A1 suprime las diferencias en la sobrevivencia intracelular entre la cepa salvaje y mutante en *mgtC*. Células THP-1 fueron diferenciadas con PMA por 24 h y posteriormente incubadas con bafilomicina A1 50 nM disuelta en DMSO para neutralizar los fagosomas o con DMSO (Control) por 1 h. Posteriormente los macrófagos THP-1 fueron incubadas con *B. pertussis* (R:b/c 100) cepa salvaje (*wt*), mutante en *mgtC* ($\Delta mgtC$), mutante complementada con el plásmido pBBR1MCS-*mgtC* (pBBR-*mgtC*) o cepa mutante conteniendo el plásmido de complementación vacío (pBBR) durante 2 h. Después de tres lavados, las células fueron incubadas durante 1 h con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares y el número de UFC de *B. pertussis* por ml fue determinado a las 48 h post infección. La polimixina B y la bafilomicina A1 se mantuvieron durante todo el tiempo de infección. Los datos representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. El número de UFC por ml de las cepas $\Delta mgtC$ y pBBR fue significativamente diferente del número de UFC por ml de las cepas *wt* y pBBR-*mgtC* en la condición control (* $p < 0,05$; Test de ANOVA). El número de UFC por ml de las cepas en células tratadas con bafilomicina A1 difiere significativamente del número de UFC por ml de la condición control respectiva (** $p < 0,05$; Test de ANOVA).

La inhibición de la acidificación vesicular en los macrófagos THP-1 por tratamiento con bafilomicina A1 se confirmó por incubación con LysoTracker. Este marcador consiste en un fluoróforo conjugado a una base débil que está parcialmente protonada a pH neutro [53]. Esto permite que la sonda difunda libremente a través de las membranas celulares. Sin embargo, en presencia de ambientes ácidos, como los encontrados en los lisosomas, se produce la protonación completa del marcador que adquiere carga positiva y es retenido en estas vesículas, marcándolas así con fluorescencia roja [53]. En la **Figura 6.19** se muestra que los macrófagos THP-1 tratados con bafilomicina A1 no acumularon el marcador LysoTracker en compartimentos intracelulares, confirmando la neutralidad de estos compartimentos debido a la actividad de este inhibidor.

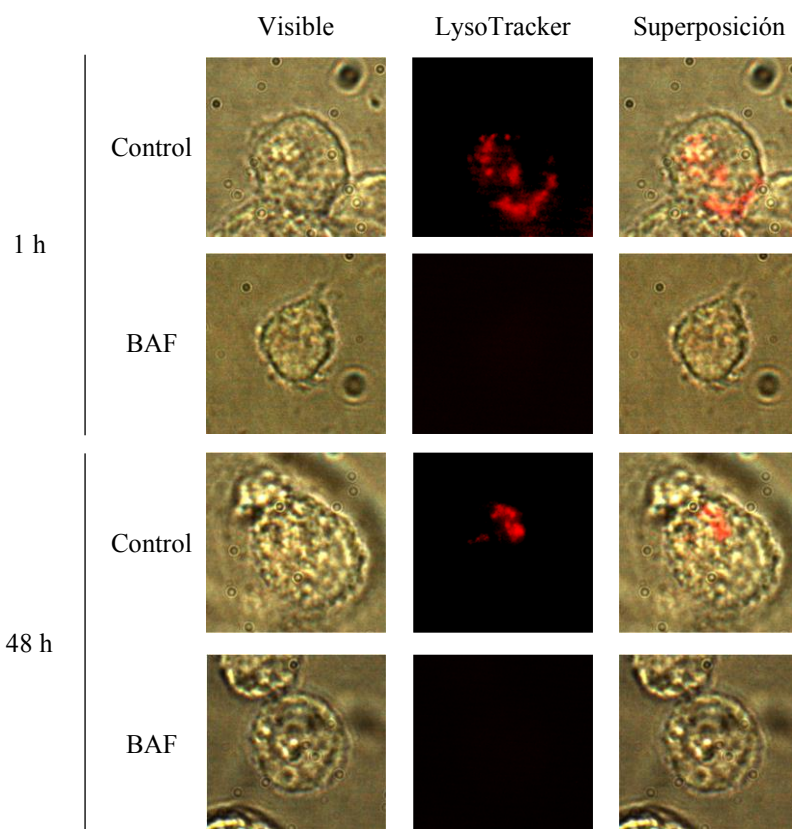


Figura 6.19: La incubación con Bafilomicina A1 neutraliza los compartimentos lisosomales en macrófagos THP-1. Células THP-1 fueron diferenciadas con PMA por 24 h y posteriormente incubadas con bafilomicina A1 50 nM disuelta en DMSO (BAF) o con DMSO (Control) por 1 h o 48 h. Muestras de macrófagos a cada tiempo ensayado fueron incubados con LysoTracker por 20 minutos para visualizar los compartimentos ácidos por su fluorescencia roja. Las células fueron fijadas y posteriormente procesadas para su visualización en microscopio de fluorescencia. Se muestran imágenes representativas de cada condición.

Se ha descrito que la bafilomicina A1 ejerce un efecto moderadamente inhibitorio sobre ciertas ATPasas bacterianas [54]. Por este motivo, se evaluó si la bafilomicina A1 afectaba la viabilidad de *B. pertussis* mediante la incubación de bacterias con este inhibidor, en las concentraciones utilizadas en los ensayos de sobrevivencia. Se observó que la bafilomicina A1 no afecta la viabilidad de las cepas *B. pertussis* empleadas en este estudio (**Figura 6.20**).

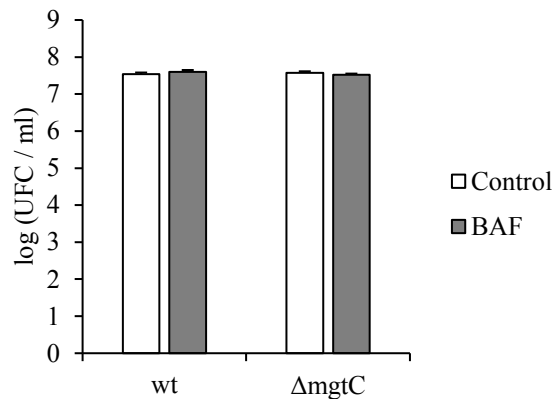


Figura 6.20: La bafilomicina A1 no afecta la viabilidad de *B. pertussis*. *B. pertussis* cepa salvaje (wt) o mutante en *mgtC* ($\Delta mgtC$) fueron incubadas durante 1 h con bafilomicina A1 50 nM disuelta en DMSO (BAF) o con DMSO (Control), y posteriormente cultivadas en ABG para enumerar UFC. Los datos representan la media \pm DE de dos experimentos independientes.

6.2.9. Análisis de la sobrevivencia intracelular de la cepa $\Delta mgtC$ en células del epitelio respiratorio

Tal como fue mencionado previamente, otro de los nichos de posible persistencia intracelular de *B. pertussis* en el hospedador son las células del epitelio respiratorio [55]. Con el fin de analizar si MgtC está involucrado en la persistencia intracelular de *B. pertussis* en este tipo celular, se realizaron infecciones de la línea celular de epitelio respiratorio 16HBE14o- con la cepa salvaje y con la cepa mutante $\Delta mgtC$. Mediante el uso de microscopía de fluorescencia se observó que el nivel de adhesión e internalización a las células epiteliales no difirió significativamente entre las cepas utilizadas, sugiriendo que MgtC no estaría involucrado en este proceso inicial de la infección (**Figura 6.21**).

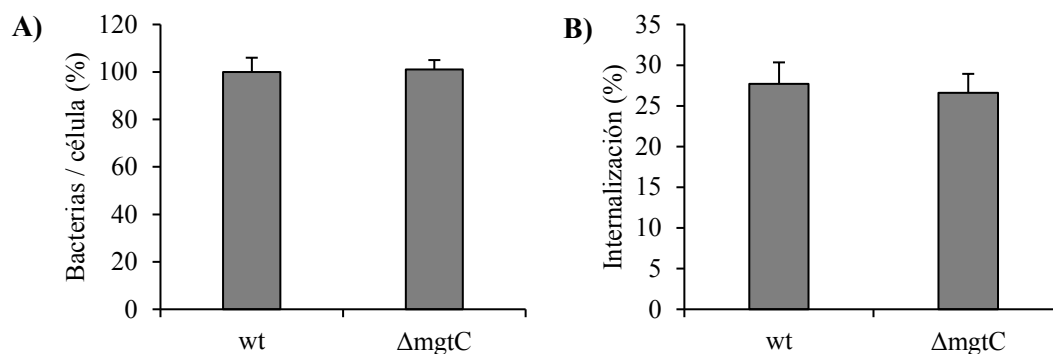


Figura 6.21: La falta de MgtC no afecta la adhesión ni la internalización de *B. pertussis* a células del epitelio respiratorio. Células 16HBE14o- fueron incubadas con *B. pertussis* (R_ib/c 30) cepa salvaje (*wt*) o mutante en *mgtC* ($\Delta mgtC$) durante 3 h. Luego las células fueron lavadas y fijadas con paraformaldehído. El número de bacterias extracelulares e intracelulares fue discriminado con doble marcación inmunofluorescente y cuantificado mediante microscopía de fluorescencia. **A)** Bacterias totales (rojas y verdes) adheridas por célula. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de bacterias/célula respecto a la cepa salvaje (*wt*). Se muestran la media \pm DE de dos experimentos independientes. **B)** Porcentaje de internalización (bacterias verdes \times 100 / bacterias totales) por célula. Se muestra la media \pm DE de dos experimentos independientes

Ensayos de protección al antibiótico polimixina B y recuento de UFC mostraron que la sobrevivencia intracelular de la cepa mutante $\Delta mgtC$ en células epiteliales no fue significativamente diferente de la cepa salvaje en ninguno de los tiempos de infección analizados. Estos resultados indican que MgtC, bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, no está involucrado en adaptación de *B. pertussis* al compartimiento intracelular que habita dentro de las células epiteliales (**Figura 6.22**).

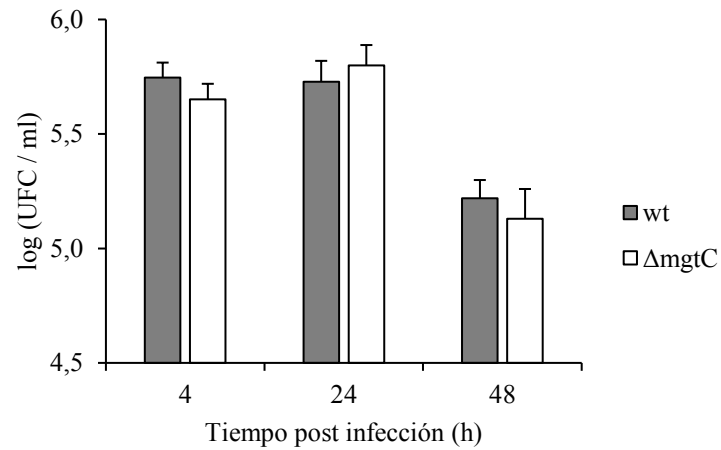


Figura 6.22: MgtC no está involucrado en la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en células del epitelio respiratorio. Células 16HBE14o- fueron incubadas con *B. pertussis* (R;b/c 30) cepa salvaje (*wt*) o mutante en *mgtC* ($\Delta mgtC$) durante 3 h. Después de tres lavados, las células fueron incubadas durante 1 h con polimixina B para inactivar las bacterias extracelulares y el número de UFC de *B. pertussis* por ml fue determinado a los distintos tiempos post infección. La polimixina B se mantuvo durante todo el tiempo de infección. Los datos representan la media \pm DE de dos experimentos independientes.

6.3. Discusión

En el estudio del proteoma de *B. pertussis* presentado en el **Capítulo 3** se encontraron por primera vez indicios de que este patógeno expresa una proteína homóloga al factor de virulencia MgtC en localización intracelular, un factor relevante para la persistencia de varios patógenos en células del hospedador [35]. Para confirmar la expresión de MgtC se utilizó SRM que, como se mencionó anteriormente, es una técnica propuesta como una alternativa al inmunoblot e indicada para la confirmación de expresión proteica en muestras en donde la baja abundancia de las mismas dificulta la detección por otros métodos [56]. Los estudios de SRM confirmaron que *B. pertussis* expresa MgtC tanto extracelularmente como en localización intracelular, y que su expresión aumenta a medida que la infección progresa, aunque de manera estadísticamente no significativa. En *Salmonella Typhimurium* MgtC se encuentra codificado en el operón *mgtCB* junto con el transportador de Mg^{2+} MgtB [57]. Se ha demostrado que MgtC es necesario para la duplicación intracelular de este patógeno en macrófagos [58] y que el transcripto de *mgtCB* se encuentra fuertemente inducido en localización intracelular [48, 59]. El análisis proteómico de *S. Typhimurium* aislada de macrófagos confirmó la inducción intracelular de MgtB, sin embargo la producción de la proteína MgtC no fue detectada [60]. Estos resultados sugieren que los niveles proteicos de MgtC en localización intracelular es baja y/o que la expresión de este factor ocurre en tiempos precisos que no fueron analizados por dicho estudio proteómico [61]. Estudios posteriores describieron que en *S. Typhimurium* los niveles de la proteína MgtC se encuentran regulados por un péptido denominado MgtR, codificado a continuación del gen *mgtB* [61]. El péptido MgtR interacciona directamente con MgtC y promueve su degradación por la proteasa FtsH [61], sugiriendo que los niveles proteicos de MgtC en *S. Typhimurium* son controlado de manera precisa. En este sentido, que *B. pertussis* mantenga la expresión de MgtC en el estadio intracelular indica que podría ser relevante para su viabilidad en este estadio.

Diversos estudios indican que MgtC promueve la sobrevivencia intracelular de varias bacterias patogénicas al favorecer su adaptación al ambiente encontrado dentro de células del hospedador [35]. En los estudios presentados en este capítulo se observa que MgtC cumple un rol similar en *B. pertussis*. Los estudios de tráfico intracelular realizados previamente demostraron que, una vez que *B. pertussis* es fagocitada por macrófagos, un

número significativo de bacterias es capaz de evadir la fusión fagolisosomal y de permanecer viable en compartimentos con características de endosomas tempranos [40]. En este capítulo se demostró que la falta de MgtC disminuye la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* y, consecuentemente, aumenta el tráfico bacteriano a lisosomas, sugiriendo que MgtC promueve la viabilidad bacteriana dentro de macrófagos.

Estudios previos en otros patógenos sugieren que MgtC tendría un rol en la adaptación de las bacterias a condiciones de estrés intracelular [58]. En particular, se ha descrito que uno de los mecanismos utilizados por las células inmunes para controlar la supervivencia y el crecimiento de patógenos invasores es limitar el acceso de cationes a los compartimentos intracelulares [62]. Los patógenos, a su vez, poseen estrategias para obtener este tipo de nutrientes en la localización intracelular que posibilitan su persistencia [62]. Tal como se menciona en la Introducción de este Capítulo, se ha observado que MgtC participa en la adaptación a condiciones ambientales con escasa disponibilidad de magnesio [58]. Nuestro estudio demostró que MgtC está involucrado en el crecimiento *in vitro* de *B. pertussis* en condiciones de limitación de magnesio. Asimismo, se observó que la transcripción de *mgtC* en *B. pertussis* se induce en estas condiciones ambientales, apoyando la hipótesis de que este factor está involucrado en la adaptación bacteriana a concentraciones bajas de magnesio, tal como ocurre en otros patógenos [58]. Bajo estas condiciones de cultivo se encontró además una regulación positiva de un gen homólogo al canal de magnesio *mgtE*, sugiriendo que ambos genes están involucrados en la adaptación de *B. pertussis* a la baja disponibilidad de magnesio.

La caracterización de MgtC en *Salmonella* Typhimurium como un factor necesario para crecer tanto en bajo magnesio como para duplicar en macrófagos [27], entre otros estudios [18, 63], fue interpretado como un indicio de que los fagosomas son un ambiente limitado en magnesio [64]. De hecho, fue formulada la hipótesis que la reducción de la concentración de magnesio en el fagosoma podría ser mediada por un transportador relacionado con Nramp1 [64]. Nramp1 (Slc11a1) forma parte de los mecanismos empleados por el huésped en la inmunidad nutricional para restringir el acceso de patógenos a micronutrientes requeridos para su multiplicación [65]. Esta proteína se encuentra presente en la membrana fagosomal de macrófagos y neutrófilos, y funciona como una bomba de eflujo de metales divalentes [66] involucrada principalmente en la exclusión de hierro y manganeso hacia fuera de estos compartimentos [65]. Nramp1 es reclutado rápidamente en la membrana de fagosomas

en maduración, con cinética similar a la del reclutamiento de Rab5 [66]. Más información sobre la función de Nramp1 proviene de la caracterización bioquímica de su parólogo DMT1 (también llamado Nramp2) [67]. Aunque se descubrió después de Nramp1, DMT1 se ha caracterizado mucho mejor a nivel molecular [67]. Se ha demostrado que DMT1 transporta una amplia gama de metales divalentes, incluidos Fe^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} , sin embargo, no es capaz de transportar Ca^{2+} ni Mg^{2+} [66]. Este resultado sugiere que no existiría un agotamiento de Mg^{2+} en los fagosomas, al menos no mediado por proteínas de la familia Nramp. De hecho, mediciones directas mostraron que la concentración de Mg^{2+} en los fagosomas es elevada, al menos en la interacción entre *S. Typhimurium* y macrófagos [50]. A su vez, se ha demostrado que la ameba *Dictyostelium discoideum*, un organismo utilizado extensamente como modelo para estudiar los mecanismos de fagocitosis bacteriana [68], utiliza el bombeo activo de Mg^{2+} hacia el fagosoma a través del transportador Kil2 para asegurar la actividad óptima de las proteasas fagolisosomales y así lograr la eliminación eficiente de las bacterias ingeridas [49]. Estos resultados, aunque limitados por el modelo experimental empleado, parecen indicar que no hay baja disponibilidad de Mg^{2+} en los fagosomas. Mas aún, estos resultados sugieren que los patógenos intracelulares podrían tener que adaptarse a entornos con concentraciones elevadas de magnesio. Se ha demostrado que *Bordetella bronchiseptica*, un patógeno estrechamente relacionado con *B. pertussis*, es capaz de evadir la eliminación por la ameba *D. discoideum* y persistir intracelularmente dentro de ésta por periodos extensos de tiempo [69], convirtiendo a este huésped en un posible reservorio ecológico para la expansión y transmisión de este patógeno [70]. *B. bronchiseptica*, al igual que *B. pertussis*, posee los exportadores de Mg^{2+} CorC (BB1354) y CorD (BB4623), que podrían ser relevantes para promover la viabilidad de ambos patógenos en un fagosoma con concentraciones elevadas de Mg^{2+} .

MgtC también está involucrado en la adaptación de bacterias a medios con pH moderadamente bajos [25]. Como se mencionó anteriormente, *B. pertussis* habita compartimentos con características de endosomas tempranos dentro de macrófagos humanos [40]. Este tipo de endosoma es ligeramente ácido, con valores de pH cercanos 6,0 [41]. En este capítulo, mediante ensayos de crecimiento en medio sintético ajustado a diferentes valores de pH, se demostró la participación de MgtC en la promoción del crecimiento de *B. pertussis* en entornos con pH ligeramente ácido. Estos resultados indican que la promoción de la supervivencia dentro de macrófagos por parte de MgtC

podría estar relacionada con la adaptación a entornos ácidos. Para poder estudiar en mayor profundidad este mecanismo, se realizaron infecciones de macrófagos THP-1 previamente tratados con bafilomicina A1, un fármaco inhibidor de la acción de las V-ATPasas del huésped que evita la acidificación de los fagosomas [51]. Estos estudios mostraron que el tratamiento con bafilomicina A1 no sólo aumentó la sobrevivencia intracelular de la cepa salvaje, como fue reportado previamente [52], sino que también eliminó la diferencia en la sobrevivencia intracelular entre esta cepa y la cepa mutante $\Delta mgtC$. Estos resultados sugieren que el principal rol de MgtC en la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* estaría relacionado con la adaptación a las condiciones de acidez encontradas dentro de los fagosomas. Asimismo, teniendo en cuenta que MgtC es necesario para el crecimiento en limitación de magnesio incluso en medio de cultivo con pH neutro, estos resultados parecen indicar que en el fagosoma de *B. pertussis* no hay baja disponibilidad de magnesio, lo cual está de acuerdo con estudios previos que muestran que existe un exceso de Mg^{2+} en los fagosomas [49, 50]. Sin embargo, estos estudios no permiten descartar la posibilidad que el tratamiento de los macrófagos con bafilomicina A1 afecte la permeabilidad iónica del fagosoma que contiene a *B. pertussis*, eliminando así la restricción de magnesio, si es que la hubiera.

A diferencia de lo encontrado en macrófagos, se observó que MgtC no está involucrado en la persistencia intracelular de *B. pertussis* en la línea celular 16HBE14o- de epitelio respiratorio humano. Esta observación podría estar relacionada con diferencias entre los compartimentos intracelulares que habita *B. pertussis* en ambos tipos celulares. Si bien no se ha caracterizado aún el tráfico intracelular de *B. pertussis* en la línea celular 16HBE14o-, resultados previos de nuestro grupo utilizando células A549 de epitelio respiratorio indican que esta bacteria habita compartimentos con características de endosomas tempranos [55]. El tráfico a este tipo de compartimentos es similar a lo encontrado en macrófagos humanos [40]. Medidas realizadas en macrófagos alveolares y en células del epitelio respiratorio indicaron que el pH fagosomal de los macrófagos es más ácido que el de las células epiteliales [71]. Así, *B. pertussis* podría encontrar condiciones de acidez diferentes en el fagosoma que habita en células epiteliales en comparación con macrófagos, y por este motivo, podría no requerir de MgtC para adaptarse al ambiente intracelular de células epiteliales.

En general, los resultados presentados en este capítulo indican que MgtC de *B. pertussis* tiene una doble función, por un lado, al promover el crecimiento en condiciones

de acidez y por el otro en entornos limitados en magnesio. Esta doble función podría explicarse si, como está descrito en *Salmonella Typhimurium*, MgtC inhibe la ATP sintasa bacteriana con el fin de disminuir la producción de ATP en condiciones de crecimiento adversas [37]. Esta actividad inhibitoria explicaría el rol de MgtC en el crecimiento de *B. pertussis* en pH ácido, una condición que estimula la actividad de la ATP sintasa y que podría interferir con la viabilidad bacteriana [72], así como también en limitación de magnesio, en donde la inhibición de la ATP sintasa provocaría una disminución en los niveles de ATP y la consiguiente liberación del Mg^{2+} unido a éstos, para obtener así un suministro adicional de este catión [72]. Se deberían realizar experimentos adicionales para corroborar si MgtC interacciona y es capaz de inhibir la actividad de la ATP sintasa bacteriana en *B. pertussis*.

MgtC se encontró expresado en *B. pertussis* intracelular y, a su vez, su expresión aumenta en condiciones de cultivo con pH ligeramente ácido, como el encontrado dentro del fagosoma con características de endosoma temprano que esta bacteria habita en macrófagos humanos [40]. Otros dos factores caracterizados en esta Tesis como relevantes para la sobrevivencia de este patógeno en células del hospedador, como BfrD (**Capítulo 4**) e IRP1-3 (**Capítulo 5**), también aumentan su expresión en entornos ácidos. Además, se encontró que el pH ligeramente ácido inhibe la expresión del transportador de hierro AfuA (**Capítulo 4**), una proteína cuyos niveles disminuyen hasta no ser detectados a medida que transcurre la infección intracelular de macrófagos (**Capítulo 3**). De esta manera, la detección de pH por *B. pertussis* podría ser un factor clave para regular la expresión de factores necesarios para su sobrevivencia en células del hospedador. Por otro lado, en este capítulo se encontró que la disponibilidad de Mg^{2+} también afecta la expresión de *mgtC* en *B. pertussis*. Si bien el acceso a este catión probablemente no sea un limitante en la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en macrófagos, es posible que este patógeno encuentre limitación de magnesio durante la colonización de otros nichos en el huésped. La regulación de MgtC en *Salmonella Typhimurium* es llevada a cabo principalmente por el sistema de dos componentes PhoPQ [73], que es activado por limitación de Mg^{2+} , pH ácido o presencia de péptidos antimicrobianos, siendo estas dos últimas potenciales condiciones de entorno intracelular para *S. Typhimurium* [74]. Así, es probable que en *B. pertussis* los mecanismos de regulación de la expresión de *mgtC* tanto por disponibilidad de Mg^{2+} como por pH ambiental también esté regulada por un sistema de dos componentes. El sistema de dos componentes BvgAS, que es el

principal regulador de los factores de virulencia de *B. pertussis*, detecta las concentraciones ambientales de iones SO_4^{2-} pero no de Mg^{2+} [75], con lo cual posiblemente no esté involucrado en la regulación de MgtC en limitación de Mg^{2+} . Por otro lado, el sistema de dos componentes RisAS de *B. bronchiseptica*, funcionalmente análogo a RisA/RisK de *B. pertussis* [76], está involucrado en la adaptación de estos patógenos a la vida intracelular [77, 78], y además es inhibido por concentraciones elevadas de Mg^{2+} [78], lo que lo convierte en candidato potencialmente involucrado en la regulación de MgtC en limitación de Mg^{2+} . Con respecto a la regulación por pH se ha demostrado que RisAS no responde a pH ácido [78], con lo cual probablemente no sea el sistema encargado de regular la expresión de MgtC en respuesta al pH del entorno. En relación a BvgAS, se desconoce si este sistema es capaz de ser activado en condiciones de acidez. Hay ensayos en curso al momento de la escritura de esta Tesis para evaluar esta posibilidad.

Un aspecto interesante para resaltar es que el genoma de *B. parapertussis*, un patógeno humano estrechamente relacionado con *B. pertussis*, codifica para una proteína (BPP3813) con homología a MgtC de *B. pertussis*. Cabe destacar que *B. parapertussis* es otro agente causal de la tos convulsa y, al igual que *B. pertussis*, ha persistido en la población durante décadas y también es capaz de sobrevivir intracelularmente [40, 79]. *B. pertussis* y *B. parapertussis* evolucionaron a partir de un ancestro común, *B. bronchiseptica*, en dos eventos independientes [80]. En ambos casos el proceso que involucró la pérdida e inactivación de genes a gran escala [80]. El hecho de que MgtC se haya conservado con una identidad de secuencia casi completa a pesar de la especiación sugiere que esta proteína está involucrada en la patogénesis de estas bacterias. Los resultados presentados en este Capítulo avalan esta hipótesis sugiriendo que MgtC es un factor relevante para el establecimiento de infecciones intracelulares muy probablemente ligadas a la persistencia de ambos patógenos en el humano, su único hospedador.

6.4. Conclusiones

B. pertussis expresa un homólogo de MgtC que está involucrado en la supervivencia intracelular de esta bacteria en macrófagos humanos. Este factor estaría principalmente involucrado en la adaptación de *B. pertussis* al microambiente moderadamente ácido presente en los compartimientos con características de endosomas tempranos donde reside en macrófagos humanos. Asimismo, los resultados presentados sugieren que la concentración intracelular de Mg^{2+} en estos compartimientos no sería un factor limitante para la supervivencia intracelular de *B. pertussis*. Por otro lado, se puede concluir que MgtC es un factor relevante de *B. pertussis* para adaptarse a ambientes limitados en magnesio y que estos entornos además inducen la expresión del canal de Mg^{2+} MgtE. Por último, los estudios sugieren que MgtC, a diferencia del que ocurre en macrófagos, no es necesario para la persistencia intracelular de *B. pertussis* en células del epitelio respiratorio, sugiriendo que existen diferencias en la composición de los compartimientos intracelulares que habita este patógeno entre ambos tipos celulares.

6.5. Referencias

1. Romani A, Scarpa A. Regulation of cellular magnesium. *Front Biosci.* 2000,5(4):D720-734.
2. Groisman EA, Hollands K, Kriner MA, Lee EJ, Park SY, Pontes MH. Bacterial Mg²⁺ homeostasis, transport, and virulence. *Annu Rev Genet.* 2013,47:625-646.
3. Smith RL, Maguire ME. Microbial magnesium transport: unusual transporters searching for identity. *Mol Microbiol.* 1998,28(2):217-226.
4. Maguire ME. Magnesium transporters: properties, regulation and structure. *Front Biosci.* 2006,11:3149-3163.
5. Webb M. The utilization of magnesium by certain Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Microbiology.* 1966,43(3):401-409.
6. Hmiel S, Snavely M, Miller C, Maguire M. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: characterization of magnesium influx and cloning of a transport gene. *J Bacteriol.* 1986,168(3):1444-1450.
7. Smith RL, Thompson LJ, Maguire ME. Cloning and characterization of MgtE, a putative new class of Mg²⁺ transporter from *Bacillus firmus* OF4. *J Bacteriol.* 1995,177(5):1233-1238.
8. Hmiel S, Snavely M, Florer J, Maguire M, Miller C. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: genetic characterization and cloning of three magnesium transport loci. *J Bacteriol.* 1989,171(9):4742-4751.
9. Shin J-H, Wakeman CA, Goodson JR, Rodionov DA, Freedman BG, Senger RS, Winkler WC. Transport of Magnesium by a Bacterial Nramp-Related Gene. *PLoS Genet.* 2014,10(6):e1004429.
10. Silver S. Active transport of magnesium in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1969,62(3):764-771.
11. Payandeh J, Pfoh R, Pai EF. The structure and regulation of magnesium selective ion channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes.* 2013,1828(11):2778-2792.
12. Møller JV, Juul B, le Maire M. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes.* 1996,1286(1):1-51.
13. Alteri CJ, Lindner JR, Reiss DJ, Smith SN, Mobley HL. The broadly conserved regulator PhoP links pathogen virulence and membrane potential in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2011,82(1):145-163.
14. Gibson MM, Bagga DA, Miller CG, Maguire ME. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: the influence of new mutations conferring Co²⁺ resistance on the CorA Mg²⁺ transport system. *Mol Microbiol.* 1991,5(11):2753-2762.
15. Armitano J, Redder P, Guimaraes VA, Linder P. An Essential Factor for High Mg(2+) Tolerance of *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol.* 2016,7:1888.
16. Groisman EA, Kayser J, Soncini FC. Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg²⁺ environments. *J Bacteriol.* 1997,179(22):7040-7045.
17. Coughlin RT, Tonsager S, McGroarty EJ. Quantitation of metal cations bound to membranes and extracted lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc).* 1983,22(8):2002-2007.
18. Garcia Vescovi E, Soncini FC, Groisman EA. Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell.* 1996,84(1):165-174.
19. Gryllos I, Levin JC, Wessels MR. The CsrR/CsrS two-component system of group A *Streptococcus* responds to environmental Mg²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003,100(7):4227-4232.

20. Dann III CE, Wakeman CA, Sieling CL, Baker SC, Irnov I, Winkler WC. Structure and mechanism of a metal-sensing regulatory RNA. *Cell*. 2007,130(5):878-892.
21. Cromie MJ, Shi Y, Latifi T, Groisman EA. An RNA sensor for intracellular Mg²⁺. *Cell*. 2006,125(1):71-84.
22. Papp-Wallace KM, Nartea M, Kehres DG, Porwollik S, McClelland M, Libby SJ, Fang FC, Maguire ME. The CorA Mg²⁺ channel is required for the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*. 2008,190(19):6517-6523.
23. Anderson GG, Yahr TL, Lovewell RR, O'Toole GA. The *Pseudomonas aeruginosa* magnesium transporter MgtE inhibits transcription of the type III secretion system. *Infect Immun*. 2010,78(3):1239-1249.
24. Merino S, Gavin R, Altarriba M, Izquierdo L, Maguire ME, Tomas JM. The MgtE Mg²⁺ transport protein is involved in *Aeromonas hydrophila* adherence. *FEMS Microbiol Lett*. 2001,198(2):189-195.
25. Belon C, Soscia C, Bernut A, Laubier A, Bleves S, Blanc-Potard AB. A Macrophage Subversion Factor Is Shared by Intracellular and Extracellular Pathogens. *PLoS Pathog*. 2015,11(6):e1004969.
26. Blanc-Potard AB, Lafay B. MgtC as a horizontally-acquired virulence factor of intracellular bacterial pathogens: evidence from molecular phylogeny and comparative genomics. *J Mol Evol*. 2003,57(4):479-486.
27. Blanc-Potard AB, Groisman EA. The *Salmonella* selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J*. 1997,16(17):5376-5385.
28. Retamal P, Castillo-Ruiz M, Mora GC. Characterization of MgtC, a Virulence Factor of *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *PLoS ONE*. 2009,4(5):e5551.
29. Buchmeier N, Blanc-Potard A, Ehrst S, Piddington D, Riley L, Groisman EA. A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*. 2000,35(6):1375-1382.
30. Lavigne JP, O'Callaghan D, Blanc-Potard AB. Requirement of MgtC for *Brucella suis* intramacrophage growth: a potential mechanism shared by *Salmonella enterica* and *Mycobacterium tuberculosis* for adaptation to a low-Mg²⁺ environment. *Infect Immun*. 2005,73(5):3160-3163.
31. Grabenstein JP, Fukuto HS, Palmer LE, Bliska JB. Characterization of phagosome trafficking and identification of PhoP-regulated genes important for survival of *Yersinia pestis* in macrophages. *Infect Immun*. 2006,74(7):3727-3741.
32. Maloney KE, Valvano MA. The mgtC gene of *Burkholderia cenocepacia* is required for growth under magnesium limitation conditions and intracellular survival in macrophages. *Infect Immun*. 2006,74(10):5477-5486.
33. Le Moigne V, Belon C, Goulard C, Accard G, Bernut A, Pitard B, Gaillard JL, Kremer L, Herrmann JL, Blanc-Potard AB. MgtC as a host-induced factor and vaccine candidate against *Mycobacterium abscessus* infection. *Infect Immun*. 2016.
34. Belon C, Gannoun-Zaki L, Lutfalla G, Kremer L, Blanc-Potard AB. *Mycobacterium marinum* MgtC plays a role in phagocytosis but is dispensable for intracellular multiplication. *PLoS ONE*. 2014,9(12):e116052.
35. Belon C, Blanc-Potard AB. Intramacrophage Survival for Extracellular Bacterial Pathogens: MgtC As a Key Adaptive Factor. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016,6:52.
36. Maguire ME. MgtA and MgtB: prokaryotic P-type ATPases that mediate Mg²⁺ influx. *J Bioenerg Biomembr*. 1992,24(3):319-328.
37. Lee EJ, Pontes MH, Groisman EA. A bacterial virulence protein promotes pathogenicity by inhibiting the bacterium's own F1Fo ATP synthase. *Cell*. 2013,154(1):146-156.
38. Deckers-Hebestreit G, Altendorf K. The F₀F₁-type ATP synthases of bacteria: structure and function of the F₀ complex. *Annu Rev Microbiol*. 1996,50:791-824.
39. Nikaido H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003,67(4):593-656.

40. Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovics ML, Harvill ET, Rodriguez ME. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun*. 2010,78(3):907-913.
41. Huynh KK, Grinstein S. Regulation of vacuolar pH and its modulation by some microbial species. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007,71(3):452-462.
42. Srikumar S, Kroger C, Hebrard M, Colgan A, Owen SV, Sivasankaran SK, Cameron AD, Hokamp K, Hinton JC. RNA-seq Brings New Insights to the Intra-Macrophage Transcriptome of *Salmonella* Typhimurium. *PLoS Pathog*. 2015,11(11):e1005262.
43. Amman F, D'Halluin A, Antoine R, Huot L, Bibova I, Keidel K, Slupek S, Bouquet P, Coutte L, Caboche S. Primary transcriptome analysis reveals importance of IS elements for the shaping of the transcriptional landscape of *Bordetella pertussis*. *RNA biology*. 2018:1-9.
44. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J, Thompson JD, Higgins DG. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*. 2011,7:539.
45. Mallick P, Schirle M, Chen SS, Flory MR, Lee H, Martin D, Ranish J, Raught B, Schmitt R, Werner T. Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. *Nat Biotechnol*. 2007,25(1):125-131.
46. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001,25(4):402-408.
47. Stainer DW, Scholte MJ. A Simple Chemically Defined Medium for the Production of Phase I *Bordetella pertussis*. *Microbiology*. 1970,63(2):211-220.
48. Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M, Hinton JC. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*. 2003,47(1):103-118.
49. Lelong E, Marchetti A, Gueho A, Lima WC, Sattler N, Molmeret M, Hagedorn M, Soldati T, Cosson P. Role of magnesium and a phagosomal P-type ATPase in intracellular bacterial killing. *Cell Microbiol*. 2011,13(2):246-258.
50. Martin-Orozco N, Touret N, Zaharik ML, Park E, Kopelman R, Miller S, Finlay BB, Gros P, Grinstein S. Visualization of vacuolar acidification-induced transcription of genes of pathogens inside macrophages. *Mol Biol Cell*. 2006,17(1):498-510.
51. Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H (+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem*. 1991,266(26):17707-17712.
52. Schneider B, Gross R, Haas A. Phagosome acidification has opposite effects on intracellular survival of *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *Infect Immun*. 2000,68(12):7039-7048.
53. Johnson ID, Spence MT, The molecular probes handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies. 2010: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
54. Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988,85(21):7972-7976.
55. Lamberti Y, Gorgojo J, Massillo C, Rodriguez ME. *Bordetella pertussis* entry into respiratory epithelial cells and intracellular survival. *Pathog Dis*. 2013,69(3):194-204.
56. Aebersold R, Burlingame AL, Bradshaw RA. Western blots versus selected reaction monitoring assays: time to turn the tables? *Mol Cell Proteomics*. 2013,12(9):2381-2382.
57. Snavely MD, Miller CG, Maguire ME. The mgtB Mg²⁺ transport locus of *Salmonella typhimurium* encodes a P-type ATPase. *J Biol Chem*. 1991,266(2):815-823.
58. Alix E, Blanc-Potard AB. MgtC: a key player in intramacrophage survival. *Trends Microbiol*. 2007,15(6):252-256.

59. Smith RL, Kaczmarek MT, Kucharski LM, Maguire ME. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: regulation of mgtA and mgtCB during invasion of epithelial and macrophage cells. *Microbiology*. 1998,144 (Pt 7):1835-1843.
60. Shi L, Adkins JN, Coleman JR, Schepmoes AA, Dohnkova A, Mottaz HM, Norbeck AD, Purvine SO, Manes NP, Smallwood HS. Proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from RAW 264.7 macrophages identification of a novel protein that contributes to the replication of serovar Typhimurium inside macrophages. *J Biol Chem*. 2006,281(39):29131-29140.
61. Alix E, Blanc-Potard AB. Peptide-assisted degradation of the *Salmonella* MgtC virulence factor. *EMBO J*. 2008,27(3):546-557.
62. Hood MI, Skaar EP. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol*. 2012,10(8).
63. Portillo FGd, Foster JW, Maguire ME, Finlay BB. Characterization of the micro-environment of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles within MDCK epithelial cells. *Mol Microbiol*. 1992,6(22):3289-3297.
64. Groisman EA. The ins and outs of virulence gene expression: Mg²⁺ as a regulatory signal. *Bioessays*. 1998,20(1):96-101.
65. Botella H, Stadthagen G, Lugo-Villarino G, de Chastellier C, Neyrolles O. Metallobiology of host-pathogen interactions: an intoxicating new insight. *Trends Microbiol*. 2012,20(3):106-112.
66. Forbes JR, Gros P. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol*. 2001,9(8):397-403.
67. Wessling-Resnick M. Nramp1 and other transporters involved in metal withholding during infection. *J Biol Chem*. 2015:jbc. R115. 643973.
68. Annesley SJ, Fisher PR. *Dictyostelium discoideum*—a model for many reasons. *Mol Cell Biochem*. 2009,329(1-2):73-91.
69. Taylor-Mulneix DL, Bendor L, Linz B, Rivera I, Ryman VE, Dewan KK, Wagner SM, Wilson EF, Hilburger LJ, Cuff LE. *Bordetella bronchiseptica* exploits the complex life cycle of *Dictyostelium discoideum* as an amplifying transmission vector. *PLoS Biol*. 2017,15(4):e2000420.
70. Taylor-Mulneix DL, Hamidou Soumana I, Linz B, Harvill ET. Evolution of *Bordetellae* from Environmental Microbes to Human Respiratory Pathogens: Amoebae as a Missing Link. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017,7(510).
71. Johnson NF. Phagosomal pH and glass fiber dissolution in cultured nasal epithelial cells and alveolar macrophages: a preliminary study. *Environ Health Perspect*. 1994,102(Suppl 5):97-102.
72. Pontes MH, Sevostyanova A, Groisman EA. When Too Much ATP Is Bad for Protein Synthesis. *J Mol Biol*. 2015,427(16):2586-2594.
73. Soncini FC, Vescovi EG, Solomon F, Groisman EA. Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: identification of PhoP-regulated genes. *J Bacteriol*. 1996,178(17):5092-5099.
74. Prost LR, Miller SI. The *Salmonellae* PhoQ sensor: mechanisms of detection of phagosome signals. *Cell Microbiol*. 2008,10(3):576-582.
75. Lacey B. Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. *Epidemiology & Infection*. 1960,58(1):57-93.
76. Chen Q, Ng V, Warfel JM, Merkel TJ, Stibitz S. Activation of Bvg-repressed genes in *Bordetella pertussis* by RisA requires cross talk from noncooperonic histidine kinase RisK. *J Bacteriol*. 2017,199(22):e00475-00417.
77. Stenson TH, Allen AG, Al-Meer JA, Maskell D, Peppler MS. *Bordetella pertussis* risA, but not risS, is required for maximal expression of Bvg-repressed genes. *Infect Immun*. 2005,73(9):5995-6004.

78. Jungnitz H, West NP, Walker MJ, Chhatwal GS, Guzman CA. A second two-component regulatory system of *Bordetella bronchiseptica* required for bacterial resistance to oxidative stress, production of acid phosphatase, and in vivo persistence. *Infect Immun.* 1998,66(10):4640-4650.
79. Gorgojo J, Harvill ET, Rodriguez ME. *Bordetella parapertussis* survives inside human macrophages in lipid raft-enriched phagosomes. *Infect Immun.* 2014,82(12):5175-5184.
80. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MT, y col. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet.* 2003,35(1):32-40.

Capítulo 7

Discusión general

7. Discusión general

A pesar de las altas tasas de vacunación la tos convulsa continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial, siendo una de las principales causas de muerte por enfermedades evitables mediante vacunación [1]. Las vacunas actualmente utilizadas si bien confieren cierto grado de protección contra los síntomas de la enfermedad, no previenen eficientemente la colonización por *B. pertussis* [2], permitiendo el establecimiento de portadores asintomáticos e imposibilitando su erradicación [3]. *B. pertussis* es un patógeno estrictamente humano y sin reservorio conocido por fuera del hombre [4]. Las bases de la persistencia de este patógeno en la población, así como su localización durante períodos asintomáticos, aún no han sido esclarecidos, dificultando el diseño de estrategias inmunopreventivas eficaces. La continua circulación de la bacteria en poblaciones inmunizadas con vacunas que inducen una protección deficiente ha conducido a la aparición de cepas más virulentas [5, 6], con ciertas características que les permiten evadir la ya deficiente inmunoprotección [7]. La introducción de las vacunas acelulares ha tenido un impacto decisivo en la selección de cepas circulantes, la reemergencia de la enfermedad y el cambio de rango etario de los infectados con *B. pertussis*, observándose un incremento en el número de casos reportados en adolescentes y adultos [8, 9]. Estos últimos cursan la enfermedad de forma atípica adquiriendo la misma el carácter de crónica y persistente en algunos casos [10] y constituyen una de las principales fuentes de contagio de lactantes y niños parcialmente inmunizados, quienes presentan la mayor morbimortalidad [11]. Por estos motivos, la vacunación de adultos ha sido propuesta como una estrategia para detener la circulación de *B. pertussis* en la población [12]. En particular, la vacunación obligatoria de madres embarazadas ha logrado disminuir significativamente la mortalidad infantil [13], fundamentalmente debido a que la madre es la mayor fuente de contagio para el recién nacido [14]. A pesar de esta mejora en la situación epidemiológica, el uso de vacunas deficientes determina que los picos epidémicos y muertes causadas por esta bacteria siguen siendo un problema mundial de salud pública [15]. El diseño de mejoras en las estrategias preventivas contra *B. pertussis* depende en gran medida del esclarecimiento de los mecanismos que contribuyen a la persistencia de esta bacteria en el hospedador.

A principios de la década de 1980, debido a los efectos adversos de la vacuna celular contra tos convulsa, se inició el desarrollo de una vacuna acelular con el objetivo

de disminuir los posibles efectos secundarios [16]. En el momento de la formulación de la vacuna acelular se consideraba que *B. pertussis* desarrollaba una infección estrictamente extracelular del epitelio respiratorio, que se iniciaba con la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales del tracto respiratorio y continuaba con la multiplicación de las bacterias en el sitio de adhesión y la producción de toxinas [17], que daba lugar a la fase tóxica de la enfermedad. Debido a que desde el inicio de la fase tóxica la bacteria ya no se recupera del tracto respiratorio por hisopado nasofaríngeo se consideró por mucho tiempo que la bacteria se eliminaba en un período aproximado de 7 días desde el comienzo de la colonización. Por este motivo, se aceptó que la interferencia con el proceso de adhesión inicial y la neutralización de las toxinas era suficiente para brindar protección contra esta enfermedad [17]. Los antígenos incluidos en la vacuna acelular se seleccionaron teniendo en cuenta que indujeran anticuerpos con las actividades biológicas mencionadas, fueran seguros y que brindaran protección contra la infección en modelos animales [18]. Los antígenos que cumplían con estas características en ese momento eran la adhesina FHA, la toxina pertussis (PT) y, en menor medida, las fimbrias [16]. Así fue como las vacunas acelulares se formularon inicialmente FHA y fimbrias, para evitar la adhesión de *B. pertussis* al tracto respiratorio, y PT, para inducir anticuerpos que neutralizaran la acción de esta toxina [18]. Por otro lado, tiempo más tarde se incluyó también pertactina (Prn) debido a que la inmunización con este antígeno confería protección en modelos animales [19]. Esta actividad protectora se atribuyó que Prn tiene un dominio RGD en su secuencia de aminoácidos y anticuerpos dirigidos contra esta proteína podría interferir con la adhesión de *B. pertussis* a células del hospedador [20]. Años más tarde se demostró Prn no está involucrada en la adhesión de la bacteria al epitelio respiratorio [21, 22] y que la base de su actividad protectora se debe a que es el único antígeno incluido en las vacunas acelulares que es blanco de opsoninas y promotor de actividad celular bactericida en neutrófilos y macrófagos [23]. La toxina adenilato ciclasa (CyaA) no fue incluida en esta lista de candidatos vacunales principalmente porque no estaba completamente caracterizada [18] y se creía que podía inducir autoinmunidad en el vacunado. El único adyuvante aprobado para uso en humanos en el momento de la formulación de la vacuna acelular era el hidróxido de aluminio [24]. Este adyuvante induce fundamentalmente inmunidad humoral [25], dado que activa la inmunidad Th2 [26]. Así, este tipo de inmunidad podría ser suficiente si *B. pertussis* fuese un patógeno extracelular. La implementación de la vacuna acelular disminuyó los efectos adversos asociados a la vacunación contra pertussis [27, 28], sin embargo, no mejoró la

situación epidemiológica de esta enfermedad sino todo lo contrario. El aumento de la incidencia fue tal que la OMS y el CDC la declararon enfermedad reemergente a fines de los 90, aproximadamente 10 años después de la introducción de la vacuna acelular [29]. El estudio de las cepas circulantes en el comienzo de la reemergencia mostró polimorfismos en zonas inmunodominantes de los antígenos vacunales con respecto a la cepa vacunal, sugiriendo una inmunoselección inducida por vacunación [30]. Actualmente las cepas circulantes han perdido por delección uno o más antígenos incluidos en las vacunas acelulares, confirmando la inmunoselección dirigida por vacunación y la profundización de la problemática epidemiológica [31]. La vacuna acelular no es óptima en el control de la tos convulsa como resultado de una combinación de factores que incluyen la calidad y cantidad de antígenos y el tipo de adyuvante utilizado. En relación a esto último varios estudios demostraron un rol crucial de la inmunidad celular (contribución Th1) en la protección contra *B. pertussis* en modelos murinos de infección [32-34], resultados que no son esperables en la protección contra un patógeno estrictamente extracelular. Los estudios en babuinos, recientemente adoptados como el mejor modelo de infección existente, confirmaron la importancia de este tipo de inmunidad en la protección contra *B. pertussis* [2]. Además, confirmaron que la vacuna acelular, si bien protege contra los síntomas de la enfermedad, no impide la colonización del tracto respiratorio por *B. pertussis* ni la transmisión de este patógeno a huéspedes no inmunes e incluso predispone a la infección subclínica [2]. La necesidad de inmunidad celular para lograr la eliminación de *B. pertussis* del hospedador sumado a la existencia de infectados asintomáticos, según se deduce de la epidemiología y la ausencia de un vector o reservorio por fuera del hombre, sugiere una posible fase intracelular de persistencia, tal como se ha visto en otros patógenos de difícil erradicación también considerados originalmente extracelulares [35]. Nuestro grupo fue pionero en el descubrimiento de que esta bacteria se comporta como un patógeno intracelular facultativo con un eventual nicho de persistencia dentro de macrófagos [36] y células del epitelio respiratorio del hospedador [37]. La existencia de una fase intracelular explica datos clínicos y epidemiológicos incompatibles con un patógeno estrictamente extracelular y justifica la necesidad de una contribución Th1 en la respuesta inmune para que sea protectora.

En los últimos años se han acumulado evidencia de patógenos bacterianos históricamente clasificados como extracelulares que, en realidad, tienen una o más fases

intracelulares durante el ciclo infeccioso, lo cual da lugar a infecciones crónicas o recurrentes y dificultan su erradicación [35]. Los ejemplos de este tipo de patógenos son *Staphylococcus aureus* [38], *Streptococcus pyogenes* [39], *Streptococcus pneumoniae* [40], *Bacillus anthracis* [41], *Helicobacter pylori* [42] y diversas cepas patogénicas de *Escherichia coli* [43-46]. Se ha demostrado que estos patógenos tienen la capacidad sobrevivir y, en algunos casos, multiplicarse dentro de las células del huésped [35]. En el caso de *B. pertussis*, estudios previos realizados tanto *in vitro* como *in vivo* sugerían que esta bacteria era capaz de ingresar en diferentes tipos de células del hospedador y de persistir intracelularmente [47-50]. Para poder evaluar esta posibilidad nuestro grupo empleó diferentes técnicas que abarcan la microscopía electrónica, la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) para evaluar la localización intracelular de bacterias viables, combinada con la evaluación de tráfico intracelular por microscopía confocal y marcadores específicos, y ensayos de protección a polimixina B para evaluar viabilidad intracelular [36, 37, 51]. Así, demostramos que *B. pertussis* es efectivamente capaz de sobrevivir dentro de células epiteliales, neutrófilos y macrófagos de origen humano [36, 37, 51]. La sobrevivencia de *B. pertussis* al encuentro con neutrófilos en ausencia de anticuerpos opsonizantes indica que esta bacteria es capaz de evitar la barrera más importante de la inmunidad innata contra patógenos bacterianos inhibiendo la actividad celular bactericida tanto intracelular como extracelular de los neutrófilos [51-53]. Al sobrevivir al encuentro con neutrófilos, *B. pertussis* podría adherirse a las células del epitelio respiratorio o ser capturada por los macrófagos alveolares. En el caso de las células epiteliales, resultados de nuestro grupo han demostrado que *B. pertussis* permanece viable dentro de este tipo celular y es capaz de repoblar el medio extracelular [37], lo cual, eventualmente, le permitiría emerger cuando las condiciones extracelulares sean favorables. La interacción de *B. pertussis* con macrófagos en ausencia de anticuerpos opsonizantes es levemente diferente. Una vez fagocitadas una parte de las bacterias es dirigida a lisosomas donde son inactivadas, pero un número significativo evita este tráfico bactericida y permanece viable en localización intracelular en fagosomas con características de endosoma tempranos donde puede establecer un eventual nicho duplicativo [36]. De esta manera, tanto las células epiteliales como los macrófagos son potenciales nichos de persistencia de *B. pertussis*. Se han publicado estudios *in vivo* que apoyan estos resultados obtenidos *in vitro*. Utilizando modelos de infección en animales se ha encontrado que *B. pertussis* permanece viable dentro de macrófagos alveolares de ratón y conejo por más de 21 días de iniciada la infección [54, 55]. Asimismo, *B. pertussis*

ha sido hallada en macrófagos alveolares de niños coinfectados con el virus de inmunodeficiencia humana [56] y en células ciliadas y macrófagos alveolares de infantes en los cuales se ha confirmado neumonía provocada por esta bacteria [57]. Los macrófagos, por sus características y su larga vida media, son nichos de persistencia de varios patógenos de difícil erradicación. Este tipo celular no sólo posibilita el establecimiento de infecciones crónicas o persistentes sino también la diseminación de patógenos a nuevos sitios de infección en el huésped [58, 59]. Resultados de nuestro grupo de investigación aún no publicados utilizando un modelo murino de infección mostraron la existencia *B. pertussis* viable en bazo e hígado de ratones infectados. Ya que *B. pertussis* no es un patógeno invasivo estos resultados sugieren que la bacteria podría haber sido transportada hasta estos sitios por macrófagos. En definitiva, las células del epitelio respiratorio y los macrófagos podrían tener un rol significativo en la persistencia de *B. pertussis* en el hospedador, en el fracaso de las estrategias preventivas y en la permanente circulación de la bacteria en la población, que ha llevado a la situación epidemiológica actual. El objetivo de este trabajo de Tesis fue el estudio de esta interacción y la identificación de los factores involucrados en la sobrevivencia *B. pertussis* dentro de células del hospedador.

La sobrevivencia de una bacteria en un nicho particular requiere del desarrollo de una respuesta adaptativa generalmente mediada por la regulación positiva o negativa de la expresión de genes involucrados en la adaptación a las condiciones del entorno encontradas [60]. El estudio de dicha respuesta es complejo y existen varias formas de abordarlo. De todas ellas, las técnicas de proteómica han ocupado un lugar predominante en los últimos años debido a que proporcionan una visión global de los cambios generados en el patógeno y ha conducido a avances significativos en la comprensión de los eventos que llevan al establecimiento de un nicho intracelular [61-68]. La interacción huésped-patógeno se produce principalmente a nivel de proteínas, dado que son éstas las principales responsables de las funciones biológicas de las células [69]. Dentro de este marco, este trabajo de Tesis Doctoral tuvo como primer objetivo identificar factores bacterianos involucrados en la sobrevivencia y eventual duplicación intracelular de *B. pertussis* mediante el estudio de los cambios en el proteoma bacteriano durante la infección intracelular. El estudio presentado en el **Capítulo 3** mostró la modificación de la abundancia de al menos 300 proteínas de *B. pertussis* durante su adaptación al microambiente intracelular en macrófagos. Un análisis funcional de estas proteínas

demonstró un enriquecimiento en proteínas involucradas en la respuesta a estrés, captura de hierro, metabolismo celular, regulación transcripcional y virulencia. Cabe destacar que este es el primer estudio (y único hasta el momento) que analiza la adaptación de *B. pertussis* al ambiente que encuentra dentro del macrófago. La información obtenida del estudio del proteoma de *B. pertussis* intracelular nos ha permitido conocer parte de la patobiología de esta bacteria. En base a los resultados obtenidos en el **Capítulo 3**, se eligió un primer grupo de proteínas con potencial relevancia en la adaptación al entorno intracelular para su estudio. Estas proteínas se seleccionaron teniendo en cuenta su homología con otras proteínas relevantes para la adaptación intracelular de otros patógenos, su posible rol en la captura de nutrientes o su eventual importancia en la adaptación a estrés. En particular, se estudió el rol de los sistemas de adquisición de hierro BfrD, BfrE e IRP1-3, y del factor MgtC, relevante para la adaptación bacteriana a ambientes ácidos y/o limitados en Mg²⁺.

Los cambios inducidos en el proteoma durante la infección son un reflejo de las condiciones ambientales a los que la bacteria debe adaptarse para sobrevivir. Los cambios observados en el proteoma de *B. pertussis* aislada de localización intracelular sugieren que esta bacteria se encuentra en un entorno ligeramente ácido. En estudios independientes encontramos que la expresión de genes cuyas proteínas mostraron cambios en abundancia durante la infección intracelular (*bfrD*, *bfrE*, *irp1-3*, *afuA* y *mgtC*) se encuentra regulada por la acidez del medio. Estos resultados sugieren que *B. pertussis* posee un sistema aún no caracterizado que es capaz de detectar y responder a la acidez del medio regulando la expresión de genes involucrados en la adaptación al entorno intracelular. La expresión de los genes en los microorganismos está sujeta a una regulación compleja en la que los sistemas de respuesta de dos componentes (TCS) desempeñan un papel importante [70]. Se han descrito diversos sistemas de dos componentes que responden específicamente a la acidez del medio y que producen una respuesta que permite a los microorganismos adaptarse a este ambiente [71-80]. El genoma de *B. pertussis* codifica para 14 sistemas de dos componentes hipotéticos [81], de los cuales actualmente se han caracterizado solamente el sistema BvgA/BvgS [82], el sistema RisA/RisK [83], y el sistema PlrS/PlrR [84]. No se ha determinado si estos TCS responden a la acidez del medio en *B. pertussis*. Entre los TCS aún no caracterizados se encuentran algunos que, por su homología con otros sistemas conocidos, podrían estar involucrados en la detección de entornos ácidos. Ellos son el TCS hipotético BP3222-

BP3223, homólogo al sistema ArsS/ArsR; BP3534-BP3535, homólogo a BvrS/BvrR; y BP2547-BP2548, homólogo al sistema PmrA/PmrB. El análisis del proteoma presentado en el **Capítulo 3** identificó al regulador de respuesta BP3534 tanto en bacterias extracelulares como intracelulares, con una tendencia a aumentar a tiempos tardíos post infección. Además, se observó que el regulador de respuesta BP3222 es activado por bacterias intracelulares solo a tiempos tardíos post infección. Así, mediante el análisis de fosforilación de estos sistemas y la construcción de cepas mutantes en conjunto con estudios transcriptómicos se podría determinar si algún sistema nombrado anteriormente está involucrado en la regulación de la expresión génica por detección de acidez en *B. pertussis*, que podría constituir un mecanismo relevante para la adaptación a la vida intracelular de este patógeno.

Los patógenos intracelulares deben capturar nutrientes para su crecimiento, adaptándose a las fuentes encontradas en el entorno intracelular [85]. Como se mencionó previamente, un mecanismo de defensa central de los mamíferos para impedir la proliferación de patógenos es la limitación de la disponibilidad de hierro [86]. Las bacterias patógenas tienen sistemas de captura de hierro de alta afinidad que les permiten obtener hierro aún en estas condiciones [87, 88]. Los estudios de proteómica de *B. pertussis* intracelular (**Capítulo 3**) muestran que, de todas las proteínas potencialmente involucradas en sistemas de captura de hierro de alta afinidad, sólo BfrD y BfrE aumentaron su abundancia durante la adaptación al entorno intracelular desde el inicio de la infección. Se ha documentado que los receptores BfrD y BfrE de *B. bronchiseptica* están involucrados en la captura de hierro de las glicoproteínas transferrina y lactoferrina utilizando como intermediarios las catecolaminas del huésped [89]. Las catecolaminas epinefrina y norepinefrina pueden formar complejos transitorios con el hierro contenido en las proteínas transferrina y lactoferrina [90]. Posteriormente, el complejo catecolamina-hierro formado puede ser incorporado por bacterias utilizando sistemas de captura específicos [90]. *B. pertussis* posee los receptores BfrD y BfrE con una identidad de secuencia de aminoácidos del 99% con respecto a los receptores de *B. bronchiseptica*, sugiriendo que cumplen funciones similares en ambas especies. De hecho, se ha demostrado que la incorporación de los receptores BfrD o BfrE de *B. pertussis* en un mutante de *B. bronchiseptica* en dichos genes restaura la capacidad de crecer en medios limitados en hierro en presencia de catecolaminas y transferrina, confirmando la funcionalidad de estos adquirentes de hierro presentes en el genoma de *B. pertussis* [89].

Por otro lado, se han encontrado anticuerpos que reconocen a BfrD y BfrE de *B. pertussis* en el suero de pacientes convalecientes de tos convulsa, indicando que ambos receptores se expresan durante la infección [89]. Por último, utilizando un modelo murino de infección, se ha demostrado que BfrD es necesario para la persistencia de *B. pertussis* en el tracto respiratorio de ratones, sugiriendo que cumple un rol en la patogénesis de esta bacteria [89]. Si bien estos resultados indican de manera indirecta la funcionalidad de BfrD y BfrE, en el caso de *B. pertussis* no se ha podido demostrar que estén involucrados en la captura de hierro a partir de catecolaminas y transferrina en medios de cultivo *in vitro*, probablemente debido a la baja expresión de los mismos en las condiciones utilizadas [91]. En este contexto, el aumento encontrado de los receptores BfrD y BfrE de *B. pertussis* durante la infección de macrófagos podría indicar que esta bacteria encuentra condiciones que estimulan la expresión de estos receptores en localización intracelular. De hecho, resultados presentados en esta Tesis indican que el cultivo de esta bacteria en limitación de hierro y entornos ligeramente ácidos, condiciones de entorno que la bacteria podría encontrar en los compartimentos que habita en su estadio intracelular, producen un aumento de la expresión de BfrD y BfrE. Actualmente se están diseñando experimentos para estudiar si bajo dichas condiciones de cultivo *B. pertussis* utiliza BfrD y/o BfrE para adquirir hierro a partir de transferrina utilizando como intermediarios catecolaminas.

El aumento de los receptores BfrD y BfrE observado en bacterias intracelulares sugiere que estos receptores podrían ser relevantes para la sobrevivencia de la bacteria dentro de las células del hospedador. Por esta razón, se realizaron ensayos para estudiar el eventual rol de los receptores BfrD y BfrE en la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis*. Los resultados indicaron que los receptores BfrD y/o BfrE están involucrados en la sobrevivencia intracelular de este patógeno en macrófagos y células epiteliales de origen humano. Si bien en esta Tesis no se ha evaluado si las catecolaminas están involucradas en la captura de hierro por estos receptores en *B. pertussis* intracelular, ciertos estudios sugieren que podrían darse las condiciones necesarias para que ocurra un mecanismo con estas características. Por un lado, resultados de nuestro grupo indican *B. pertussis* tiene acceso a transferrina en los compartimentos intracelulares que habita [36] y por otro lado, se ha demostrado que los macrófagos son capaces de sintetizar catecolaminas [92]. *B. pertussis* también puede capturar el hierro contenido en la transferrina mediante la producción del sideróforo alcaligina. Sin embargo, los resultados de proteómica indicaron

que esta bacteria en su estadio intracelular apaga la expresión el receptor AfuA, un transportador crítico en la captura de hierro mediada por alcaligina. Así, *B. pertussis* intracelular solo podría capturar el hierro presente en la transferrina a partir de BfrD y/o BfrE. La disminución en la sobrevivencia intracelular observada en ausencia de estos receptores confirma que *B. pertussis* está en contacto con transferrina y que tiene acceso a neuroquímicos como la norepinefrina y/o epinefrina, o a otros compuestos catecoles producidos por el huésped. La falta de diferencias en la persistencia intracelular entre la cepa salvaje y la cepa mutante defectiva en BfrD y BfrE a tiempos largos post infección sugiere que, en macrófagos, hay otras fuentes de hierro que hacen redundante este sistema de captura de hierro. En células del epitelio respiratorio no se ha reportado la síntesis de los neuroquímicos norepinefrina o epinefrina con lo cual el intermediario utilizado por BfrD y BfrE en este tipo celular podría ser otro compuesto, distinto de dichos neuroquímicos. Los compuestos catecoles que podrían estar presentes en células epiteliales son el ácido 4,5-dihidroxifenilacético (DOPAC) y el dihidroxifeniletilenglicol (DOPEG), productos de degradación de la dopamina y la norepinefrina, respectivamente [93-95]. Debido a la presencia de grupos catecol en la estructura de estos intermediarios es posible que formen complejos con el hierro. De esta manera, BfrD y BfrE de *B. pertussis* podrían capturar complejos DOPAC-Fe³⁺ y/o DOPEG-Fe³⁺ y promover así el crecimiento de esta bacteria. Un mecanismo de este tipo podría explicar la relevancia de estos receptores en el establecimiento de una infección intracelular de este patógeno en células epiteliales. Esta observación está actualmente siendo corroborada por nuestro grupo de investigación.

Las bacterias patógenas también cuentan con sistemas de adquisición de Fe²⁺, un estado de oxidación del hierro cuya estabilidad es favorecida en condiciones anaeróbicas o de pH ácido [96]. Varios estudios sugieren que el Fe²⁺ es utilizado como fuente de hierro por patógenos intracelulares a través de la expresión de receptores bacterianos específicos para este catión [97-102]. El único sistema capaz de transportar Fe²⁺ en *B. pertussis* es el sistema IRP1-3 / FtrABCD [103]. El receptor IRP1-3, también llamado FtrA [103], fue identificado por primera vez por nuestro grupo en un estudio del proteoma de *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro [104], y posteriormente se demostró que está involucrado en la transferencia de Fe²⁺ desde el periplasma al citoplasma bacteriano [103]. De hecho, IRP1-3 es necesario para el crecimiento de *B. pertussis* en medios limitados en hierro y levemente ácidos (pH 6,0) [103]. Como *B. pertussis* sobrevive

intracelularmente en compartimentos con características de endosomas tempranos [36], en los que el pH es cercano a 6,0 [105], cabe suponer que estos compartimentos podrían contener hierro en estado de oxidación Fe^{2+} y que IRP1-3 podría tener un rol en la persistencia intracelular de esta bacteria. En efecto, el estudio del proteoma presentado en el **Capítulo 3** indicó que IRP1-3 está expresado en bacterias intracelulares a tiempos tardíos post infección. Los resultados del **Capítulo 5** indicaron que en ausencia de los receptores BfrD y BfrE, la eliminación de IRP1-3 disminuye la capacidad de *B. pertussis* para persistir en células del hospedador. Así, estos resultados sugieren que el transportador IRP1-3 podría actuar como un receptor secundario de hierro involucrado en la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis*, en situaciones donde el sustrato que transportan BfrD y BfrE no se encuentre disponible. Es decir, la falta de complejos hierro-catecolaminas en el nicho intracelular de *B. pertussis*, un sustrato potencialmente capturado por BfrD y BfrE, podría ser compensado por la adquisición de Fe^{2+} a través del sistema que incluye a IRP1-3. Asimismo, los resultados presentados en el **Capítulo 5** indican que existen diferencias en la sobrevivencia intracelular en macrófagos y en células del epitelio respiratorio. Los resultados encontrados en macrófagos mostraron que a tiempos intermedios post infección la ausencia de BfrD y BfrE produce una disminución en la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis*, que decrece aún más en ausencia de IRP1-3. Sin embargo, a tiempos tardíos post infección, la ausencia de los transportadores BfrD, BfrE e IRP1-3 no modifica la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en macrófagos, sugiriendo que la adquisición de hierro a tiempos largos post infección podría estar mediada por otro sistema de captura y/o a través de otras fuentes de hierro aún no identificadas. Por otro lado, en células epiteliales la ausencia de los receptores BfrD, BfrE e IRP1-3 disminuye la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* tanto a tiempos intermedios como tardíos post infección. Estos resultados sugieren que hay una menor disponibilidad de fuentes de hierro alternativas en células epiteliales.

B. pertussis también puede capturar hierro del hemo a través del sistema Bhu [106]. Este sistema, codificado en el operón *bhuRSTUV*, se expresa basalmente en limitación de hierro y es inducido fuertemente en condiciones de limitación de hierro en presencia de hemo [106-108]. El estudio del proteoma presentado en el **Capítulo 3** demostró que la proteína BhuS, involucrada en la degradación de hemo, aumenta en bacterias intracelulares, aunque de manera no significativa. Esto podría sugerir que *B. pertussis* encuentra hemo en su estadio intracelular en macrófagos. El hemo es un

complejo formado por hierro y porfirina que es utilizado como grupo prostético en diversas enzimas y proteínas, particularmente esencial para el transporte de oxígeno ya que está presente en la hemoglobina [109]. El hemo es fuente de hierro de otros patógenos intracelulares como *Brucella abortus* [110] y *Escherichia coli* uropatógena [111]. El hemo puede ser liberado en el huésped debido a hemólisis u otro daño celular y es tóxico para el huésped debido a que induce efectos oxidativos y proinflamatorios [112]. Los macrófagos tienen un rol central en el reciclado de hemo en el huésped [113]. Estas células pueden capturar el hemo o la hemoglobina a través del receptor CD91 (LRP), que une complejos de hemopexina-hemo [112], y del receptor CD163, que captura complejos de haptoglobina-hemoglobina [114]. Cabe destacar que CD163 es un marcador comúnmente asociado a la polarización a un fenotipo M2 de macrófagos [115], que tienen una capacidad bactericida disminuida [116]. Se ha demostrado que la inducción de las células THP-1 hacia un fenotipo M2 aumenta la expresión en su superficie del receptor CD163 [117-119]. Según resultados previos del grupo la infección de células THP-1 con *B. pertussis* induce una respuesta celular con características similares a las de un fenotipo M2 [120]. Dado que los macrófagos tienen un rol central en el reciclado de hemo en el huésped [113], cabe esperar que *B. pertussis* encuentre una mayor disponibilidad de esta fuente de hierro en estas células inmunes en comparación con lo que encuentra dentro de las células del epitelio respiratorio en su estadio intracelular, más aun teniendo en cuenta que la infección favorece la polarización a M2. Esta observación podría explicar los resultados obtenidos con los distintos tipos celulares con el triple mutante en los receptores IRP1-3, BfrD y BfrE.

En resumen, nuestros resultados indican que *B. pertussis* expresa un conjunto de proteínas en su estadio intracelular que están involucradas en la captura de hierro. También sugieren que este patógeno podría utilizar en localización intracelular sistemas de captura de hierro no estudiados en esta Tesis, entre ellos el sistema de captura de hemo Bhu, lo cual permite inferir que los complejos de catecolaminas-hierro, el hierro ferroso, y probablemente el hemo, son fuentes de hierro para esta bacteria en su estadio intracelular. Se ha demostrado que otros patógenos también aumentan la expresión de varios transportadores de distintas fuentes de hierro en su estadio intracelular, como es el caso de *Brucella abortus* [121], *Salmonella enterica* [122] y *Shigella flexneri* [123]. Estudios del proteoma de estos patógenos aislados de células del hospedador indicaron que en su estadio intracelular estas bacterias aumentan la expresión de sistemas de síntesis

y captura de sideróforos, proteínas de captura de transferrina y sistemas de adquisición de Fe^{2+} [121-123]. Esta redundancia de mecanismos de captura de hierro en patógenos intracelulares fue confirmada en diversos estudios. Por ejemplo, tanto *Shigella flexneri* [99] como *Francisella tularensis* [97] capturan hierro simultáneamente a partir de sideróforos y de Fe^{2+} libre en su estadio intracelular. Asimismo, *Yersinia pestis* posee dos sistemas redundantes para la adquisición de Fe^{2+} que permiten su duplicación intracelular en macrófagos [98]. Según nuestro estudio, *B. pertussis* es otro ejemplo de un patógeno con capacidad de utilizar varios sistemas para adquirir hierro en su estadio intracelular.

Además de contar con sistemas especializados de captura de nutrientes vitales, los patógenos intracelulares poseen una serie de mecanismos que les permiten resistir la acción bactericida activada por el sistema inmune [124]. Entre ellos, se puede nombrar el estallido respiratorio que ocurre en células fagocíticas activadas, que da como resultado la producción de especies reactivas de oxígeno y/o de nitrógeno y que es contrarrestado por los microorganismos mediante la producción de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa y catalasa [125]. *B. pertussis* posee varias enzimas potencialmente involucradas en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno, sin embargo, el estudio del proteoma presentado en el **Capítulo 3** no mostró cambios en la abundancia de dichas proteínas, sugiriendo que este patógeno no enfrenta estrés oxidativo en su estadio intracelular. Este resultado es esperable según resultados propios [120] y de otros grupos [126-128] que demuestran que tanto CyaA como PT, ambas expresadas en bacterias intracelulares según los resultados presentados en esta tesis (**Capítulo 3**), modulan la respuesta inflamatoria y bactericida del macrófago a lo largo de la infección intracelular. Resultados previos del grupo que demuestran que *B. pertussis* no induce estallido respiratorio en neutrófilos, un tipo de célula inmune aún más agresiva que los macrófagos [52], apoyan la capacidad de esta bacteria de evitar la activación de las células inmunes.

Entre las estrategias bactericidas de las células eucariotas está la presencia de péptidos antimicrobianos catiónicos en los fagosomas de macrófagos, neutrófilos y ciertas células epiteliales [129]. Los péptidos antimicrobianos forman poros en las membranas bacterianas, provocando un eflujo de iones y nutrientes esenciales hacia el exterior celular y la consiguiente disrupción del potencial de membrana [130]. Los microorganismos contrarrestan la acción de los péptidos antimicrobianos principalmente mediante modificaciones en la estructura de su superficie celular [131]. Se ha observado

que *B. pertussis* resiste la actividad de los péptidos antimicrobianos a través de varios mecanismos [132]. En primer lugar, el lípido A presente en el lipooligosacárido de *B. pertussis* contiene una modificación con glucosamina que disminuye su carga negativa [133]. Esta modificación aumenta la resistencia a numerosos péptidos antimicrobianos, incluido LL-37, presente en neutrófilos y en las superficies del epitelio respiratorio [133]. Por otro lado, *B. pertussis* contiene un grupo de genes, denominado *locus dra*, involucrado en la unión de D-alanina a proteínas presentes en la membrana externa, que disminuyen la electronegatividad de la superficie bacteriana [132]. Esta disminución produce un aumento en la resistencia a péptidos antimicrobianos y el consiguiente aumento en la sobrevivencia intracelular en neutrófilos [132], que dependen en parte de los péptidos antimicrobianos para su actividad bactericida [134]. Por último, se ha demostrado que los autotransportadores BrkA y BapC también contribuyen a la resistencia a los péptidos antimicrobianos [135, 136], a través de un mecanismo aún no esclarecido. En el estudio del proteoma presentado en el **Capítulo 3** se detectó un aumento del autotransportador BrkA en *B. pertussis* intracelular, que podría aumentar la resistencia de esta bacteria a la acción bactericida de los péptidos antimicrobianos en el ambiente intracelular, si es que los hubiera.

Otro de los mecanismos bactericidas de las células huésped es la rápida acidificación del fagosoma luego de la fagocitosis de un microorganismo [124]. Para resistir a este mecanismo de defensa, varios patógenos, incluso aquellos que inhiben la fusión fagolisosomal y permanecen en endosomas tempranos, utilizan el factor MgtC que promueve la sobrevivencia dentro de células del hospedador al permitir la adaptación a entornos ácidos y/o limitados en magnesio [137], mediante la modulación de la ATP sintasa F_1F_0 bacteriana [138]. Los resultados de proteómica de *B. pertussis* intracelular mostraron por primera vez que este patógeno expresa una proteína homóloga a MgtC. Dicha expresión fue confirmada mediante estudios de SRM que confirmaron no sólo la presencia de MgtC sino también que la expresión de ésta tiende a aumentar a medida que transcurre la infección intracelular en macrófagos (**Capítulo 6**). Debido al rol crucial de MgtC de varios patógenos en el establecimiento de infecciones intracelulares [139], se analizó si cumple un rol similar en *B. pertussis*. Los estudios realizados en esta Tesis confirmaron que MgtC está involucrado en la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en macrófagos. Empleando medios de cultivo sintéticos, se demostró que MgtC promueve el crecimiento de *B. pertussis* en entornos limitados en magnesio o ligeramente ácidos, y

que ambas condiciones ambientales regulan positivamente la expresión de este gen. Según nuestros resultados, en el entorno intracelular la importancia de MgtC en la sobrevivencia de *B. pertussis* parece estar vinculada a la adaptación al entorno levemente ácido del fagosoma, ya que la neutralización del pH de estos compartimentos con bafilomicina A1 elimina el defecto de sobrevivencia intracelular de una cepa mutante en este factor. Asimismo, los resultados obtenidos sugieren que MgtC no está involucrado en la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* en células del epitelio respiratorio, un tipo celular que tendría una capacidad disminuida de acidificar sus fagosomas [140]. Por otro lado, MgtC se encuentra presente en numerosos patógenos y estudios basados en homología de secuencia sugieren que este gen se ha adquirido por transferencia horizontal durante la evolución [141]. Los dos agentes causales de la tos convulsa, *B. pertussis* y *B. parapertussis*, evolucionaron a partir de *B. bronchiseptica* en dos eventos independientes que involucraron la pérdida e inactivación de genes a gran escala [142]. Resultados de nuestro grupo indican que *B. parapertussis*, al igual que *B. pertussis*, se comporta como un patógeno intracelular facultativo [143, 144]. *B. bronchiseptica* contiene una proteína con homología a MgtC y el hecho de que este factor se conservó en *B. pertussis* y *B. parapertussis* con una identidad de secuencia cercana al 100% a pesar de la reducción del genoma durante la especiación sugiere que juega un papel en su patogénesis, probablemente al favorecer su persistencia en células del hospedador.

Los resultados presentados en el **Capítulo 6** indican que la limitación de Mg^{2+} , además de inducir la expresión de MgtC, también produce un aumento en la expresión del canal de Mg^{2+} , MgtE. Una búsqueda de genes con homología con transportadores de Mg^{2+} indicó que MgtE podría ser el único importador de Mg^{2+} de alta afinidad de *B. pertussis*. Un estudio reciente demostró que la apertura del canal formado por MgtE se encuentra modulada por los niveles intracelulares de ATP [145], que sumado al rol propuesto para MgtC [138], sugieren un vínculo funcional entre los niveles de ATP y la homeostasis de Mg^{2+} . Asimismo, se ha demostrado que MgtE está involucrado en la regulación de la virulencia en respuesta a la disponibilidad de Mg^{2+} en varios patógenos [146, 147]. Por este motivo, en nuestro laboratorio se han iniciado estudios tendientes a evaluar si MgtE y los niveles de Mg^{2+} están involucrados en la regulación de la virulencia de *B. pertussis*.

En conjunto, los resultados descriptos en este trabajo de Tesis representan un avance en la caracterización de la interacción de *B. pertussis* con el hospedador y de los

mecanismos que intervienen en este proceso, ilustrados como un modelo en la **Figura 7.1**.

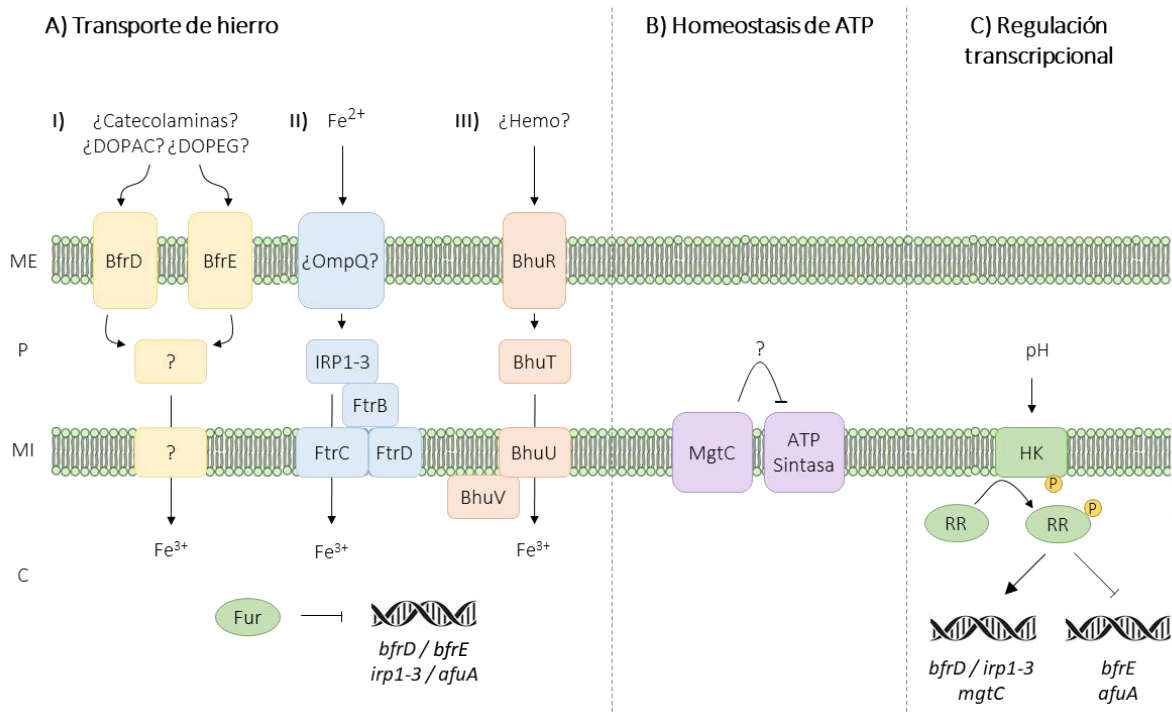


Figura 7.1: Modelo de los mecanismos involucrados en la sobrevida intracelular de *B. pertussis*: **A) Transporte de hierro.** **I)** *B. pertussis* en su estadio intracelular utilizaría compuestos catecoles unidos a hierro (como epinefrina, norepinefrina, DOPAC y DOPEG) para incorporar hierro a través de los transportadores BfrD y BfrE. El sistema de transporte que movilizaría el hierro capturado por BfrD y BfrE del periplasma al citoplasma aún no está identificado. **II)** *B. pertussis* también podría captar Fe²⁺, que podría ingresar al periplasma a través de la porina OmpQ y ser transportado al citoplasma mediante el transportador IRP1-3 / FtrABC. **III)** *B. pertussis* podría captar grupos hemo a través del receptor BhuR y el transportador ABC BhuTUV. En exceso de hierro el factor de transcripción Fur inhibe la expresión de *bfrD*, *bfrE*, *irp1-3* y *afuA*. **B) Homeostasis de ATP:** MgtC contribuye a la sobrevida de *B. pertussis* intracelular en el ambiente ligeramente ácido encontrado dentro del endosoma temprano. El factor MgtC inhibiría la ATP sintasa F₁F₀ bacteriana para mantener la homeostasis de ATP. **C) Regulación transcripcional:** *B. pertussis* podría detectar la acidez del medio a partir de un sistema de dos componentes, en donde el pH ácido activaría un sensor histidina quinasa (HK), que fosforilaría a un regulador de respuesta (RR), el cual activaría la expresión de los genes *bfrD*, *irp1-3* y *mgtC*, y a su vez reprimiría la expresión de *afuA* y *bfrE*. ME: Membrana externa. P: Periplasma. MI: Membrana interna. C: Citoplasma.

Como se mencionó previamente, la problemática relacionada con la tos convulsa está lejos de ser resuelta. Más aún, los datos epidemiológicos señalan que la tos convulsa es la única enfermedad inmunoprevenible que se encuentra en aumento [148]. La situación en la Argentina no difiere de la del resto del mundo observándose un marcado incremento en su incidencia [149, 150]. Son varios los factores que contribuyen a esta

situación, sin embargo, el más relevante es el escaso nivel de conocimiento de los mecanismos básicos de la infección, patogénesis, y persistencia de esta bacteria en la población [148]. En este contexto, resultados previos de nuestro grupo indicaron que *B. pertussis* posee ciertos atributos característicos de los patógenos intracelulares facultativos, como son la capacidad de ingresar y sobrevivir dentro de las células del hospedador y modular la respuesta inmune para favorecer su supervivencia intracelular [36, 37, 51, 120]. La existencia de una fase intracelular de persistencia tiene un gran impacto en el diseño de estrategias terapéuticas y/o preventivas eficaces contra esta enfermedad. Por este motivo, en este trabajo de Tesis se profundizó el estudio de los mecanismos que podrían permitir a *B. pertussis* establecer un nicho de persistencia intracelular. A modo de resumen, utilizando metodologías de microbiología celular, proteómica y biología molecular se avanzó en la confirmación de la sobrevida intracelular de *B. pertussis* en células del hospedador. La presencia de una fase de persistencia intracelular en el ciclo infeccioso de *B. pertussis* indica que el control de la tos convulsa requiere de la formulación de una nueva generación de vacunas que logre prevenir el establecimiento de nichos intracelulares por parte de este patógeno.

7.1. Referencias

1. He Q, Mertsola J. Factors contributing to pertussis resurgence. *Future Microbiol.* 2008,3(3):329-339.
2. Warfel JM, Zimmerman LI, Merkel TJ. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013.
3. Althouse BM, Scarpino SV. Asymptomatic transmission and the resurgence of *Bordetella pertussis*. *BMC Med.* 2015,13:146.
4. Gordon JE, Hood RI. Whooping cough and its epidemiological anomalies. *American journal of medical sciences.* 1951,222(3):333-361.
5. Mooi FR, van Loo IHM, van Gent M, He Q, Bart MJ, Heuvelman KJ, de Greeff SC, y col. *Bordetella pertussis* Strains with Increased Toxin Production Associated with Pertussis Resurgence. *Emerg Infect Dis.* 2009,15(8):1206-1213.
6. King AJ, van der Lee S, Mohangoo A, van Gent M, van der Ark A, van de Waterbeemd B. Genome-Wide Gene Expression Analysis of *Bordetella pertussis* Isolates Associated with a Resurgence in Pertussis: Elucidation of Factors Involved in the Increased Fitness of Epidemic Strains. *PLoS ONE.* 2013,8(6):e66150.
7. Mooi FR, van Loo IH, King AJ. Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: a cause for its reemergence? *Emerg Infect Dis.* 2001,7(3 Suppl):526-528.
8. Tan T, Trindade E, Skowronski D. Epidemiology of pertussis. *Pediatr Infect Dis J.* 2005,24(5 Suppl):S10-18.
9. Guris D, Strebel PM, Bardenheier B, Brennan M, Tachdjian R, Finch E, Wharton M, Livengood JR. Changing epidemiology of pertussis in the United States: increasing reported incidence among adolescents and adults, 1990-1996. *Clin Infect Dis.* 1999,28(6):1230-1237.
10. Sandora TJ, Gidengil CA, Lee GM. Pertussis vaccination for health care workers. *Clin Microbiol Rev.* 2008,21(3):426-434.
11. Cherry JD, Grimprel E, Guiso N, Heininger U, Mertsola J. Defining pertussis epidemiology: clinical, microbiologic and serologic perspectives. *Pediatr Infect Dis J.* 2005,24(5 Suppl):S25-34.
12. Forsyth K, Plotkin S, Tan T, Wirsing von König CH. Strategies to Decrease Pertussis Transmission to Infants. *Pediatrics.* 2015,135(6):e1475-e1482.
13. Fabricius G, Aispuro PM, Bergero P, Bottero D, Gabrielli M, Hozbor D. Pertussis epidemiology in Argentina: TRENDS after the introduction of maternal immunisation. *Epidemiology & Infection.* 2018:1-9.
14. Bisgard KM, Pascual FB, Ehresmann KR, Miller CA, Cianfrini C, Jennings CE, Rebmann CA, Gabel J, Schauer SL, Lett SM. Infant pertussis: who was the source? *Pediatr Infect Dis J.* 2004,23(11):985-989.
15. Clark TA. Changing Pertussis Epidemiology: Everything Old is New Again. *The Journal of Infectious Diseases.* 2014,209(7):978-981.
16. Robinson A, Irons L, Ashworth L. Pertussis vaccine: present status and future prospects. *Vaccine.* 1985,3(1):11-22.
17. Tuomanen E, Weiss A. Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory-epithelial cells. *J Infect Dis.* 1985,152(1):118-125.
18. Manclark CR, Burns D. Prospects for a new acellular pertussis vaccine. in *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie.* 1985. Elsevier.
19. Shahin RD, Brennan MJ, Li ZM, Meade BD, Manclark CR. Characterization of the protective capacity and immunogenicity of the 69-kD outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. *The Journal of Experimental Medicine.* 1990,171(1):63-73.

20. Leininger E, Roberts M, Kenimer JG, Charles IG, Fairweather N, Novotny P, Brennan MJ. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991,88(2):345-349.
21. Everest P, Li J, Douce G, Charles I, De Azavedo J, Chatfield S, Dougan G, Roberts M. Role of the *Bordetella pertussis* P.69/pertactin protein and the P.69/pertactin RGD motif in the adherence to and invasion of mammalian cells. *Microbiology*. 1996,142 (Pt 11):3261-3268.
22. van den Berg BM, Beekhuizen H, Willems RJ, Mooi FR, van Furth R. Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. *Infect Immun*. 1999,67(3):1056-1062.
23. Hellwig SM, Rodriguez ME, Berbers GA, van de Winkel JG, Mooi FR. Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity. *J Infect Dis*. 2003,188(5):738-742.
24. Lee S, Nguyen MT. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Netw*. 2015,15(2):51-57.
25. Warren H, Vogel F, Chedid L. Current status of immunological adjuvants. *Annu Rev Immunol*. 1986,4(1):369-388.
26. Vogel FR. Immunologic adjuvants for modern vaccine formulations. *Ann NY Acad Sci*. 1995,754(1):153-160.
27. Decker MD, Edwards KM, Steinhoff MC, Rennels MB, Pichichero ME, Englund JA, Anderson EL, y col. Comparison of 13 Acellular Pertussis Vaccines: Adverse Reactions. *Pediatrics*. 1995,96(3):557-566.
28. Greco D, Salmaso S, Mastrantonio P, Giuliano M, Tozzi AE, Anemona A, Ciofi degli Atti ML, y col. A Controlled Trial of Two Acellular Vaccines and One Whole-Cell Vaccine against Pertussis. *New Engl J Med*. 1996,334(6):341-349.
29. Chiappini E, Stival A, Galli L, De Martino M. Pertussis re-emergence in the post-vaccination era. *BMC Infect Dis*. 2013,13(1):151.
30. Octavia S, Maharjan RP, Sintchenko V, Stevenson G, Reeves PR, Gilbert GL, Lan R. Insight into Evolution of *Bordetella pertussis* from Comparative Genomic Analysis: Evidence of Vaccine-Driven Selection. *Mol Biol Evol*. 2011,28(1):707-715.
31. Bouchez V, Hegerle N, Strati F, Njamkepo E, Guiso N. New data on vaccine antigen deficient *Bordetella pertussis* isolates. *Vaccines*. 2015,3(3):751-770.
32. Mahon BP, Sheahan BJ, Griffin F, Murphy G, Mills KH. Atypical disease after *Bordetella pertussis* respiratory infection of mice with targeted disruptions of interferon-gamma receptor or immunoglobulin mu chain genes. *J Exp Med*. 1997,186(11):1843-1851.
33. Peppoloni S, Nencioni L, Di Tommaso A, Tagliabue A, Parronchi P, Romagnani S, Rappuoli R, De Magistris MT. Lymphokine secretion and cytotoxic activity of human CD4+ T-cell clones against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 1991,59(10):3768-3773.
34. Barbic J, Leef MF, Burns DL, Shahin RD. Role of gamma interferon in natural clearance of *Bordetella pertussis* infection. *Infect Immun*. 1997,65(12):4904-4908.
35. Silva M. Classical Labeling of Bacterial Pathogens According to Their Lifestyle in the Host: Inconsistencies and Alternatives. *Frontiers in Microbiology*. 2012,3(71).
36. Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovics ML, Harvill ET, Rodriguez ME. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun*. 2010,78(3):907-913.
37. Lamberti Y, Gorgojo J, Massillo C, Rodriguez ME. *Bordetella pertussis* entry into respiratory epithelial cells and intracellular survival. *Pathog Dis*. 2013,69(3):194-204.
38. Garzoni C, Kelley WL. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol*. 2009,17(2):59-65.

39. Medina E, Goldmann O, Toppel AW, Chhatwal GS. Survival of *Streptococcus pyogenes* within host phagocytic cells: a pathogenic mechanism for persistence and systemic invasion. *The Journal of infectious diseases*. 2003,187(4):597-603.
40. Bergmann S, Lang A, Rohde M, Agarwal V, Rennemeier C, Grashoff C, Preissner KT, Hammerschmidt S. Integrin-linked kinase is required for vitronectin-mediated internalization of *Streptococcus pneumoniae* by host cells. *J Cell Sci*. 2009,122(2):256-267.
41. Russell BH, Liu Q, Jenkins SA, Tuvim MJ, Dickey BF, Xu Y. *In vivo* demonstration and quantification of intracellular *Bacillus anthracis* in lung epithelial cells. *Infect Immun*. 2008,76(9):3975-3983.
42. Allen L. Intracellular niches for extracellular bacteria: lessons from *Helicobacter pylori*. *J Leukoc Biol*. 1999,66(5):753-756.
43. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*. 2010,8(1):26.
44. Lan R, Reeves PR. *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella*. *Microb Infect*. 2002,4(11):1125-1132.
45. Barnich N, Carvalho FA, Glasser A-L, Darcha C, Jantscheff P, Allez M, Peeters H, et al. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *The Journal of clinical investigation*. 2007,117(6):1566-1574.
46. Hunstad DA, Justice SS. Intracellular lifestyles and immune evasion strategies of uropathogenic *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol*. 2010,64:203-221.
47. Hellwig SM, Hazenbos WL, van de Winkel JG, Mooi FR. Evidence for an intracellular niche for *Bordetella pertussis* in broncho-alveolar lavage cells of mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999,26(3-4):203-207.
48. Ishibashi Y, Relman DA, Nishikawa A. Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and alpha5beta1 integrin. *Microb Pathog*. 2001,30(5):279-288.
49. Ewanowich CA, Melton AR, Weiss AA, Sherburne RK, Peppler MS. Invasion of HeLa 229 cells by virulent *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 1989,57(9):2698-2704.
50. Friedman RL, Nordensson K, Wilson L, Akporiaye ET, Yocum DE. Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun*. 1992,60(11):4578-4585.
51. Lamberti Y, Perez Vidakovics ML, van der Pol LW, Rodriguez ME. Cholesterol-rich domains are involved in *Bordetella pertussis* phagocytosis and intracellular survival in neutrophils. *Microb Pathog*. 2008,44(6):501-511.
52. Rodriguez ME, Hellwig SM, Hozbor DF, Leusen J, van der Pol WL, van de Winkel JG. Fc receptor-mediated immunity against *Bordetella pertussis*. *J Immunol*. 2001,167(11):6545-6551.
53. Eby JC, Gray MC, Hewlett EL. Cyclic AMP-mediated Suppression of Neutrophil Extracellular Trap Formation and Apoptosis by the *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin. *Infect Immun*. 2014:IAI. 02487-02414.
54. Vandebriel RJ, Hellwig SMM, Vermeulen JP, Hoekman JHG, Dormans JAMA, Roholl PJM, Mooi FR. Association of *Bordetella pertussis* with host immune cells in the mouse lung. *Microbial Pathogenesis*. 2003,35(1):19-29.
55. Hellwig SM, van Oirschot HF, Hazenbos WL, van Spruiel AB, Mooi FR, van De Winkel JG. Targeting to Fc gamma receptors, but not CR3 (CD11b/CD18), increases clearance of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis*. 2001,183(6):871-879.
56. Bromberg K, Tannis G, Steiner P. Detection of *Bordetella pertussis* associated with the alveolar macrophages of children with human immunodeficiency virus infection. *Infect Immun*. 1991,59(12):4715-4719.

57. Paddock CD, Sanden GN, Cherry JD, Gal AA, Langston C, Tatti KM, Wu KH, y col. Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin Infect Dis.* 2008,47(3):328-338.
58. Guidi-Rontani C. The alveolar macrophage: the Trojan horse of *Bacillus anthracis*. *Trends Microbiol.* 2002,10(9):405-409.
59. Cohen SB, Gern BH, Delahaye JL, Adams KN, Plumlee CR, Winkler JK, Sherman DR, y col. Alveolar Macrophages Provide an Early *Mycobacterium tuberculosis* Niche and Initiate Dissemination. *Cell Host & Microbe.* 2018,24(3):439-446.e434.
60. Mahan MJ, Douglas M. Heithoff, Robert L. Sinsheimer a, Low DA. Assesment of Bacterial Pathogenesis by Analysis of Gene Expression in the Host. *Annu Rev Genet.* 2000,34(1):139-164.
61. Lamontagne J, Forest A, Marazzo E, Denis F, Butler H, Michaud J-F, Boucher L, y col. Intracellular Adaptation of *Brucella abortus*. *Journal of Proteome Research.* 2009,8(3):1594-1609.
62. Shi L, Adkins JN, Coleman JR, Schepmoes AA, Dohnkova A, Mottaz HM, Norbeck AD, y col. Proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from RAW 264.7 macrophages identification of a novel protein that contributes to the replication of serovar Typhimurium inside macrophages. *J Biol Chem.* 2006,281(39):29131-29140.
63. Twine SM, Mykytczuk NC, Petit MD, Shen H, Sjöstedt A, Conlan JW, Kelly JF. *In vivo* proteomic analysis of the intracellular bacterial pathogen, *Francisella tularensis*, isolated from mouse spleen. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006,345(4):1621-1633.
64. Ogawa M, Renesto P, Azza S, Moinier D, Fourquet P, Gorvel JP, Raoult D. Proteome analysis of *Rickettsia felis* highlights the expression profile of intracellular bacteria. *Proteomics.* 2007,7(8):1232-1248.
65. Chatterjee SS, Hossain H, Otten S, Kuenne C, Kuchmina K, Machata S, Domann E, Chakraborty T, Hain T. Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 2006,74(2):1323-1338.
66. Li Q, Singh CR, Ma S, Price ND, Jagannath C. Label-free proteomics and systems biology analysis of mycobacterial phagosomes in dendritic cells and macrophages. *J Proteome Res.* 2011,10(5):2425-2439.
67. Kruh NA, Trout J, Izzo A, Prenni J, Dobos KM. Portrait of a pathogen: the *Mycobacterium tuberculosis* proteome *in vivo*. *PLoS ONE.* 2010,5(11):e13938.
68. Samoilis G, Aivaliotis M, Vranakis I, Papadioti A, Tselentis Y, Tsiotis G, Psaroulaki A. Proteomic screening for possible effector molecules secreted by the obligate intracellular pathogen *Coxiella burnetii*. *J Proteome Res.* 2010,9(3):1619-1626.
69. Coiras M, Camafeita E, Lopez-Huertas MR, Calvo E, Lopez JA, Alcami J. Application of proteomics technology for analyzing the interactions between host cells and intracellular infectious agents. *Proteomics.* 2008,8(4):852-873.
70. Ann M. Stock, Victoria L. Robinson a, Goudreau PN. Two-Component Signal Transduction. *Annu Rev Biochem.* 2000,69(1):183-215.
71. Perez JC, Groisman EA. Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* 2007,63(1):283-293.
72. Hyytiäinen H, Sjöblom S, Palomäki T, Tuikkala A, Tapio Palva E. The PmrA-PmrB two-component system responding to acidic pH and iron controls virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *Mol Microbiol.* 2003,50(3):795-807.
73. Wen Y, Feng J, Scott DR, Marcus EA, Sachs G. Involvement of the HP0165-HP0166 two-component system in expression of some acidic-pH-upregulated genes of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.* 2006,188(5):1750-1761.
74. Pflock M, Kennard S, Delany I, Scarlato V, Beier D. Acid-induced activation of the urease promoters is mediated directly by the ArsRS two-component system of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 2005,73(10):6437-6445.

75. Tang G, Wang S, Lu D, Huang L, Li N, Luo L. Two-component regulatory system ActS/ActR is required for *Sinorhizobium meliloti* adaptation to oxidative stress. *Microbiol Res.* 2017,198:1-7.
76. Prost LR, Daley ME, Le Sage V, Bader MW, Le Moual H, Klevit RE, Miller SI. Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic pH. *Mol Cell.* 2007,26(2):165-174.
77. Barchiesi J, Castelli ME, Di Venanzio G, Colombo MI, Vescovi EG. The PhoP/PhoQ system and its role in *Serratia marcescens* pathogenesis. *J Bacteriol.* 2012,194(11):2949-2961.
78. Monsieurs P, De Keersmaecker S, Navarre WW, Bader MW, De Smet F, McClelland M, Fang FC, y col. Comparison of the PhoPQ regulon in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Mol Evol.* 2005,60(4):462-474.
79. Altamirano-Silva P, Meza-Torres J, Castillo-Zeledón A, Ruiz-Villalobos N, Zuñiga-Pereira AM, Chacón-Díaz C, Moreno E, y col. *Brucella abortus* senses the intracellular environment through the two-component system BvrR/BvrS allowing the adaptation to its replicative niche. *Infect Immun.* 2018:IAI. 00713-00717.
80. Li L, Jia Y, Hou Q, Charles TC, Nester EW, Pan SQ. A global pH sensor: *Agrobacterium* sensor protein ChvG regulates acid-inducible genes on its two chromosomes and Ti plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2002,99(19):12369-12374.
81. Barakat M, Ortet P, Whitworth DE. P2CS: a database of prokaryotic two-component systems. *Nucleic Acids Res.* 2011,39(Database issue):D771-776.
82. Beier D, Gross R. The BvgS/BvgA phosphorelay system of pathogenic *Bordetellae*: structure, function and evolution. *Adv Exp Med Biol.* 2008,631:149-160.
83. Chen Q, Ng V, Warfel JM, Merkel TJ, Stibitz S. Activation of Bvg-repressed genes in *Bordetella pertussis* by RisA requires cross talk from noncooperonic histidine kinase RisK. *J Bacteriol.* 2017,199(22):e00475-00417.
84. Bone MA, Wilk AJ, Perault AI, Marlatt SA, Scheller EV, Anthouard R, Chen Q, y col. *Bordetella* PlrSR regulatory system controls BvgAS activity and virulence in the lower respiratory tract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017.
85. Leon-Sicairos N, Reyes-Cortés R, Guadrón-Llanos AM, Madueña-Molina J, Leon-Sicairos C, Canizalez-Román A. Strategies of intracellular pathogens for obtaining iron from the environment. *BioMed research international.* 2015,2015.
86. Skaar EP. The Battle for Iron between Bacterial Pathogens and Their Vertebrate Hosts. *PLoS Path.* 2010,6(8):e1000949.
87. Schalk IJ, Guillon L. Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways. *Amino Acids.* 2013,44(5):1267-1277.
88. Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007,71(3):413-451.
89. Brickman TJ, Suhadolc RJ, Armstrong SK. Interspecies variations in *Bordetella* catecholamine receptor gene regulation and function. *Infect Immun.* 2015,83(12):4639-4652.
90. Sandrini SM, Shergill R, Woodward J, Muralikuttan R, Haigh RD, Lyte M, Freestone PP. Elucidation of the mechanism by which catecholamine stress hormones liberate iron from the innate immune defense proteins transferrin and lactoferrin. *J Bacteriol.* 2010,192(2):587-594.
91. Armstrong SK, Brickman TJ, Suhadolc RJ. Involvement of multiple distinct *Bordetella* receptor proteins in the utilization of iron liberated from transferrin by host catecholamine stress hormones. *Mol Microbiol.* 2012,84(3):446-462.
92. Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang M, Sarma JV, Ward PA. Catecholamines-crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening Pandora's box? *Mol Med.* 2008,14(3-4):195-204.

93. Saura J, Nadal E, Van den Berg B, Vila M, Bombi J, Mahy N. Localization of monoamine oxidases in human peripheral tissues. *Life Sci.* 1996,59(16):1341-1349.
94. Lewinsohn R, Glover V, Sandler M. Development of benzylamine oxidase and monoamine oxidase A and B in man. *Biochem Pharmacol.* 1980,29(9):1221-1230.
95. Goldstein DS, Eisenhofer G, Kopin IJ. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003,305(3):800-811.
96. Cartron ML, Maddocks S, Gillingham P, Craven CJ, Andrews SC. Feo--transport of ferrous iron into bacteria. *BioMetals.* 2006,19(2):143-157.
97. Pérez NM, Ramakrishnan G. The reduced genome of the *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) encodes two iron acquisition systems essential for optimal growth and virulence. *PLoS ONE.* 2014,9(4):e93558.
98. Perry RD, Mier I, Fetherston JD. Roles of the Yfe and Feo transporters of *Yersinia pestis* in iron uptake and intracellular growth. *BioMetals.* 2007,20(3-4):699.
99. Runyen-Janecky L, Reeves S, Gonzales E, Payne S. Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, Iuc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition in vitro and in cultured cells. *Infect Immun.* 2003,71(4):1919-1928.
100. Robey M, Cianciotto NP. *Legionella pneumophila* feoAB promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. *Infect Immun.* 2002,70(10):5659-5669.
101. Naikare H, Palyada K, Panciera R, Marlow D, Stintzi A. Major role for FeoB in *Campylobacter jejuni* ferrous iron acquisition, gut colonization, and intracellular survival. *Infect Immun.* 2006,74(10):5433-5444.
102. Elhassanny AE, Anderson ES, Menscher EA, Roop RM, 2nd. The ferrous iron transporter FtrABCD is required for the virulence of *Brucella abortus* 2308 in mice. *Mol Microbiol.* 2013,88(6):1070-1082.
103. Brickman TJ, Armstrong SK. Iron and pH-responsive FtrABCD ferrous iron utilization system of *Bordetella* species. *Mol Microbiol.* 2012,86(3):580-593.
104. Vidakovics ML, Paba J, Lamberti Y, Ricart CA, de Sousa MV, Rodriguez ME. Profiling the *Bordetella pertussis* proteome during iron starvation. *J Proteome Res.* 2007,6(7):2518-2528.
105. Huynh KK, Grinstein S. Regulation of vacuolar pH and its modulation by some microbial species. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007,71(3):452-462.
106. Vanderpool CK, Armstrong SK. The *Bordetella* bhu locus is required for heme iron utilization. *J Bacteriol.* 2001,183(14):4278-4287.
107. Vanderpool CK, Armstrong SK. Integration of environmental signals controls expression of *Bordetella* heme utilization genes. *J Bacteriol.* 2004,186(4):938-948.
108. Vanderpool CK, Armstrong SK. Heme-responsive transcriptional activation of *Bordetella* bhu genes. *J Bacteriol.* 2003,185(3):909-917.
109. Ponka P. Cell biology of heme. *Am J Med Sci.* 1999,318(4):241-256.
110. Paulley JT, Anderson ES, Roop RM, 2nd. *Brucella abortus* requires the heme transporter BhuA for maintenance of chronic infection in BALB/c mice. *Infect Immun.* 2007,75(11):5248-5254.
111. Reigstad CS, Hultgren SJ, Gordon JI. Functional genomic studies of uropathogenic *Escherichia coli* and host urothelial cells when intracellular bacterial communities are assembled. *J Biol Chem.* 2007,282(29):21259-21267.
112. Hvidberg V, Maniecki MB, Jacobsen C, Hojrup P, Moller HJ, Moestrup SK. Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood.* 2005,106(7):2572-2579.
113. Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Biochem.* 2002,91(1):9-18.
114. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature.* 2001,409(6817):198-201.

115. Vogel DYS, Glim JE, Stavenuiter AWD, Breur M, Heijnen P, Amor S, Dijkstra CD, Beelen RHJ. Human macrophage polarization *in vitro*: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology*. 2014,219(9):695-703.
116. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012,122(3):787-795.
117. Takahashi H, Hatta Y, Iriyama N, Hasegawa Y, Uchida H, Nakagawa M, Makishima M, Takeuchi J, Takei M. Induced differentiation of human myeloid leukemia cells into M2 macrophages by combined treatment with retinoic acid and 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3. *PLoS ONE*. 2014,9(11):e113722.
118. Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*. 2015,15:577.
119. Spiller KL, Wrona EA, Romero-Torres S, Pallotta I, Graney PL, Witherel CE, Panicker LM, y col. Differential gene expression in human, murine, and cell line-derived macrophages upon polarization. *Exp Cell Res*. 2016,347(1):1-13.
120. Valdez HA, Oviedo JM, Gorgojo JP, Lamberti Y, Rodriguez ME. *Bordetella pertussis* modulates human macrophage defense gene expression. *Pathog Dis*. 2016,74(6).
121. Roset M, Alefantis T, DeVecchio V, Briones G. Iron-dependent reconfiguration of the proteome underlies the intracellular lifestyle of *Brucella abortus*. *Scientific reports*. 2017,7(1):10637.
122. Liu Y, Zhang Q, Hu M, Yu K, Fu J, Zhou F, Liu X. Proteomic analyses of intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveal extensive bacterial adaptations to infected host epithelial cells. *Infect Immun*. 2015,83(7):2897-2906.
123. Pieper R, Fisher C, Suh M-J, Huang S-T, Parmar P, Payne S. Analysis of the proteome of intracellular *Shigella flexneri* reveals pathways important for intracellular growth. *Infect Immun*. 2013,81(12):4635-4648.
124. Ernst RK, Guina T, Miller SI. How Intracellular Bacteria Survive: Surface Modifications That Promote Resistance to Host Innate Immune Responses. *The Journal of Infectious Diseases*. 1999,179(Supplement_2):S326-S330.
125. Hassett DJ, Cohen MS. Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells. *FASEB J*. 1989,3(14):2574-2582.
126. Njamkepo E, Pinot F, Francois D, Guiso N, Polla BS, Bachelet M. Adaptive responses of human monocytes infected by *Bordetella pertussis*: the role of adenylate cyclase hemolysin. *J Cell Physiol*. 2000,183(1):91-99.
127. Pearson RD, Symes P, Conboy M, Weiss AA, Hewlett EL. Inhibition of monocyte oxidative responses by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J Immunol*. 1987,139(8):2749-2754.
128. Cerny O, Kamanova J, Masin J, Bibova I, Skopova K, Sebo P. *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin Blocks Induction of Bactericidal Nitric Oxide in Macrophages through cAMP-Dependent Activation of the SHP-1 Phosphatase. *J Immunol*. 2015,194(10):4901-4913.
129. Nicolas P, Mor A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annu Rev Microbiol*. 1995,49:277-304.
130. Melo MN, Ferre R, Castanho MA. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat Rev Microbiol*. 2009,7(3):245-250.
131. Chen HD, Groisman EA. The biology of the PmrA/PmrB two-component system: the major regulator of lipopolysaccharide modifications. *Annu Rev Microbiol*. 2013,67:83-112.
132. Taneja NK, Ganguly T, Bakaletz LO, Nelson KJ, Dubey P, Poole LB, Deora R. D-alanine modification of a protease-susceptible outer membrane component by the *Bordetella pertussis* dra locus promotes resistance to antimicrobial peptides and polymorphonuclear leukocyte-mediated killing. *J Bacteriol*. 2013,195(22):5102-5111.

133. Shah NR, Hancock RE, Fernandez RC. *Bordetella pertussis* lipid A glucosamine modification confers resistance to cationic antimicrobial peptides and increases resistance to outer membrane perturbation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014,58(8):4931-4934.
134. Cederlund A, Gudmundsson GH, Agerberth B. Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J.* 2011,278(20):3942-3951.
135. Fernandez RC, Weiss AA. Susceptibilities of *Bordetella pertussis* strains to antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996,40(4):1041-1043.
136. Noofeli M, Bokhari H, Blackburn P, Roberts M, Coote JG, Parton R. BapC autotransporter protein is a virulence determinant of *Bordetella pertussis*. *Microb Pathog.* 2011,51(3):169-177.
137. Belon C, Blanc-Potard AB. Intramacrophage Survival for Extracellular Bacterial Pathogens: MgtC As a Key Adaptive Factor. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016,6:52.
138. Lee EJ, Pontes MH, Groisman EA. A bacterial virulence protein promotes pathogenicity by inhibiting the bacterium's own F₁F_o ATP synthase. *Cell.* 2013,154(1):146-156.
139. Alix E, Blanc-Potard AB. MgtC: a key player in intramacrophage survival. *Trends Microbiol.* 2007,15(6):252-256.
140. Johnson NF. Phagosomal pH and glass fiber dissolution in cultured nasal epithelial cells and alveolar macrophages: a preliminary study. *Environ Health Perspect.* 1994,102(Suppl 5):97-102.
141. Blanc-Potard AB, Lafay B. MgtC as a horizontally-acquired virulence factor of intracellular bacterial pathogens: evidence from molecular phylogeny and comparative genomics. *J Mol Evol.* 2003,57(4):479-486.
142. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MT, y col. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet.* 2003,35(1):32-40.
143. Gorgojo J, Harvill ET, Rodríguez ME. *Bordetella parapertussis* survives inside human macrophages in lipid raft-enriched phagosomes. *Infect Immun.* 2014,82(12):5175-5184.
144. Gorgojo J, Lamberti Y, Valdez H, Harvill ET, Rodríguez ME. *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.* 2012:IAI. 00662-00612.
145. Tomita A, Zhang M, Jin F, Zhuang W, Takeda H, Maruyama T, Osawa M, y col. ATP-dependent modulation of MgtE in Mg⁽²⁺⁾ homeostasis. *Nat Commun.* 2017,8(1):148.
146. Anderson GG, Yahr TL, Lovewell RR, O'Toole GA. The *Pseudomonas aeruginosa* magnesium transporter MgtE inhibits transcription of the type III secretion system. *Infect Immun.* 2010,78(3):1239-1249.
147. Merino S, Gavin R, Altarriba M, Izquierdo L, Maguire ME, Tomas JM. The MgtE Mg²⁺ transport protein is involved in *Aeromonas hydrophila* adherence. *FEMS Microbiol Lett.* 2001,198(2):189-195.
148. Carbonetti N. Pertussis: current problems, challenges and investigations of a re-emerging disease. *Pathogens and disease.* 2015,73(8):ftv090-ftv090.
149. Hozbor D, Mooi F, Flores D, Weltman G, Bottero D, Fossati S, Lara C, y col. Pertussis epidemiology in Argentina: trends over 2004-2007. *J Infect.* 2009,59(4):225-231.
150. Romanin V, Agostinho V, Califano G, Sagradini S, Aquino A, Juarez Mdel V, Antman J, y col. Epidemiological situation of pertussis and strategies to control it: Argentina, 2002-2011. *Arch Argent Pediatr.* 2014,112(5):413-420.