



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

Tesis Doctoral

Estudio de la interacción de *Bordetella pertussis* con  
células del hospedador. Mecanismos de  
inmunoevasión y persistencia intracelular

YANINA ANDREA LAMBERTI

MARIA EUGENIA RODRIGUEZ  
DIRECTOR

2010



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



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

**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". Microbial pathogenesis. 2008 Jun;44(6):501-511.

**Lamberti Y**, Hayes JA, Perez Vidakovics ML, Rodriguez ME. "Cholesterol-dependent attachment of human respiratory cells by *Bordetella pertussis*" 2009 Jul;56(2):143-150.

**Lamberti Y**, Hayes JA, Perez Vidakovics ML, Harvill ET, Rodriguez ME. "Intracellular Trafficking of *Bordetella pertussis* in Human Macrophages". 2010 Mar;78(3): 907-913.



*A Mauri y Joa*

*A mis papás, Guadalupe y Ricardo*





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

## AGRADECIMIENTOS

Me es sumamente grato llegar a escribir por fin los agradecimientos, los dejé para lo último, pero he pensado en ellos a lo largo de toda la escritura de esta Tesis. Un cierto grado de emoción siento al escribirlos lo que de alguna manera se traduce en que durante estos cinco años de Beca una gran cantidad de personas aportaron tanto a nivel laboral como personal a que llegue a esta instancia final. Al pensarlos no puedo evitar recordar momentos y situaciones personales que me ocurrieron en estos años, las cuales seguramente han influido en mi quehacer diario. Así que bueno, aquí van mis sinceros y sentidos agradecimientos:

A la Dra. Eugenia Rodriguez, mi directora de Tesis, gracias infinitas por tu apoyo y confianza durante todo este período. Gracias por permitirme trabajar con libertad estando a la vez fuertemente comprometida con mi trabajo, siguiendo cada uno de mis pasos, siempre dispuesta a discutir ideas, experimentos, y enseñarme y ayudarme a realizarlos. He aprendido muchísimo de vos, y aun me queda mucho por aprender. Gracias por acompañarme no sólo en lo laboral sino en lo personal, en situaciones gratas y no tan gratas, siempre he sentido tu apoyo y compañía.

Quiero también agradecer a mis compañeros de laboratorio, quiénes hacen que el trabajo diario sea sumamente grato y placentero:

A Osvaldo y Alejandra, por compartir charlas e inquietudes, por su compañía los viernes a la noche en el CINDEFI y por los ricos asados organizados en su casa.

A Julio, alias "Julis", gracias por darme tantas manos en el laboratorio, sin tu ayuda todo hubiera sido más difícil y laborioso. Gracias por tu amistad, por tus exquisitos mates y por tu confianza.

A Clau, con quien no sólo he compartido la mesa de trabajo sino varios años de docencia. Gracias por tu buena onda y tu compromiso con la tarea de enseñar.

A Lau, Diego y Ale por haberme ayudado durante mis primeros pasos en el laboratorio. Por alentarme en momentos de frustración y por su predisposición para colaborar y discutir ideas y experiencias.

A Jime, gracias amiga por tu amistad, tu compañía y las charlas sinceras. Gracias también por tu esfuerzo para poner a punto las técnicas de biología molecular, que tanto aportaron al grupo.

A Pablo, Chicho, Ale y Diego (Cacho), por compartir horarios poco comunes de trabajo en el Lab, por los mates y la buena selección de música (en el caso de Pablo) que distendían el trabajo durante esas jornadas. A Lau, Barbi, Natalia, Constanza por su buena onda y predisposición. A Juan, por formar parte de este proyecto.

A mis compañeros de box, Bibi, Diego y Clau, gracias por permitirme concentrarme en esta última etapa, por las galletitas, los mates y su grata compañía.

A la gente del Cindefi, gracias por salvarme tantas veces con reactivos y por crear un clima de trabajo tan agradable.

Al Director del Cindefi, el Dr. Edgardo Donati, por permitirme trabajar y realizar el doctorado en este Instituto.

También quiero agradecer a aquellas personas que, generosamente, me posibilitaron el uso de equipos con los que no contábamos en nuestro Instituto, sin los cuales me hubiera sido muy difícil llevar a cabo los estudios que se presentan en esta Tesis:

Al Dr. Pablo Perez por permitirme usar el microscopio de fluorescencia con el que realicé mis primeros estudios de adhesión a células epiteliales. Gracias también por cedernos una gran cantidad de reactivos que aportaron a la realización de varios de los estudios que aparecen en esta Tesis.

Al Dr. Goya y Gustavo Morel, por permitirme utilizar el único microscopio de fluorescencia con más de un canal que existía en La Plata en ese momento. Sin conocernos se mostraron dispuestos a que lo use, durante largas horas, permitiéndome avanzar en mis estudios de interacción de *B. pertussis* con los neutrófilos.

Al Dr Lozano, en su momento Director del Biológico de La Plata, y a la gente de la sección de seguimiento de pacientes con HIV, por abrirme las puertas para usar el citómetro de flujo, sin su ayuda tampoco hubiera podido realizar muchos de los estudios que se presentan en esta Tesis.

Al Dr. Walter Berón y a Milton Aguilera, por permitirme realizar una pasantía en el Instituto de Histología y Embriología (IHEM)-CONICET donde aprendí mis primeras lecciones relacionadas con el uso del microscopio confocal. Gracias por la generosidad con que me recibieron y gracias a Lore por alojarme en su casa.

Al Instituto de Hemoterapia, y en particular a los técnicos Jorge, Osvaldo y Adrián, por su predisposición para tratar de conseguirme sangre de donantes, sin la cual me hubiera sido imposible realizar los ensayos con macrófagos humanos.

A la gran cantidad de donantes voluntarios que me donaron sangre para el aislamiento de neutrófilos. Gracias Diego, Lau, Jime, Flavia, Juan, Tati, Mauri, Euge, Andre, José, Tato, Augusto, Daniela y otros tantos más. Gracias Ramón por tus manos habilidosas para realizar las extracciones.

Quiero agradecer también al Centro de Ingeniería Genética y Biotecnológica de La Habana por permitirme realizar una estadía de dos meses en el Departamento de Vacunas, donde aprendí técnicas de Biología Molecular.

A Diógenes Quintana Vazquez quién me ayudó con el clonado de Pertactina, gracias por tu paciencia, generosidad para transmitir los conocimientos y por las hermosas charlas y momentos que compartimos. A Tamara, Juan, Yoelys, y Edelgis gracias por haber hecho que esa estadía valga tanto la pena.

Un agradecimiento especial a mi familia y amigos, por su apoyo y contención en cada uno de los momentos de mi vida:

A mi mamá, Guadalupe, y mi papá, Ricardo, dos personas maravillosas a las cuales debo mucho de lo que soy. Gracias por acompañarme en cada etapa de mi vida de forma incondicional, apoyando cada una de mis decisiones, equivocadas o no, por estar siempre ahí, gracias por tanto amor. Los quiero mucho!

A mi hermano Ricardo, gracias por ayudarme durante mis primeros años en La Plata, sin vos me hubiera sido prácticamente imposible adaptarme a vivir acá. Gracias también por las hermosas sobrinas que me diste.

A mis tías Ana, Lita y Mary, gracias por estar siempre presentes y dispuestas a darme una mano.

A mis primas Diana y Virginia, por la infancia compartida y los lindos momentos vividos.

A mis abuelos, que ya no están, pero que han dejado una huella inmensa en mí, gracias!

A Mauri, mi amor y compañero. Gracias por el día a día, por tantos momentos compartidos, buenos, malos, cualquier momento es más ameno si estoy a tu lado. Por compartir ideales y formas de ver la vida. Gracias por tu apoyo y confianza estos años, por bancarme mis crisis y por el hermoso hijo que tenemos.

A Joa, mi chiquito lindo, gracias hijo por haber aparecido en mi vida y por tanta emoción diaria. Es un placer verte crecer y me llena de felicidad ser tu mamá. Gracias por entender, aun con tu corta edad, mis a veces largas jornadas laborales.

A mis suegros, Chabela y Federico, por ser tan buena gente, por las charlas, por su apoyo en cada uno de nuestros proyectos y sobre todo, por haber criado tan bien a su hijo!!

A Juan, Esteban y Marita, mis cuñados y mi cuñada, cada uno especial a su manera, pero realmente especiales. Gracias por formar parte de mi vida!

Aprovecho para agradecer especialmente a mi mamá, a Juan, a Chabe y a mi tía Ana, por haber cuidado a Joa cuando se enfermaba o no había jardín, gracias por todo lo que eso significaba, viajar, dormir en otra cama, adaptarse a otro ritmo, etc., y sin embargo, siempre han estado predispuestos. Han sido de una ayuda enorme!!!

A mis amigas de Mar del Plata, por estar siempre ahí, a pesar de la distancia.

A Marce, Oriana, Enri, Male, Julia y Agus, por su amistad y apoyo, con quienes compartí los primeros años de estudiante en La Plata, sin ustedes todo hubiera sido más complicado.

A Tati y Espe, a quienes considero como de la familia, y a Santiago! que para el momento que defienda la Tesis ya habrá nacido, gracias por su amistad!

A Augusto, Tato, Leandro, Cristina, Euge, Jime, Lucas, Mauri y otros tantos otros con los que he compartido charlas respecto al quehacer del investigador y su rol en la sociedad. Con quienes he soñado con cambiar las cosas, gracias!!



## Lista de Abreviaturas

---

|                  |  |
|------------------|--|
| ABGs             | Agar Bordet-Gengou sangre  |
| ACT              | Toxina adenilato ciclasa   |
| ANOVA            | Análisis de varianza   |
| AMPc             | AMP ciclico  |
| BCR              | Receptores de la célula B  |
| BrkA             | Factor de resistencia a complemento  |
| BSA              | Albúmina bovina  |
| Bvg              | Sistema de dos componentes (BvgA, BvgS) de <i>Bordetella</i>                                       |
| Bvg-             | Fase avirulenta  |
| Bvg+             | Fase virulenta   |
| BvgA             | Activador transcripcional de los genes de virulencia de <i>Bordetella</i>                          |
| Bvg <sup>i</sup> | Fase intermedia  |
| BvgR             | Represor de los genes de virulencia de <i>Bordetella</i>   |
| BvgS             | Sensor de los genes de virulencia de <i>Bordetella</i>   |
| CDC              | Centers for Disease Control and Prevention   |
| CRD              | Dominio de interacción con carbohidratos   |
| CR3              | Receptor de complemento 3  |
| CY3              | Cianina 3  |
| DAEC             | <i>Escherichia coli</i> Afa/Dr positiva  |
| DE               | Desviación Estándar  |
| DIMs             | Membranas insolubles en detergentes  |
| DMEM             | Medio simple modificado de Dulbecco  |
| DMEM-BSA         | DMEM suplementado con BSA al 0.2 % p/v   |
| DMEM-BSA-L       | DMEM suplementado con BSA (0,2 % p/v) y lovastatina (5 µg/ml) (                                    |
| DNT              | Toxina dermonecrótica  |
| DRMs             | Membranas resistentes a detergentes  |
| DTPa             | Vacuna acelular compuesta por antígenos purificados (Difteria, Tetano, Pertussis acelular)         |
| DTPc             | Vacuna formulado con toxoide difterico y tetanico, y células de <i>B. pertussis</i> detoxificadas. |
| ELISA            | Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima  |
| EPEC             | <i>Escherichia coli</i> enteropatógena   |
| FcR              | Receptor Fc  |
| FHA              | Hemaglutinina filamentosa  |
| Fim              | Fimbria  |
| FITC             | isotiocianato de fluoresceína  |
| GFP              | Proteína de fluorescencia verde  |
| GPI              | Glicosilfosfatidilinositol   |
| GPL              | Glicerofosfolípidos  |
| GSL              | Glicoesfingolípidos  |
| INF              | Interferón   |
| IPTG             | Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido   |
| IRO              | Intermediarios reactivos del oxígeno   |
| LAMP             | Proteína lisosomal asociada a membrana   |
| LB               | Luria Bertani  |
| Lc               | Líquido cristalina   |
| Lf               | Límite de floculación  |
| L <sub>o</sub>   | Líquido ordenada   |
| LPS              | Lipopolisacárido   |
| LRI/IAP          | Integrina de respuesta a leucocitos/proteína asociada a integrina                                  |
| LSD              | Prueba de la menor diferencia significativa  |

|                    |  |
|--------------------|--|
| mAc                | Anticuerpo monoclonal  |
| M $\beta$ CD       | Metil- $\beta$ -ciclodextrina  |
| MgSO <sub>4</sub>  | Sulfato de magnesio  |
| NK                 | Células natural killer   |
| NPHI               | National Public Health Institute   |
| OMS                | Organizacion Mundial de la Salud   |
| pAc                | Anticuerpo policlonal  |
| PBMCs              | Células mononucleares de sangre periférica   |
| PBS                | Buffer fosfato salino  |
| PBS-L              | PBS-Leche descremada   |
| PBS-LT             | PBS-Leche suplementada con 0.05 % v/v Tween 20   |
| PBS-T              | PBS-0.05 % v/v Tween 20  |
| PC                 | Fosfatidilcolina   |
| PCR                | Reacción en cadena de la polimerasa  |
| PE                 | Ficoeritrina   |
| Pen/Strep          | Penicilina/streptomina   |
| PFA                | Paraformaldehído   |
| PI3K               | Fosfatidil inositol 3 kinasa   |
| PKC                | Proteína kinasa C  |
| PLC                | Fosfolipasa C  |
| PMN                | Leucocitos polimorfonucleares  |
| PMSF               | Phenylmethylsulfonyl fluoride  |
| Prn                | Pertactina   |
| PT                 | Toxina pertussis   |
| PVDF               | Membranas de poli-fluoruro de vinilideno   |
| RGD                | Arginina-glicina-ácido aspártico   |
| R <sub>i</sub> b/c | Número inicial de bacterias por célula   |
| SDS-PAGE           | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio   |
| SFB                | Suero fetal bovino   |
| SH                 | Suero humano inactivado por calor  |
| SM                 | Esfingomielina   |
| SP-A               | Proteína surfactante A   |
| SS                 | Stainer-Scholte medio liquido  |
| SSTT               | Sistema de secreción tipo III  |
| TcfA               | Factor de colonización traqueal  |
| TCR                | Receptores de la célula T  |
| TCT                | Citotoxina tranqueal   |
| Tdpa               | Vacunas acelular de refuerzo que presentan en su formulación cantidades menores de Toxoide diftérico y de antígeno pertussis |
| TLR4               | Toll like receptor-4   |
| TMP-SMZ            | Trimetoprim-Sulfametoxazol   |
| UFC                | Unidades formadoras de colonias  |
| <i>Vag</i>         | Genes activados en virulencia  |
| VLA-5              | Very late antigen 5  |
| <i>Vrg</i>         | Genes reprimidos en virulencia   |



## INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Introducción General</b> .....   | <b>3</b>  |
| 1.1 Tos convulsa .....   | 3         |
| 1.2. Epidemiología .....   | 4         |
| 1.3. Cuadro clínico .....  | 6         |
| 1.3.1. Manifestaciones típicas .....   | 6         |
| 1.3.2. Manifestaciones atípicas .....  | 7         |
| 1.4. Vacunación y tratamiento .....  | 8         |
| 1.4.1. Estrategias de vacunación actuales .....  | 8         |
| 1.4.2. Tratamiento .....   | 9         |
| 1.5. <i>B. pertussis</i> : Factores y fases de virulencia .....  | 10        |
| 1.5.1. Factores de virulencia regulados por el sistema BVG .....   | 13        |
| 1.5.1.1. Hemaglutinina Filamentosa (FHA) .....   | 13        |
| 1.5.1.2. Fimbrias (Fim) .....  | 15        |
| 1.5.1.3. Pertactina (Prn) y otros Autotransportadores .....  | 16        |
| 1.5.1.4. Toxina Adenilato Ciclasa (ACT) .....  | 16        |
| 1.5.1.5. Toxina Dermonecrótica (DNT) .....   | 17        |
| 1.5.1.6. Toxina Pertussis (PT) .....   | 18        |
| 1.5.2. Factores de virulencia no regulados por el sistema Bvg .....  | 19        |
| 1.5.2.1. Citotoxina Tranqueal (TCT) .....  | 19        |
| 1.5.2.2. Lipopolisacarido (LPS) .....  | 19        |
| 1.6. Patogénesis .....   | 20        |
| 1.7. Inmunidad: Rol de la respuesta humoral y celular .....  | 22        |
| 1.8. Rafts lipídicos y su relación con las infecciones bacterianas .....   | 27        |
| 1.8.1. Rafts lipídicos .....   | 27        |
| 1.8.2. Análisis de rafts lipídicos en las membranas celulares: Técnicas bioquímicas y morfológicas .....                               | 30        |
| 1.8.3. Rafts lipídicos y señalización intracelular .....   | 32        |
| 1.8.4. Interacción de dominios rafts con microorganismos .....   | 33        |
| 1.8.5. Rafts lipídicos: sitios de entrada y evasión inmune .....   | 34        |
| 1.9. Antecedentes y objetivos de este trabajo .....  | 37        |
| Referencias .....  | 39        |
| <br>   |           |
| <b>2. Dominios ricos en colesterol participan en la interacción de <i>B. pertussis</i> con células del epitelio respiratorio</b> ..... | <b>57</b> |
| 2.1. Introducción .....  | 57        |
| 2. 2. Materiales y métodos .....   | 59        |
| 2.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento .....  | 59        |
| 2.2.2. Células y condiciones de cultivo .....  | 59        |
| 2.2.3. Anticuerpos y sueros .....  | 60        |
| 2.2.4. Tratamiento de células A549 con drogas que afectan el colesterol de membrana .....  | 60        |
| 2.2.5. Ensayos de adhesión .....   | 61        |
| 2.2.6. Ensayos de unión a colesterol .....   | 62        |
| 2.2.7. Fraccionamiento celular y aislamiento de membranas resistentes a detergentes (DRMs) .....                                       | 63        |
| 2.2.8. Análisis de las fracciones obtenidas en gradientes de sacarosa .....  | 64        |

|  |    |
|--|----|
| 2.2.9. Microscopía confocal.....   | 64 |
| 2.2.10. Análisis estadístico.....  | 65 |
| 2.3. Resultados.....   | 67 |
| 2.3.1. El colesterol de membrana está involucrado en la adhesión de <i>B. pertussis</i> a células del epitelio respiratorio..... | 67 |
| 2.3.2. La reposición del colesterol de membrana restaura la adhesión de <i>B. pertussis</i> .....                                | 69 |
| 2.3.3. Los raft lipídicos están involucrados en la interacción de <i>B. pertussis</i> con células epiteliales.....               | 70 |
| 2.3.4. FHA está involucrada en la interacción de <i>B. pertussis</i> con los rafts lipídicos.....                                | 72 |
| 2.3.5. <i>B. pertussis</i> es capaz de unir colesterol.....  | 74 |
| 2.3.6. Los dominios rafts también funcionan como sitios de anclaje de <i>B. pertussis</i> en fase avirulenta.....                | 76 |
| 2.4. Discusión.....  | 79 |
| 2.5. Conclusiones.....   | 85 |
| Referencias.....   | 87 |

### **3. *B. pertussis* ingresa a las células epiteliales a través de mecanismos dependientes de colesterol..... 93**

|   |     |
|---|-----|
| 3.1. Introducción.....  | 93  |
| 3.2. Materiales y métodos.....  | 95  |
| 3.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....  | 95  |
| 3.2.2. Células y condiciones de cultivo.....  | 95  |
| 3.2.3. Extracción del colesterol de membrana.....   | 95  |
| 3.2.4. Ensayos de sobrevivida.....  | 96  |
| 3.2.5. Ensayos de inhibición.....   | 97  |
| 3.2.6. Cuantificación de bacterias internalizadas mediante microscopía de fluorescencia.....                  | 97  |
| 3.2.7. Microscopía electrónica de barrido.....  | 98  |
| 3.2.8. Microscopía confocal.....  | 98  |
| 3.2.9. Análisis estadístico.....  | 99  |
| 3.3. Resultados.....  | 101 |
| 3.3.1. Optimización de los niveles de invasión.....   | 101 |
| 3.3.2. Caracterización de la entrada de <i>B. pertussis</i> a la célula epitelial.....                        | 102 |
| 3.3.2.1. Análisis a nivel ultraestructural de la interacción de <i>B. pertussis</i> con células A549.....     | 102 |
| 3.3.2.2. Rol del citoesqueleto en la entrada de <i>B. pertussis</i> a la célula epitelial.....                | 103 |
| 3.3.2.3. Los rafts lipídicos participan en la entrada de <i>B. pertussis</i> a la célula epitelial.....       | 105 |
| 3.3.2.4. <i>B. pertussis</i> ingresa a la célula epitelial en un proceso dependiente de tirosin-quinasas..... | 105 |
| 3.3.3. <i>B. pertussis</i> es capaz de sobrevivir en células epiteliales A549.....                            | 106 |
| 3.3.4. Calu-6 es una línea celular más permisiva para <i>B. pertussis</i> .....                               | 108 |
| 3.4. Discusión.....   | 111 |
| 3.5. Conclusiones.....  | 115 |
| Referencias.....  | 117 |

### **4. La sobrevivida de *B. pertussis* a la acción bactericida de neutrófilos humanos depende de su interacción con dominios rafts. .... 123**

|  |     |
|--|-----|
| 4.1. Introducción.....                                     | 123 |
| 4.2. Materiales y métodos.....                             | 127 |
| 4.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento..... | 127 |
| 4.2.2. Anticuerpos y sueros.....                           | 127 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.2.3. Expresión de receptores .....   | 128 |
| 4.2.4. Células .....   | 128 |
| 4.2.5. Tratamiento de neutrófilos con drogas que afectan el colesterol de membrana.....  | 128 |
| 4.2.6. Cuantificación de la adhesión .....   | 129 |
| 4.2.7. Cuantificación de la fagocitosis .....  | 129 |
| 4.2.8. Exocitosis de la enzima lisosomal $\beta$ -glucuronidasa .....  | 130 |
| 4.2.9. Determinación de la sobrevida intracelular.....   | 130 |
| 4.2.10. Microscopía confocal.....  | 132 |
| 4.2.11. Estudios de adquisición de transferrina humana .....   | 132 |
| 4.2.12. Análisis estadístico.....  | 133 |
| 4.3. Resultados .....  | 135 |
| 4.3.1. En ausencia de anticuerpos opsonizantes los dominios ricos en colesterol presentes en la membrana del neutrófilo intervienen en la captura y fagocitosis de <i>B. pertussis</i> ..... | 135 |
| 4.3.2. En ausencia de anticuerpos <i>B. pertussis</i> inhibe su tráfico a lisosomas en un proceso dependiente de colesterol.....   | 141 |
| 4.3.3. <i>B. pertussis</i> permanece en compartimientos que tienen acceso a endosomas tempranos .....  | 145 |
| 4.3.4. La entrada a través de dominios ricos en colesterol determina que <i>B. pertussis</i> sobreviva a la interacción con los neutrófilos .....  | 146 |
| 4.4. Discusión .....   | 147 |
| 4.5. Conclusiones.....   | 151 |
| Referencias.....   | 153 |

**5. *B. pertussis* es capaz de duplicarse en macrófagos humanos lo que la convierte en un patógeno intracelular facultativo y a éste tipo celular en un posible nicho de persistencia..... 159**

|  |     |
|--|-----|
| 5.1. Introducción .....  | 159 |
| 5.2. Materiales y métodos .....  | 161 |
| 5.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo .....  | 161 |
| 5.2.2. Anticuerpos y sueros.....   | 161 |
| 5.2.3. Citometría de flujo .....   | 161 |
| 5.2.4. Aislamiento de macrófagos.....  | 162 |
| 5.2.5. Ensayos de infección.....   | 162 |
| 5.2.6. Cuantificación de la fagocitosis .....  | 163 |
| 5.2.7. Microscopía confocal.....   | 164 |
| 5.2.8. Estudios de adquisición de transferrina humana .....  | 165 |
| 5.2.9. Microscopía electrónica de transmisión.....   | 165 |
| 5.2.10. Análisis estadístico.....  | 166 |
| 5.3. Resultados .....  | 167 |
| 5.3.1. Estudio de la sobrevida de <i>B. pertussis</i> en macrófagos humanos .....                            | 167 |
| 5.3.2. Tráfico intracelular de <i>B. pertussis</i> .....   | 172 |
| 5.3.3. Acceso de <i>B. pertussis</i> a endosomas de reciclaje.....   | 176 |
| 5.3.4. Efecto del INF- $\gamma$ en la sobrevida de <i>B. pertussis</i> en el macrófago.....                  | 177 |
| 5.3.5. Rol de la toxina adenilato ciclasa en la sobrevida de <i>B. pertussis</i> en macrófagos humanos ..... | 179 |
| 5.4. Discusión .....   | 183 |
| 5.5. Conclusiones.....   | 189 |
| Referencias.....   | 191 |

**6. Discusión General..... 197**

|   |            |
|---|------------|
| Referencias.....  | 207        |
| <b>Anexo .....</b>  | <b>213</b> |
| <b>Protección cruzada entre las variantes antigénicas de pertactina .....</b>   | <b>213</b> |
| 1. Introducción .....   | 213        |
| 2. Materiales y métodos .....   | 215        |
| 2.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo .....  | 215        |
| 2.2. Obtención de Prn1 y Prn2 recombinante .....  | 215        |
| 2.3. Muestras de suero .....  | 216        |
| 2.4. ELISA .....  | 217        |
| 2.5. Obtención de neutrófilos.....  | 218        |
| 2.6. Actividad opsonofagocítica.....  | 218        |
| 2.7. Análisis estadístico.....  | 219        |
| 3. Resultados y Discusión .....   | 221        |
| 3.1. Estudio de la eficacia de anticuerpos inducidos por vacunación (Prn1) para reconocer una cepa que expresa Prn2.....          | 221        |
| 3.2. Estudio de la reactividad cruzada de anticuerpos anti-Prn1 y anti-Prn2 de ratón inmunizados con Prn1 y Prn2 purificada. .... | 224        |
| Referencias.....  | 229        |

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**



## 1. Introducción General

### 1.1 Tos convulsa

La tos convulsa, cuyo agente causal es el cocobacilo Gram-negativo *Bordetella pertussis*, es una de las principales causas de mortalidad infantil provocada por enfermedades inmunoprevenibles. La enfermedad afecta las vías respiratorias y se caracteriza por la presencia de accesos típicos de tos violenta, espasmódica con sensación de asfixia, que terminan con un ruido estridente (tos convulsiva o convulsa) durante la inspiración.

La primera descripción clínica de la tos ferina es la de Guillermo de Baillou en 1578, quien la llamó tussis Quintín [1]. Posteriormente, Thomas Sydenham en 1679, y Thomas Willis en 1682 llamaron “pertussis” (per, intensa + tussis, tos) a esta



Jules Bordet



Octave Gengou

enfermedad que afectaba a lactantes y niños provocando la muerte en muchos casos. La bacteria causó numerosas epidemias en Europa durante los siglos XVIII y XIX pudiendo ser aislada en el año 1906 por Jules Bordet y Octave Gengou [2]. Debido al impacto epidémico de la enfermedad, el desarrollo de vacunas fue prioritario. Entre 1914 y 1923, Hess, Luttinger y Madsen realizaron los primeros ensayos exitosos de vacunación anti-pertussis [3] y finalmente, durante la década de 1940-1950, se introdujeron las vacunas celulares, de uso actual en algunos países, lo cual redujo drásticamente la incidencia de esta enfermedad. Debido a las reacciones adversas que produce esta vacuna, a finales del siglo pasado se desarrollaron vacunas de segunda generación acelulares

compuestas por antígenos purificados.

A pesar de la extensiva vacunación se han seguido registrando picos epidémicos cada 4 a 5 años y pertussis continúa siendo una de las principales causas de mortalidad infantil. Estudios recientes indican que ocurren aproximadamente 48,5 millones de casos de tos convulsa por año en todo el mundo, con un número de casos fatales cercano a 295.000 [4]. La situación se ha ido agravando con el tiempo a pesar de la vacunación masiva, lo cual ha determinado que la OMS y el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) declaren a pertussis re-emergente. Los datos epidemiológicos indican

también un cambio en el rango etario de casos. Aún en países con programas de vacunación masiva y elevada cobertura, cada vez son más los casos de tos convulsa asintomática o leve en adolescentes y adultos. Datos clínicos y epidemiológicos indican que esta población constituye un reservorio importante y una continua fuente de transmisión para lactantes y niños con esquemas de vacunación incompletos [5, 6]. Las causas de reemergencia de tos convulsa a nivel mundial aun no han sido determinadas, sin embargo se postula que la problemática podría ser una convergencia de factores entre los cuales la existencia de nichos de persistencia aun no identificados, la diferencia entre el fenotipo infectante y el vacunal, y la inmunoselección de cepas más virulentas como resultado de cuatro décadas de vacunación con cepas de colección juegan un papel importante.

El alarmante aumento de pertussis pone de manifiesto la necesidad de esclarecer los mecanismos de patogénesis y persistencia de *B. pertussis* en el hospedador para definir las deficiencias en las estrategias preventivas actuales y posibilitar la implementación de mejoras que permitan controlar la circulación de este patógeno y lograr, eventualmente, la erradicación de la enfermedad.

## 1.2. Epidemiología

En la era pre-vacunal, las epidemias por pertussis tenían un patrón cíclico, con picos de incidencia cada 2 a 5 años [5]. La enfermedad afectaba principalmente a niños y era una de las mayores causas de mortalidad infantil en todo el mundo. Registros en Estados Unidos indican que sólo en este país el número de casos reportados por año ascendía a más de 200000 [7]. La introducción de la vacuna formulada con célula entera redujo drásticamente la incidencia de la enfermedad y en 1976 el número de casos reportados en este país fue 200 veces menor respecto a la era prevacunal [7, 8]. Sin embargo, y a diferencia de otras enfermedades que han sido controladas por vacunación, el patrón cíclico de pertussis así como el período que transcurre entre ciclos epidémicos no varió con la introducción de la vacuna. Este patrón contrasta con el de otras enfermedades como el sarampión, en el que la introducción de la vacunación determinó que los intervalos entre los ciclos de aparición de la enfermedad fueran cada vez mayores. Esto se debe a que la vacunación no sólo logró controlar la enfermedad sino que también detuvo la circulación del virus [5, 6, 9]. Las vacunas contra *B. pertussis* en uso, en cambio, si bien protegen contra la afección aguda, esto es, evitan la



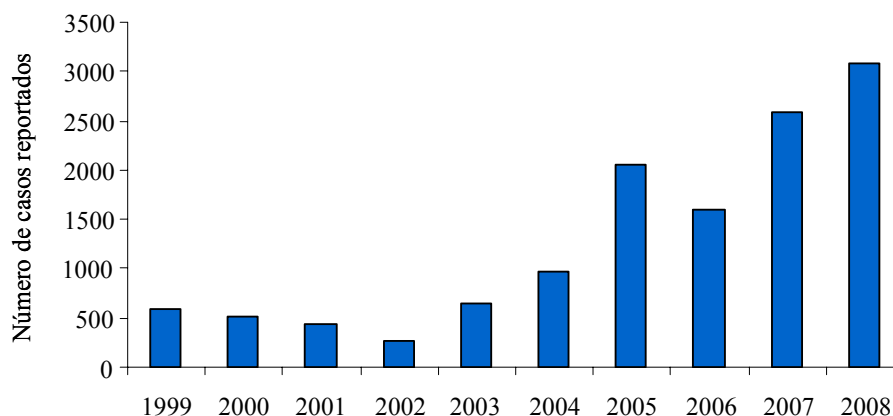
sintomatología asociada a la fase tóxica de la enfermedad, no previenen adecuadamente la colonización permitiendo la circulación de la bacteria en la población [10]. Por sobre el problema de base de la falta de protección contra la colonización, o tal vez debido a esta circunstancia, en los últimos 20 años se ha observado un marcado aumento de la incidencia de pertussis aun en países desarrollados con elevadas tasas de vacunación, siendo considerada en la actualidad una enfermedad re-emergente.

Las razones de la reemergencia de *B. pertussis* a nivel mundial parecen ser complejas, sin embargo, se ha postulado que ha habido una inmunoselección de cepas más virulentas como resultado de cuatro décadas de vacunación con cepas de colección, determinando que las vacunas actualmente utilizadas no sean completamente efectivas contra las cepas circulantes [11]. Relevamientos recientes llevados a cabo en Argentina demostraron que, de manera similar a lo observado en otros países, las cepas circulantes en la población presentan variaciones polimórficas respecto a la cepa vacunal en regiones inmunodominantes de los principales antígenos presentes en las vacunas. Tal es el caso de toxina pertussis (PT) y pertactina (Prn) [12]. Mas aún, las variantes alélicas que prevalecen coinciden con aquellas que han sido aisladas de forma predominante en todo el mundo, lo cual refuerza la hipótesis de que la circulación permanente de este patógeno en poblaciones vacunadas, permitió la inmunoselección de cepas dirigida por vacunación.

Concomitantemente con la reemergencia de la enfermedad, se ha observado un notorio incremento del número de casos reportados en adolescentes y adultos, registrándose manifestaciones atípicas de la misma que ponen en evidencia un creciente carácter persistente de la enfermedad [13, 14]. Datos del CDC indican que en el 2004 el número de casos reportados aumentó 19 veces en personas entre 10 y 19 años y 16 veces en personas mayores de 20 años respecto al período 1990-1993 [8]. Estos estudios, junto con evidencias clínicas que indican que los adultos son la principal fuente de contagio de niños con inmunidad deficiente, han llevado a especular que la infección con pertussis es en realidad endémica en adolescentes y adultos [5, 6, 9] quienes constituyen reservorios esporádicos de infección y fuente de contagio de niños susceptibles. La localización de *B. pertussis* en estos portadores se desconoce.

La situación en Argentina es similar a la del resto del mundo aunque había pasado inadvertida por años debido a la escasa notificación por problemas de infraestructura y seguimiento epidemiológico. Nuestro grupo estuvo involucrado en la

detección de *B. pertussis* por serología desde el año 2002. De acuerdo con la OMS, en nuestro país, entre los años 1998 al 2002 hubo una pequeña disminución en la incidencia de pertussis, sin embargo, a partir de ese año, hubo un incremento importante y sostenido en el número de casos reportados registrándose un brote de pertussis en la provincia de Neuquén en el año 2005 (Fig. 1). Los principales afectados fueron niños menores de 6 meses con esquemas de vacunación incompleta. Sin embargo también se observó un incremento en el número de casos en adolescentes y adultos [15].



**Figura. 1. Número de casos de *B. pertussis* reportados en Argentina desde el año 1999 hasta el 2008.** Datos obtenidos de la Organización Mundial de la Salud.

### 1.3. Cuadro clínico

Los síntomas de pertussis pueden variar, dependiendo la edad, el estado inmune y el tiempo transcurrido desde la última infección con pertussis o desde la última vacunación [16].

#### 1.3.1. Manifestaciones típicas

Luego de un período de incubación de 7 a 10 días, pueden definirse tres estadios clínicos o fases durante el curso de la enfermedad: catarral, paroxística, y de convalecencia [17]. Durante la fase catarral se presenta catarro, lagrimeo y tos suave. La tasa de contagio es muy elevada durante esta fase y en las dos primeras semanas después de la aparición de la tos. Superado este periodo (7 a 14 días), la tos empeora en frecuencia y magnitud. La fase paroxística se caracteriza por ataques de tos repetidos

con múltiples expectoraciones violentas durante una exhalación simple (evento paroxístico). Al final del paroxismo, ocurre un esfuerzo de inspiración intenso durante el cual sobreviene el clásico graznido que dio nombre a esta enfermedad. En conjunción con un paroxismo, se observa también cianosis, salivación, lagrimeo y vómitos. Entre las complicaciones comunes de esta enfermedad se incluyen: neumonía, otitis media, convulsiones, y encefalopatías. La neumonía puede ser un evento primario en respuesta a la infección por *B. pertussis* o puede resultar de una infección secundaria con otros patógenos. Las convulsiones y encefalopatía se deben probablemente a la hipoxia cerebral asociada con los paroxismos severos. La fase paroxística puede durar entre 2 y 8 semanas. La transición a la fase de convalecencia es gradual y se asocia con la disminución en frecuencia y severidad de los eventos paroxísticos. La convalecencia usualmente perdura 1 a 2 semanas.

La mayoría de los casos de muerte por infección con *B. pertussis* ocurren en infantes, especialmente durante el primer año de vida. La fuente de infección son frecuentemente miembros del grupo familiar, tanto adolescentes como adultos [4, 18, 19]. Las infecciones neonatales son particularmente severas, con un riesgo de muerte cercano al 3 % [20-23]. En infantes, la severidad de la enfermedad y el riesgo de muerte muestran cierta correlación con la manifestación de leucocitosis. La tos convulsa causa linfocitosis aguda con recuentos de linfocitos  $> 20.000$  células /ml [20, 24], particularidad que la caracteriza.

### 1.3.2. Manifestaciones atípicas

Entre individuos inmunizados, especialmente adolescentes y adultos, los casos asintomáticos son comunes [25-27] 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) [28, 29]. Se ha descrito que entre el 12 y 52 % de los adolescentes y adultos que sufren episodios de tos durante periodos prolongados presentan evidencia serológica de infección con *B. pertussis* [6].

## 1.4. Vacunación y tratamiento

### 1.4.1. Estrategias de vacunación actuales

La mayoría de los países industrializados utilizan vacunas que combinan el toxoide tetánico y diftérico con antígenos purificados de *B. pertussis* (Difteria + Tetano + Pertussis acelular = DTPa). Existen en la actualidad diferentes preparaciones de vacuna acelular contra *B. pertussis* que difieren en su composición de antígenos. Las monovalentes (toxina pertussis (PT) detoxificada), las bivalentes (PT detoxificada y hemaglutinina filamentosa (FHA)), las trivalentes (PT detoxificada, FHA y pertactina (Prn)), las tetravalentes (PT detoxificada, FHA, Prn y fimbria (FIM)), y las pentavalentes (PT detoxificada, FHA, Prn, FIM2 y FIM3). Estudios epidemiológicos llevados a cabo en varios países sugieren que, en general, las vacunas con más de tres 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 [6].

En Argentina, como en la mayoría de los países subdesarrollados, se continua utilizando la vacuna celular que se administra junto con el toxoide tetánico y diftérico (DTPc) y el polisacárido de *Haemophilus influenzae* serotipo b, formando la cuádruple bacteriana (DTPcHib). De acuerdo con el Calendario Nacional de Vacunación la misma se aplica en cinco dosis que se administran a los 2, 4, 6, 18 meses y 6 años de edad. La eficacia de esta vacuna se correlaciona directamente con el número de dosis administradas: aproximadamente 18 % para una única dosis, 48 % para dos dosis, 58 % para tres dosis, y 78 % con cuatro o más dosis.

Un factor importante a tener en cuenta es que la inmunidad adquirida por vacunación o infección confiere protección solo durante un corto plazo (*waning immunity*). En el caso de la vacuna celular, la inmunidad comienza a declinar luego de 3 a 5 años, con ausencia de protección demostrable luego de 10 a 12 años [13]. La duración de la protección con la vacuna acelular no ha sido establecida aún, pero aparentemente la inmunidad declinaría luego de 4 a 5 años [13, 30] determinando que la población adulta no se encuentre eficazmente protegida contra la infección en ninguno de los casos.

Recientemente se ha licenciado en algunos países, entre los que se incluyen Estados Unidos, Australia, Canadá, Francia, Alemania, Suiza, y desde el año pasado en Argentina, el uso de formulaciones vacunales acelulares para adolescentes y adultos que

contienen cantidades menores de toxoide diftérico y de antígeno pertussis (dTpa). 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 [31].

Es importante en este punto reiterar que tanto las vacunas celulares como las acelulares actualmente utilizadas, aunque protegen contra la sintomatología de la enfermedad, no previenen eficientemente contra la colonización, no siendo por lo tanto efectivas contra el establecimiento de carriers o portadores asintomáticos. Es posible entonces que la vacunación de adultos, aunque contribuya a disminuir la incidencia de esta enfermedad, no logre erradicarla definitivamente de la población, continuando vigente el problema de base, o sea, la falta de protección contra la colonización. En este sentido, la búsqueda de nuevos inmunógenos 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. Cabe señalar, que hay otras dificultades en la prevención de pertussis en adultos [32]. En primer lugar, y a pesar de la gran acumulación de evidencia científica, la presencia de tos convulsa en la población adulta no es, en general, reconocida por la comunidad médica, determinando un importante nivel de subdiagnóstico de esta enfermedad y un bajo grado de conciencia en la población general. Por otro lado, y aun más importante, la factibilidad de la implementación de una estrategia de vacunación que proteja a los adultos de por vida es muy discutida. La forma más sencilla de lograrlo sería cambiar el refuerzo que se realiza cada 10 años con la vacuna toxoide tetánico-difteria, por la vacuna dTpa, que incluya antígenos de *B. pertussis*. Sin embargo se desconoce si un refuerzo cada 10 años sería suficiente para mantener la inmunidad contra *B. pertussis* como así también el tipo de antígenos que debieran incluirse en esta vacuna para que sea efectiva.

#### 1.4.2. Tratamiento

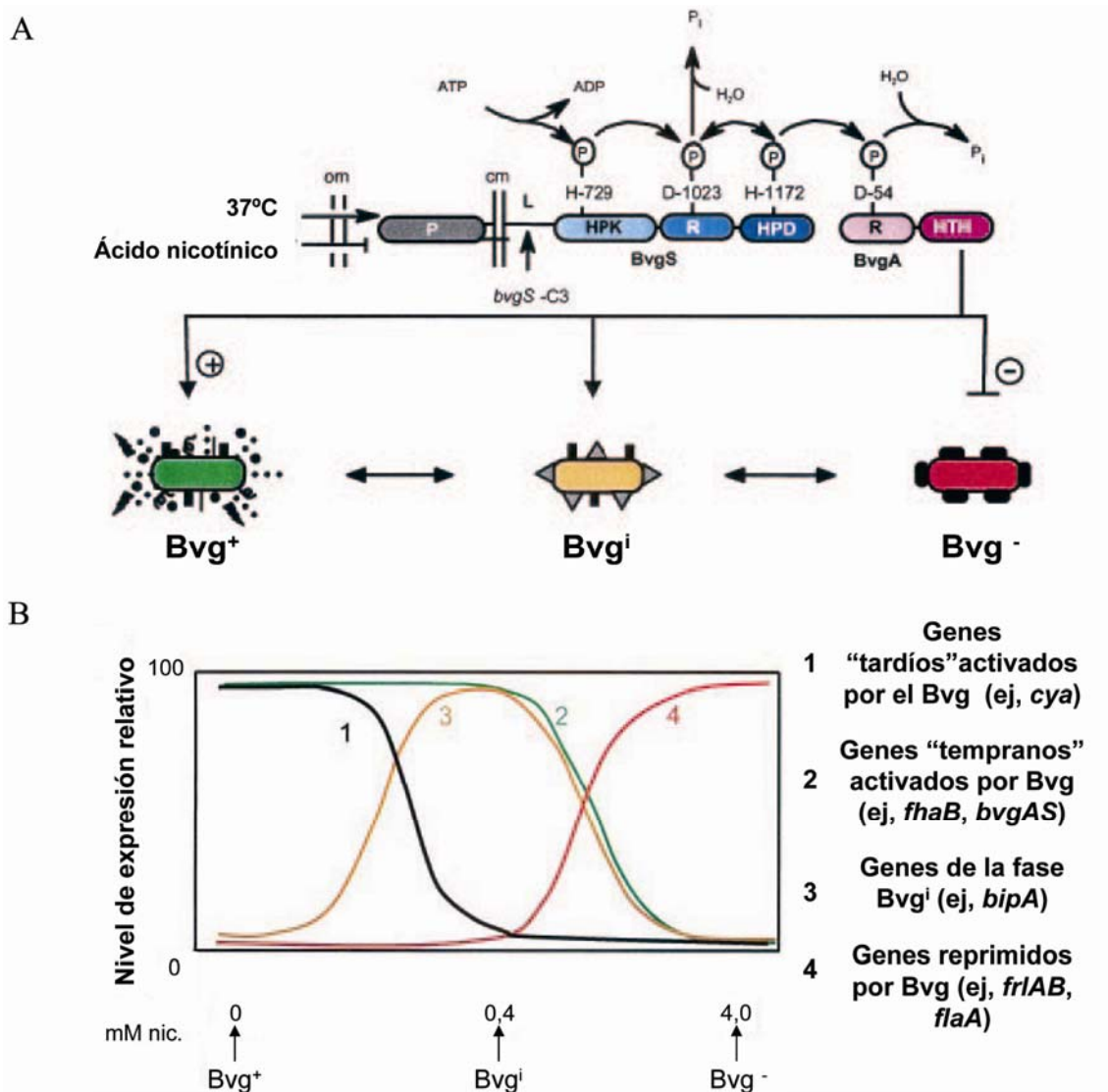
La infección de niños menores de 6 meses requiere hospitalización debido a las complicaciones que pueden producirse, por ejemplo, apnea, hipoxia y dificultad para

respirar. El tratamiento con antibióticos tiene su máxima efectividad en el periodo catarral. Una vez establecida la tos paroxística, no disminuye significativamente el curso clínico de la enfermedad pero reduce las posibilidades de transmisión a otras personas. En el pasado 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 [33]. En niños mayores de dos meses de edad con alergia o intolerancia a macrólidos se puede utilizar trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMZ). Como fármacos coadyuvantes para el tratamiento sintomático de los paroxismos de tos se han empleado el salbutamol, los corticoides y la globulina hiperinmune anti-pertussis [34]. Los dos primeros se emplean con frecuencia tanto en tratamiento ambulatorio como hospitalario. Sin embargo no hay estudios controlados de suficiente amplitud hasta el momento 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 [34] por lo tanto hasta el momento no está justificado su empleo.

### 1.5. *B. pertussis*: Factores y fases de virulencia

*B. pertussis* posee una gran variedad de factores de virulencia, algunos de función conocida y otros no. La expresión de la mayoría de estos factores de virulencia se encuentra regulada por un sistema de dos componentes codificado por el locus *bvgAS* (*Bordetella virulence genes*) que responde a cambios en las condiciones del entorno. BvgA y BvgS son miembros de este sistema y su activación implica un mecanismo de fosfo-transferencia de cuatro pasos (His-Asp-His-Asp) [35, 36] que determina la expresión de una gran variedad de factores de virulencia (Fig. 2A). BvgS es un sensor híbrido anclado a la membrana interna [37] mientras que BvgA es un regulador transcripcional que se une al DNA [38]. La caracterización *in vitro* de varios promotores regulados por Bvg indica que la expresión de diferentes clases de genes puede ser diferencialmente regulada según la localización y afinidad de los sitios de unión de BvgA fosforilada a sus promotores [36].

Aunque en general las señales censadas por este sistema *in vivo* no han sido aun esclarecidas se cree que su regulación diferencial en respuesta a los distintos ambientes encontrados tanto dentro del hospedador como durante la transmisión a otros hospedadores tiene un rol central en la patogénesis de esta bacteria. Estudios *in vitro* demostraron que el sistema BvgAS se inactiva a bajas temperaturas o en presencia de



**Figura. 2 (A) Fosforilación de BvgAS.** BvgS posee dos dominios de unión a proteína de localización periplásmica que participan en el reconocimiento de la señal. Cuando se activa (37 °C), BvgS se autofosforila en la posición His729 del dominio autoquinasa. Este grupo fosfato es transferido a la posición Asp1023 en el dominio receptor y luego pasa a la posición His1172 en el extremo COOH-terminal del dominio de fosfotransferencia. Finalmente, el grupo fosfato pasa a la posición Asp54 de BvgA. La unión de BvgA~P a promotores transcripcionales determina la expresión de una gran variedad de factores de virulencia. Cuando BvgS se inactiva (25 °C, MgSO<sub>4</sub>, ácido nicotínico), la fosforilación no ocurre. Se desconoce como ocurre la fosforilación en la fase Bvg<sup>i</sup> (?). **(B) Representación de las fases Bvg<sup>+</sup>, Bvg<sup>i</sup> y Bvg<sup>-</sup>.** Curvas de expresión relativa de las cuatro clases de genes. (Fuente: Mattoo, S. et al. (2005) Clin. Microb. Rev.).

concentraciones milimolares de MgSO<sub>4</sub> o ácido nicotínico y se activa cuando la bacteria crece a 37 °C. Es a través de este sistema que *B. pertussis*, en respuesta a distintas intensidades de los efectores externos, alterna entre distintas fases fenotípicas inmunogénicamente muy distintas. Esta regulación no es tipo ON-OFF sino que responde a la concentración del modulador a modo de reóstato controlando la expresión de cientos de genes diferentes cuyos productos participan en una amplia variedad de actividades celulares incluyendo sistemas de transporte, expresión de toxinas y adhesinas, metabolismo, y regulación transcripcional.

Al menos tres fases fenotípicas han sido identificadas *in vitro*, Bvg<sup>+</sup>, Bvg<sup>i</sup> y Bvg<sup>-</sup> [39], que aparecen como respuesta a cambios graduales en las concentraciones de agentes modulantes (MgSO<sub>4</sub> o ácido nicotínico) o a cambios en la temperatura del cultivo (Fig. 2B). Este fenómeno de transición de fase es reversible y se conoce como modulación fenotípica [40]. Cuando la bacteria crece a 37 °C, en ausencia de MgSO<sub>4</sub> o ácido nicotínico (fase Bvg<sup>+</sup>), el BvgA activa la expresión de los genes *vag* (*virulence activated genes*), que a su vez se dividen en tempranos y tardíos. Los primeros codifican algunas adhesinas (hemaglutinina filamentosa, *fhaB* y fimbrias, *fim*) y el mismo *bvgAS*, mientras que los tardíos codifican toxinas (adenilato ciclasa, *cya* y toxina pertussis, *ptx*). Esta fase también se caracteriza por la represión de los genes *vrg* (*virulence repressed genes*), cuya expresión se encuentra inhibida por la proteína represora BvgR cuya expresión es activada por BvgA [41, 42]. Cuando la bacteria crece a 25 °C, o a 37 °C en presencia de concentraciones milimolares de MgSO<sub>4</sub> o ácido nicotínico (fase Bvg<sup>-</sup> o avirulenta) el BvgAS está inactivo determinando la ausencia de expresión de los genes *vag* y la expresión de los genes *vrg*. El crecimiento bajo condiciones sub-modulatorias, por ejemplo, a concentraciones de ácido nicotínico entre 0,4 y 2 mM, determina que *B. pertussis* exprese un fenotipo intermedio entre el Bvg<sup>+</sup> y el Bvg<sup>-</sup>, caracterizado por la ausencia de expresión de los genes *vrg* y la expresión de los *vag* tempranos y *bipA*, entre otros genes aun no caracterizados (fase Bvg<sup>i</sup>).

Se ha postulado que factores ambientales, como la baja temperatura, durante la transmisión persona a persona de *B. pertussis* podrían determinar la modulación de *B. pertussis* de manera tal que al ingresar al hospedador la bacteria se encontraría en fase intermedia o avirulenta [43]. Así, durante los primeros estadios de la infección la bacteria podría tener un fenotipo significativamente distinto al encontrado en estadios posteriores del proceso infeccioso, donde en respuesta a factores externos como la



temperatura corporal, se induce la expresión de adhesinas y/o toxinas características de la fase virulenta y la fase tóxica de la enfermedad.

Se ha descrito un segundo sistema de dos componentes, el RisAS, originalmente estudiado en *Bordetella bronchiseptica* [44]. El locus *ris* de este sistema presenta un alto grado de homología con los genes *ompR-envZ* de *Escherichia coli* involucrados en fenómenos de osmorregulación [45] y con los genes *phoPQ* de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* requeridos para la activación intrafagosomal de genes de virulencia [46, 47]. En el caso de *B. bronchiseptica*, se ha encontrado que la expresión del RisAS se encuentra inducida cuando la bacteria se encuentra en localización intracelular favoreciendo su sobrevivencia [48]. A diferencia de lo que ocurre con *B. bronchiseptica*, el RisAS en *B. pertussis* ha sido relativamente poco estudiado, en parte debido a que el análisis genético revela que el gen que codifica a RisS presenta una mutación *in-frame* que lo hace inactivo [49]. Sin embargo, se ha encontrado que el RisA es capaz de activarse en *B. pertussis*, posiblemente a través de su fosforilación por una quinasa distinta de RisS, via *cross talk* entre sistemas regulatorios, participando en la expresión de los genes *vrg* lo cual sugiere que los sistemas RisAS y BvgAS se encuentran interrelacionados en *B. pertussis* [49, 50]. Hasta hoy, no se sabe exactamente cual es la función de los *vrg* ni su rol en la patogénesis. Sin embargo, se ha sugerido que la modulación podría ser relevante durante la infección favoreciendo la sobrevivencia dentro del hospedador en nichos aún no determinados.

### 1.5.1. Factores de virulencia regulados por el sistema BVG

#### 1.5.1.1. Hemaglutinina Filamentosa (FHA).

FHA es una proteína altamente inmunogénica y componente de la mayoría de las vacunas acelulares contra pertussis. Sus dimensiones son de aproximadamente 2-4 nm de diámetro y 100 nm de longitud y puede estar asociada a la superficie o ser secretada al medio extracelular [51].

FHA es codificada por el gen *fhaB* y se expresa tanto en la fase Bvg<sup>+</sup> como en la fase Bvg<sup>i</sup> [52, 53]. FHA es sintetizada como un precursor de 367-kDa, FhaB, el cual sufre una serie de modificaciones postraduccionales para formar la proteína madura de

220 kDa. Esta es exportada a través de la membrana citoplasmática mediante un mecanismo dependiente del péptido señal, Sec. Su traslocación y secreción a través de la membrana externa requiere una proteína accesoria específica, FhaC [54, 55]. Ambas proteínas conforman un sistema de secreción de dos componentes (*two partner secretion system (TPS)*) [56]. Se ha sugerido que FHA llega a la membrana externa en una conformación extendida y adquiere la estructura terciaria en la superficie de la célula, luego de extensivas proteólisis a nivel de los residuos N- y C- terminales. Una vez en la superficie de la membrana, aproximadamente 130 kDa de la proteína FhaB son clivados proteolíticamente por una proteasa, SphB1 [57]. Parte de FHA es secretada al medio extracelular y parte permanece asociada a la superficie celular.

FHA es una de las principales adhesinas de *B. pertussis* [58-60]. Al menos cuatro dominios involucrados en la adhesión a las células del hospedador han sido identificados. FHA, a través de un dominio aun no identificado, interacciona con el receptor de complemento 3 (CR3, CD11b/CD18) promoviendo la adhesión de *B. pertussis* a células inmunes. El triplete Arg-Gly-Asp (RGD), a su vez, promueve la adhesión a monocitos y macrófagos, y posiblemente a otros leucocitos, a través de la interacción con el complejo LRI/IAP (integrina de respuesta a leucocitos/proteína asociada a integrina). La activación de este complejo determina un incremento en la capacidad de unión de CR3 a *B. pertussis* [61, 62] favoreciendo la adhesión de la bacteria a las células fagocíticas. El dominio RGD se encuentra también involucrado en la interacción con la integrina VLA-5 (very late antigen 5,  $\alpha 5\beta 1$ ) de células epiteliales bronquiales [63]. FHA también posee un dominio de interacción con carbohidratos (CRD), que media la adhesión a lactosilceramidas presentes en la superficie de células epiteliales respiratorias ciliadas y macrófagos [64]. Además, FHA presenta actividad de unión tipo lectina con afinidad por heparina y otros carbohidratos sulfatados, involucrada en la adhesión a células epiteliales no ciliadas [65]. Un hallazgo interesante recientemente descrito por nuestro grupo indica que la actividad adhesina de FHA se ve influenciada por la presencia de adenilato ciclasa (ACT) en la membrana. Si ACT 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 ACT modifica el dominio de unión de FHA a polisacáridos sulfatados [59].

Además de su función como adhesina, se ha descrito que FHA posee una importante actividad inmunomoduladora que favorece la persistencia de *B. pertussis* en el hospedador. Se ha encontrado que a través de FHA, *B. pertussis* inhibe la producción de la citoquina proinflamatoria IL-12 mediante un mecanismo dependiente de IL-10 [66], restringiendo la producción de una respuesta protectora local tipo Th1 necesaria para eliminar eficientemente a *B. pertussis* del tracto respiratorio [67-69]. La proliferación de células T mediada por antígenos externos también se encuentra inhibida por FHA [70]. Por último, trabajos recientes indican que mediante la secreción de FHA *B. pertussis* es capaz de bloquear la activación de la vía NF- $\kappa$ B involucrada en la producción de citoquinas proinflamatorias en monocitos humanos comprometiendo significativamente la respuesta inmune [71].

#### 1.5.1.2. Fimbrias (Fim).

Las fimbrias son estructuras proteicas poliméricas de tipo filamentoso que se localizan en la superficie de *B. pertussis*. Existen dos serotipos de subunidad mayor de fimbria, Fim2 y Fim3, que comparten una subunidad menor común denominada FimD [72]. El gen *fimD* forma parte del operón *fimBCD*, el locus funcional para la biosíntesis de fimbria [73]. Varios estudios sugieren que Fim interviene en la adhesión al epitelio respiratorio a través de Fim2 y Fim3, y a monocitos por medio de FimD [74-76]. Fim interacciona también con azúcares sulfatados que se encuentran comúnmente en el tracto respiratorio como heparina, condroitin y dextrano [77]. Estudios realizados por Hazenbos *et al.* [74, 78] sugieren que FimD interviene en la adhesión de *B. pertussis* no opsonizada a VLA-5 en la superficie de monocitos provocando un aumento de expresión de CR3 e incrementando los sitios de interacción para FHA.

Se ha encontrado que la inclusión de Fimbria en las formulaciones vacunales acelulares aumenta la eficacia de las mismas y que los anticuerpos anti-Fimbria contribuyen a la protección contra *B. pertussis* [79, 80]. En un trabajo reciente de nuestro grupo se ha demostrado que los anticuerpos anti-Fim poseen una importante actividad aglutinante e interfieren significativamente en la capacidad de *B. pertussis* de interaccionar con las células epiteliales respiratorias [58].

### 1.5.1.3. Pertactina (Prn) y otros Autotransportadores.

A la familia de autotransportadores pertenecen 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 [81]. El primer miembro de esta familia descrito en *Bordetella* fue Prn. Esta proteína de 69 kDa posee, de forma similar a FHA, un motivo RGD así como regiones ricas en prolina y repeticiones de leucina, ambos dominios potencialmente involucrados en la adhesión de la bacteria al hospedador [81, 82].

Una serie de estudios de nuestro grupo sugieren que los anticuerpos anti-Prn cumplen un rol importante en la protección contra pertussis gracias a su potente actividad opsonizante que facilita la fagocitosis de *B. pertussis* por las células inmunes [83]. Prn es el único antígeno incluido en las formulaciones actuales con esta capacidad lo cual explica la importancia de su inclusión en las vacunas acelulares [84, 85] y tal vez la aparición y prevalencia de cepas circulantes que expresan Prn con variaciones en regiones implicadas en el reconocimiento inmune.

Otras proteínas autotransportadoras identificadas en *B. pertussis* incluyen: TcfA (originalmente clasificado como un factor de colonización traqueal) [86], BrkA [87], SphB1 [57] y Vag8 [88]. Se ha postulado que BrkA proporciona a *B. pertussis* cierta resistencia a la activación de la vía clásica del complemento [87, 89].

### 1.5.1.4. Toxina Adenilato Ciclasa (ACT).

ACT pertenece a la familia de citotoxinas formadoras de poro dependiente de  $Ca^{+2}$  denominadas toxinas RTX (*repeats-in-toxins*) [90, 91]. Es una proteína bifuncional con un dominio N-terminal que media la actividad adenilato ciclasa y un dominio C-terminal que media la actividad hemolisina y promueve la liberación del dominio catalítico en el citoplasma de células eucariotas [92-95]. A diferencia de otras toxinas de su clase, la mayor parte de ACT permanece asociada a la superficie y solo una pequeña proporción se libera al medio externo. Estudios recientes indican que la retención en membrana de ACT depende de la expresión de FHA [96]. ACT, a su vez, modifica tanto la conformación como la funcionalidad de FHA modificando su actividad adhesina [59]. La glicoproteína de superficie CD11b en la célula blanco sirve de

receptor de la toxina madura [97, 98]. Una vez dentro de la célula blanco, ACT es activada por calmodulina [99] y cataliza la producción de AMPc en cantidades suprafisiológicas [100-103]. Sorprendentemente, ACT anclada en la membrana bacteriana no es responsable de la intoxicación de las células del hospedador; estudios recientes demostraron que la intoxicación requiere un acercamiento estrecho entre la bacteria y la célula blanco y la secreción de ACT [104]. El incremento de AMPc interfiere con los mecanismos de transmisión de señales en células del sistema inmune y modula diferentes funciones efectoras, incluyendo la respuesta oxidativa, lo cual favorece la sobrevivencia bacteriana al contacto con la célula del hospedador [105]. *In vitro*, ACT induce apoptosis en macrófagos y disminuye la producción de TNF- $\alpha$  en monocitos y neutrófilos [103, 106, 107]. Se ha postulado que esta toxina funciona como un factor anti-inflamatorio y anti-fagocítico durante la infección inhibiendo las funciones de las células efectoras del sistema inmune.

Trabajos recientes indican que ACT, junto con el LPS de *B. pertussis* [108-110], es capaz de modular la respuesta inmune adaptativa inhibiendo la expresión de IL-12 y aumentando la expresión de IL-23 en células dendríticas humanas lo cual determina la inducción de células Th17 en detrimento de un perfil Th1 [111]. Este perfil también se encuentra asociado con inflamación crónica autoinmune lo que ha llevado a especular que la tos persistente asociada con la patología de la tos convulsa puede deberse a una reacción crónica del tipo autoinmune en las vías respiratorias como resultado de la inducción de una respuesta inmune con un perfil Th17 [112].

#### 1.5.1.5. Toxina Dermonecrótica (DNT).

DNT, una toxina de tipo A-B de 140 kDa, se compone de un dominio amino-terminal de unión al receptor y un dominio enzimático carboxilo-terminal [113, 114]. Estudios *in vitro* con DNT purificada sugieren que esta toxina provoca la activación constitutiva de GTPasas Rho intracelulares, provocando alteraciones profundas a nivel del citoesqueleto [115]. Aunque el receptor de DNT no ha sido identificado, se sabe que esta toxina es internalizada vía endocitosis y luego clivada por endoproteasas como furina, lo cual es indispensable para su actividad [116].

## 1.5.1.6. Toxina Pertussis (PT).

Esta toxina se expresa exclusivamente en *B. pertussis* y posee la estructura clásica tipo A-B de las exotoxinas bacterianas. Está compuesta por seis polipéptidos designados S1 a S5, codificados por los genes *ptxA* a *ptxE*, respectivamente [117, 118]. El polipéptido S1 constituye la subunidad A de la toxina mientras que la subunidad pentamérica B está compuesta por los péptidos S2, S3, S4 y S5 ensamblados en una proporción 1:1:2:1 [117, 119]. La secreción a través de la membrana externa requiere un aparato de transporte especializado compuesto por nueve proteínas denominadas Ptl (*pertussis toxin liberation*) [120, 121]. Una vez dentro del citoplasma de la célula eucariota, probablemente vía endocitosis mediada por receptores, la subunidad B se intercala con la membrana citoplasmática y une ATP, provocando la liberación de la subunidad activa S1 [122]. Esta subunidad cataliza la transferencia de ADP-ribosa desde el NAD a la subunidad  $\alpha$  de proteínas G ( $G_i$ ,  $G_t$  y  $G_o$ ) provocando su inactivación [119, 123]. Cuando se encuentra activa, la proteína  $G_i$  inhibe la adenilato ciclasa eucariota y abre los canales de  $K^+$ , la proteína  $G_t$  activa la fosfodiesterasa que cataliza la hidrólisis del GMP cíclico y  $G_o$  produce la apertura de canales de  $K^+$ , el cierre de canales de  $Ca^{+2}$  y activa la fosfolipasa C- $\beta$ . Los efectos biológicos atribuidos a la alteración de los patrones de señalización que esta toxina provoca se suman a la acción de ACT (aumento de AMPc) provocando la sensibilización a histamina, linfocitosis, aumento de la secreción de insulina en respuesta a señales reguladoras, hipoglucemia y efectos inmunológicos tanto supresores como estimuladores [124, 125]. Por ejemplo, PT retarda el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección reduciendo la capacidad de los anticuerpos opsonizantes anti-*B. pertussis* de mediar la eliminación de la bacteria [126, 127]. Además se ha encontrado que PT interfiere con la expresión de moléculas presentadoras de antígeno en el macrófago [128] e incrementa, al igual que FHA y Fim, la capacidad de unión de *B. pertussis* a CR3 en macrófagos [129] lo cual significa que *B. pertussis* induce su propia adhesión a monocitos. PT también altera la expresión de moléculas de superficie en las células dendríticas [130] reduciendo la respuesta adaptativa y promoviendo la re-infección de individuos.

## 1.5.2. Factores de virulencia no regulados por el sistema Bvg

### 1.5.2.1. Citotoxina Tranqueal (TCT).

TCT es un producto resultante de la degradación del peptidoglicano presente en la pared bacteriana y liberado durante el crecimiento de *B. pertussis* [131]. Estudios *in vitro* indican que TCT causa disfunción (ciliastosis) y muerte de células epiteliales ciliadas [132] a través de un mecanismo dependiente de la elevación de los niveles de monóxido de nitrógeno (NO<sup>•</sup>) [133]. Se ha postulado que, *in vivo*, TCT estimula la producción de IL-1 $\alpha$  en células secretoras de mucus no ciliadas, lo cual controla positivamente la expresión de la enzima NO sintetasa [133] y la producción de monóxido de nitrógeno. El NO<sup>•</sup> luego difunde a las células ciliadas contiguas provocando la depleción del hierro intracelular lo cual deriva en la inactivación de enzimas que contienen hierro importantes para la respiración mitocondrial y la síntesis de DNA. Como resultado de esta intoxicación celular, la unión entre células epiteliales se ve comprometida y ocurre la extrusión de células ciliadas [134].

### 1.5.2.2. Lipopolisacarido (LPS).

Como otras bacterias Gram-negativas, *B. pertussis* posee LPS en su membrana externa, una potente endotoxina bacteriana. La misma está constituida por una parte lipídica (lípidio A) anclada a la membrana y un núcleo oligosacárido. El locus *wlb*, compuesto por doce genes (*wlbA* a *wlbL*) es el encargado de su biosíntesis y ensamblado [135]. No posee antígeno O (cadena de polisacáridos), característico del LPS de la mayoría de las bacterias Gram-negativas. El LPS de *B. pertussis* es pirogénico, mitogénico e histamino sensibilizante, siendo el lípidio A de esta molécula la fracción endotóxica principal [136-138]. El LPS es responsable de la reactogenicidad y efectos adyuvantes de la vacuna celular. Induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8) en contacto con células epiteliales, macrófagos y otras células del sistema inmune lo cual conduce a la toxicidad sistémica o “shock inducido por endotoxina” [137]. El LPS es protector para *B. pertussis* y en particular protege de los efectos de la proteína surfactante A (SP-A) presente en el epitelio respiratorio [139]. Trabajos recientes indican que el LPS de *B. pertussis* ejerce también

una importante actividad inmunomodulatoria. La ausencia de antígeno O dificulta la interacción con el TLR4 e induce la expansión de células Th17 en detrimento de un perfil Th1 contribuyendo a la inflamación [140].

## 1.6. Patogénesis

La patogénesis implica una compleja serie de eventos entre los que se incluye la adhesión a epitelio, proliferación, daño local y eventualmente, persistencia.

Varios factores de la fase virulenta han sido implicados como mediadores de la adhesión de *B. pertussis* a las células del huésped (FHA, Fim, PT, TcfA, BrkA, Vag8, y Prn) [17]. Aunque FHA ha sido descrita como la principal adhesina de *B. pertussis* [58-60], la redundancia en proteínas con actividad tipo adhesina evidentemente contribuye al proceso de adhesión [142]. Un evento primario durante la colonización es la inducción de ciliostosis que, junto con el daño al epitelio respiratorio y la acumulación de mucus, dificulta la eliminación del microorganismo. El daño local de las células epiteliales se debe a la acción de TCT y DNT, y en menor medida ACT [115, 143]. Sumado a este efecto mecánico de dificultad para eliminar a la bacteria se suma que *B. pertussis* en condiciones de infección induce la expresión de adhesinas aun no identificadas que le dan la capacidad de adherirse al mucus [144]. Se ha postulado que la expresión de la proteasa SphB1 facilitaría el corte de FHA posibilitando la dispersión de la bacteria desde las microcolonias iniciales a nuevos sitios en el tracto respiratorio [145]. La característica distintiva de la infección es la tos paroxística y se ha sugerido que el importante daño local es en parte responsable de esta tos. Sin embargo, la duración total de la tos es mayor que el período que dura el daño local lo cual sugiere que otros factores aun no identificados podrían contribuir a la persistencia de los síntomas.

Por lo que se conoce hasta el momento, *B. pertussis* sería capaz de evadir la respuesta inmune principalmente por la acción de dos toxinas, la toxina adenilato ciclasa (ACT) y la toxina pertussis (PT). Específicamente, ACT provoca la intoxicación de neutrófilos catalizando la producción excesiva de AMPc e inhibe la activación de la célula inmune. Se cree que PT disminuye el reclutamiento de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) al sitio de infección mediante la modulación de producción de citoquinas y quimoquinas en células epiteliales y macrófagos. Como consecuencia de



los efectos de PT y ACT, *B. pertussis* podría evadir la inmunidad innata temprana durante la colonización. En estadios posteriores, estudios recientes sugieren que *B. pertussis* es capaz de modular la respuesta inmune adaptativa a través de la acción de distintos factores de virulencia, entre los que se encuentran FHA [66, 146], ACT [108, 110, 147], PT [128] y LPS [140, 148]. Es a través de estos factores que *B. pertussis* disminuye la respuesta local Th1, la cual, como veremos en detalle más adelante, juega un rol importante en la eliminación de este patógeno.

*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. [6, 149]. La localización de *B. pertussis* durante este período se desconoce, lo cual dificulta el desarrollo de estrategias preventivas eficaces que permitan erradicar definitivamente este patógeno de la población. Ciertas evidencias experimentales indican que *B. pertussis* es capaz de ingresar a diferentes tipos celulares incluyendo macrófagos, neutrófilos y células epiteliales respiratorias [63, 150-153]. Por ejemplo, en un estudio *ex vivo* se ha encontrado que *B. pertussis* es capaz de sobrevivir en macrófagos humanos durante al menos tres días [154] y en estudios utilizando modelos de infección animal se ha hallado a *B. pertussis* en macrófagos alveolares luego de 21 días de infección [151, 155]. En humanos, *B. pertussis* ha sido encontrada en macrófagos alveolares aislados de chicos coinfectados con el virus de inmunodeficiencia humana [156] y en infantes en los cuales se ha confirmado neumonía provocada por *B. pertussis* [157] sugiriendo que este tipo celular podría constituir un reservorio de *B. pertussis*. La necesidad de una respuesta celular tanto como la de una respuesta humoral para combatir a esta enfermedad parecen apoyar esta hipótesis [67]. 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.

Otro mecanismo de persistencia posible es la formación de biofilms bacterianos dentro del hospedador. Estudios recientes realizados por investigadores de nuestro Instituto, demuestran que *B. pertussis* es capaz de formar biofilm *in vitro* [158, 159]. El biofilm se define como una comunidad de microorganismos sésiles, células que están irreversiblemente adheridas a una superficie o unas con otras, embebidas en una matriz de sustancia polimérica extracelular (EPS) [160]. El EPS que *B. pertussis* desarrolla

durante su crecimiento en biofilm *in vitro* se compone principalmente de polisacáridos (con ácidos urónicos), LPS y proteínas [159]. En *B. pertussis*, como en otros patógenos tales como *Escherichia coli* [161], *Shigella dysenteriae* [162], *Staphylococcus epidermis* [163] y *Pseudomonas aeruginosa* [164], la capacidad de desarrollar biofilm puede contribuir a la patogénesis y desempeñar un rol importante en la evasión de los mecanismos de inmunidad y en la persistencia a largo plazo dentro del hospedador. Así como ocurre con otros determinantes de virulencia en *B. pertussis*, el desarrollo de biofilm está regulado por el sistema Bvg, al menos *in vitro* [165]. Mishra *et al.* sugieren que el control mediado por Bvg en el desarrollo de biofilm opera en una etapa inmediata posterior a la adhesión inicial de la bacteria y que probablemente sea requerido para la producción de estructuras de superficie que permitan la interacción célula-célula, y la posterior formación de microcolonias.

### 1.7. Inmunidad: Rol de la respuesta humoral y celular

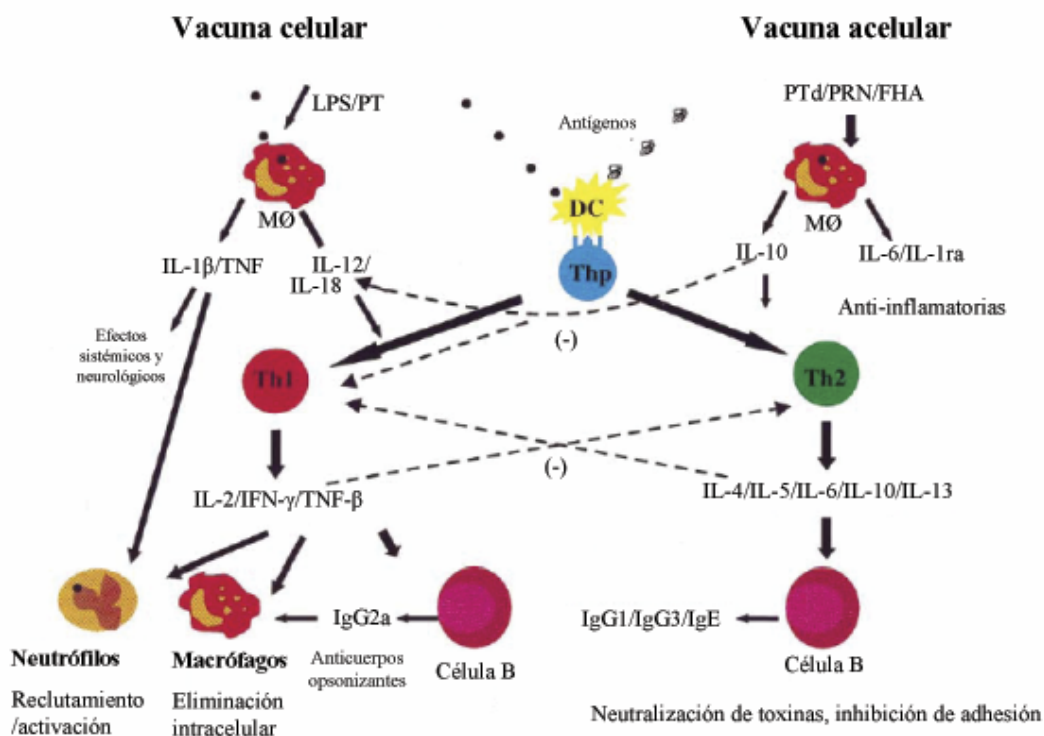
Cuando *B. pertussis* ingresa al tracto respiratorio se adhiere al epitelio respiratorio, donde la acción de toxinas bacterianas median el daño local en el pulmón causando la parálisis de las células epiteliales ciliadas y obstaculizando la eliminación del moco hacia el exterior [131, 166, 167]. La interacción de *B. pertussis* con las células epiteliales induce también la expresión de citoquinas proinflamatorias que median el reclutamiento de neutrófilos y monocitos al sitio de infección [168, 169]. Sin embargo, ciertos factores de virulencia producidos por *B. pertussis* limitan la respuesta inflamatoria local favoreciendo la permanencia de *B. pertussis* en el tracto respiratorio. Por ejemplo, se ha encontrado que PT inhibe el reclutamiento de neutrófilos en el sitio de infección retardando la eliminación de la bacteria mediada por anticuerpos [126]. También se ha encontrado que tanto ACT, como FHA inducen la secreción de interleuquinas con actividad anti-inflamatoria como IL-10 que limitan la respuesta local [71, 108, 110].

En el tracto respiratorio *B. pertussis* es eventualmente reconocida y capturada por macrófagos y células dendríticas que procesan y presentan antígenos bacterianos a las células T induciendo la generación de una respuesta inmune adaptativa [67]. Tanto la inmunidad mediada por células como la inmunidad humoral son necesarias para controlar la infección por *B. pertussis* [67].

La importancia de los anticuerpos en la protección contra *B. pertussis* ha sido demostrada en una gran variedad de estudios [83, 170-173]. Anticuerpos contra determinados antígenos de *B. pertussis* pueden prevenir la adhesión a células epiteliales del tracto respiratorio (bloqueo de adhesinas), neutralizar toxinas bacterianas, producir la aglutinación de las bacterias o promover la fagocitosis mediada por anticuerpos. Estudios realizados por nuestro grupo de investigación demuestran que la opsonización mediada por anticuerpos específicos es crucial para inducir actividad celular bactericida contra este patógeno, en ausencia de anticuerpos, *B. pertussis* sobrevive a la interacción con el neutrófilo [83, 172]. La opsonización de *B. pertussis* con IgG e IgA media el reclutamiento de receptores Fc $\gamma$  y Fc $\alpha$ , respectivamente, y la activación de motivos ITAM mediando el transporte de la bacteria fagocitada a compartimentos lisosomales donde es destruida. Un aspecto particularmente interesante de estos estudios es que de los antígenos incluidos tanto en vacunas celulares como acelulares, Prn, uno de los antígenos que presenta variaciones en zonas inmunodominantes en las cepas circulantes respecto de la cepa vacunal [174], es el único que induce anticuerpos con actividad opsonofagocítica [83], lo cual parece apoyar la hipótesis de variación antigénica en las cepas circulantes dirigida por vacunación.

La inmunidad mediada por células también ejerce un rol importante en la inmunidad contra pertussis. Los primeros estudios en el tema demostraron la existencia de una respuesta proliferativa antígeno específica en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y en células T purificadas de adultos que fueron inmunizados contra pertussis o bien sufrieron la enfermedad [173, 175]. Estos estudios, junto con otros en los cuales se da información más definitiva respecto a los clones T generados [176] demuestran que tanto la infección respiratoria como la vacunación con vacunas celulares induce la generación de células T específicas para PT, FHA y Prn y otros antígenos no identificados de *B. pertussis*. Estudios más recientes han definido el subtipo de células T CD4<sup>+</sup> inducidas por inmunización o por infección con *B. pertussis*. Los clones T derivados de adultos e infantes infectados por pertussis pertenecen principalmente a un perfil tipo Th1 [69, 178, 179]. La respuesta T en niños inmunizados con vacunas celulares y acelulares sugieren que estas vacunas inducen distintas subpoblaciones de células T CD4<sup>+</sup>, mientras las vacunas acelulares producen subpoblaciones con un perfil Th0 o un perfil tipo Th1/Th2, la inmunización con vacunas celulares, al igual que la infección natural, induce un perfil de citoquinas

predominantemente tipo Th1 [180-184] (Fig. 3). Trabajos recientes realizados en modelos murinos indican que la inmunidad protectora inducida por las vacunas celulares involucra la activación del receptor TLR4 y la producción de IL-12, IL-23 e IL-1 por células dendríticas, determinando la inducción de un perfil Th17 junto con un perfil Th1 [185]. Por el contrario, las vacunas acelulares inducen la producción de citoquinas anti-inflamatorias, como IL-5, determinando la inducción de una respuesta predominantemente Th2 [186]. Si bien la inmunidad inducida por vacunas acelulares provee protección a través de la generación de anticuerpos que previenen la adhesión de



**Figura 3. Distintos mecanismos de inmunidad inducidos con vacunas celulares y acelulares: rol central de la regulación de la respuesta tipo Th1 y Th2 en la respuesta inmune adquirida.** Las vacunas celulares incluyen toxinas bacterianas residuales, como el LPS, el cual activa la producción de citoquinas como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-18 por parte de los macrófagos y otras células del sistema inmune. Estas citoquinas proinflamatorias regulan la inducción selectiva de células Th1 a partir de células T precursoras (Thp), pero a su vez contribuyen a la generación de los efectos adversos de la inmunización con vacunas celulares. Las citoquinas secretadas por las células Th1, especialmente el INF- $\gamma$ , contribuyen con la producción de anticuerpos y la activación de macrófagos y neutrófilos para fagocitar y eliminar la bacteria. En contraste, las vacunas acelulares están desprovista de toxinas bacterianas que estimulan la producción de IL-12 e IL-18, pero incluyen componentes como FHA, el cual estimula la producción de IL-10, la cual tiene actividad anti-inflamatoria y estimula la producción de una respuesta tipo Th2. Las células Th2 contribuyen con las células B para la secreción de anticuerpos IgE y anticuerpos IgG1 e IgG3 en ratón, los cuales neutralizan toxinas y previenen la adhesión de la bacteria al tracto respiratorio. (Fuente: Mills KHG (2001) Microbes and Infection)

la bacteria al tracto respiratorio y que neutralizan toxinas (isotipo IgG1 en ratón), la respuesta Th1 parece cumplir un rol más importante en la eliminación de *B. pertussis* induciendo la producción de anticuerpos IgG2a opsonizantes y de INF- $\gamma$ . En este sentido, se ha encontrado que los ratones defectivos en INF- $\gamma$  o en su receptor, así como los ratones deplecionados de células NK, que constituyen la fuente primaria de esta citoquina durante la infección temprana, desarrollan infecciones letales diseminadas que no se observan en los controles [187-190]. Además, los ratones defectivos en el receptor de INF- $\gamma$  que han sido inmunizados con vacuna celular son menos eficientes en la eliminación de *B. pertussis* del tracto respiratorio respecto a los ratones con fenotipo salvaje. En contraste, en la inmunidad inducida por vacunas acelulares, menos efectivas que las celulares, no parece estar involucrado el INF- $\gamma$  encontrándose principalmente mediada por anticuerpos IgG1 [68, 190].

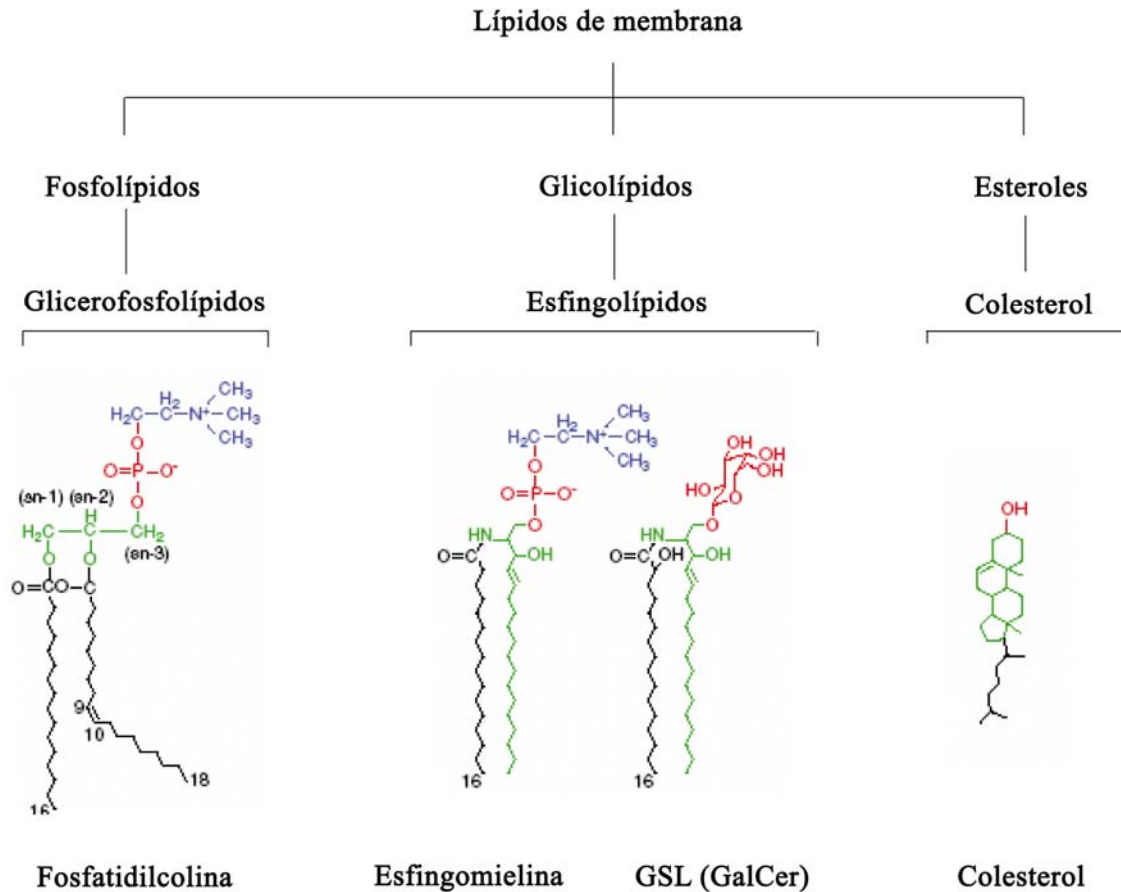
Los estudios anteriormente mencionados indican que la infección con *B. pertussis* determina la inducción de una respuesta sistémica predominantemente Th1, detectable en el bazo del ratón luego de 2 a 3 semanas de infección [191] y en PBMCs de niños afectados con tos convulsa durante la fase paroxística y convaleciente [181, 192]. Sin embargo, las células T purificadas de tejidos intersticiales del pulmón, son hipo-respondedoras a antígenos de *B. pertussis*, especialmente durante estadios tempranos de la infección [191] y los niveles de INF- $\gamma$  detectados en el pulmón se encuentran sólo modestamente elevados luego de 3 a 4 semanas de infección [191, 193]. Estos estudios sugieren que *B. pertussis* es capaz de modular la respuesta local mediada por células para prolongar su permanencia en el tracto respiratorio. Como ha sido mencionado anteriormente, varios factores de virulencia parecen estar involucrados en esta inmunomodulación (ver factores de virulencia de *B. pertussis*) [66, 70, 111, 140, 146], por ejemplo, la interleuquina-10 (IL-10) secretada por macrófagos y células dendríticas estimulados por FHA [66] y la generación de células T regulatorias [146, 194] regulan negativamente la respuesta Th1 local. En conjunto, los estudios que hay hasta el momento sugieren que *B. pertussis* ha desarrollado mecanismos de evasión que le permiten disminuir la respuesta Th1 la cual, según ha sido demostrado, es clave en la eliminación de la bacteria del tracto respiratorio. La inmunidad mediada por células, y en particular la mediada por células Th1, cumple un papel crítico en la erradicación de patógenos intracelulares, particularmente aquellos que habitan en el compartimiento vacuolar del macrófago. Si bien *B. pertussis* es reconocida como una bacteria

esencialmente extracelular, el hecho de que ha sido encontrada en localización intracelular en varios estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* y la dependencia de una respuesta Th1 para controlar y eliminar la bacteria sugieren que este patógeno podría explorar nichos intracelulares durante el período infeccioso, sin embargo, los estudios en el tema son escasos y hasta el momento no existen evidencias concretas que indiquen que *B. pertussis* es capaz de comportarse como un patógeno intracelular facultativo.

## 1.8. Rafts lipídicos y su relación con las infecciones bacterianas

### 1.8.1. Rafts lipídicos

La membrana de las células eucariotas está compuesta por tres clases de lípidos: los glicerofosfolípidos (GPL), los esfingolípidos y el colesterol (Fig. 4).

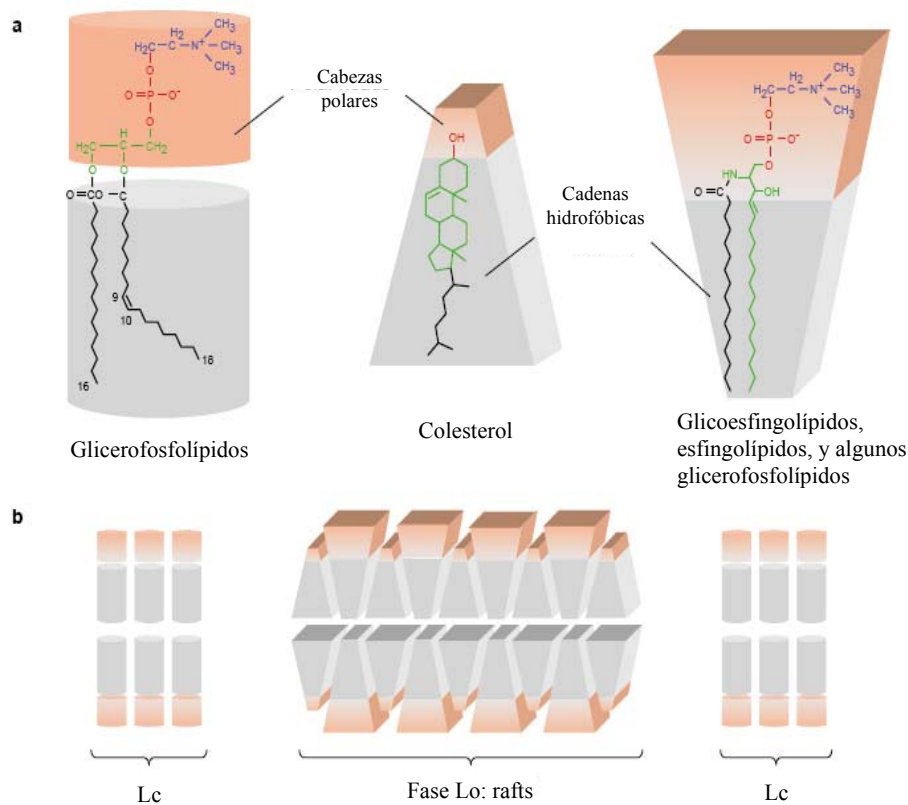


**Figura 4.** Clasificación, según su estructura, de los principales lípidos de la membrana de las células eucariotas.

Una característica distintiva de estas membranas es que poseen una composición lipídica transversalmente asimétrica. Mientras la membrana externa está compuesta principalmente de fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina (SM), la membrana interna está compuesta primordialmente de los glicerofosfolípidos fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina [195] encontrándose el colesterol enriquecido en la membrana externa debido a la alta afinidad que presenta esta molécula por SM y PC.

Actualmente se sabe que la membrana plasmática tampoco es lateralmente homogénea encontrándose compuesta por dominios lipídicos especializados denominados rafts. El concepto de rafts lipídicos fue introducido hace más de 20 años y surgió de la observación de que el colesterol y los esfingolípidos, junto con ciertas proteínas de membrana, formaban complejos insolubles luego de la solubilización de la membrana con detergente Triton X-100 a bajas temperaturas [196, 197], es por ello que los rafts lipídicos también han sido denominados membranas resistentes a detergentes “detergent-resistant membranes-DRMs”.

Estos dominios están compuestos principalmente por esfingolípidos, colesterol y proteínas ancladas a dominios lipídicos. Los esfingolípidos se asocian a través de sus ácidos grasos de cadena larga y saturada formando agrupaciones muy compactas, con reducido movimiento, estabilizadas por los puentes de hidrógeno que se producen entre los azúcares presentes en las cabezas polares. El colesterol, debido a su alta afinidad por los ácidos grasos saturados, se intercala entre las cadenas hidrocarbonadas de los esfingolípidos promoviendo la transición desde estructuras con reducido movimiento a estructuras líquidas ordenadas ( $L_o$ ) que permiten cierto movimiento lateral (Fig. 5).



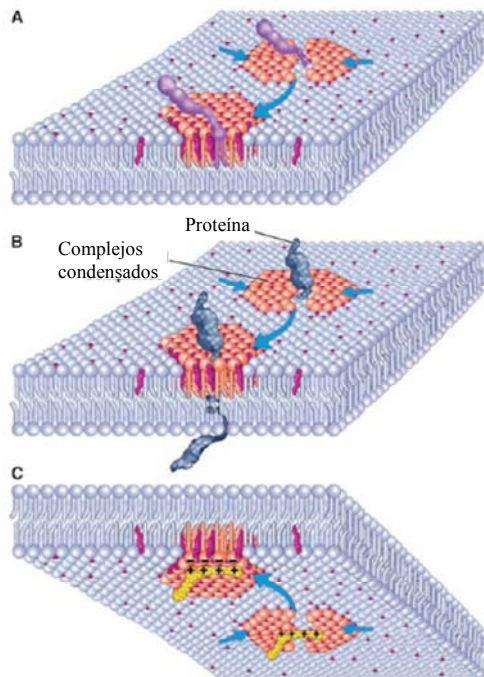
**Figura 5. Organización de los lípidos en un microdominio raft: un modelo simplificado basado en la estructura de los lípidos de membrana.** La organización de los lípidos de membrana depende de su



carácter anfipático (cabezas polares y colas hidrofóbicas), que intenta excluir el mayor número de moléculas de agua del interior de la misma. La forma Líquido cristalina (Lc) parece ser la más estable desde el punto de vista termodinámico para los lípidos “cilíndricos” como los glicerofosfolípidos. En la fase “líquido-ordenada” (Lo), los esfingolípidos, especialmente los GSL, tienen una forma piramidal, debido al mayor tamaño de su cabeza polar respecto a la región hidrofóbica, lo contrario ocurre en el colesterol, donde la región hidrofóbica ocupa mayor lugar respecto a la región polar. La inclusión de colesterol entre los glicosfingolípidos rellenaría los “huecos” que éstos dejan en las membranas. La organización cola-con-cola del colesterol en las áreas rafts darían rigidez a la membrana interna citoplasmática, la cual está virtualmente desprovista de esfingolípidos pero contiene algunos glicerofosfolípidos (GPL) selectos (por ej: fofatidilinositol y fosfatidiletanolamina con cadenas acil-saturadas) con propiedades fisicoquímicas cercanas a las de las esfingomielinas. (Fuente: Fantini J. *et. al.* (2002) *Expert Rev Mol Med*).

Estas membranas en movimiento líquido ordenado son conocidas como “rafts” o balsas lipídicas y se diferencian de la bicapa de fosfolípidos circundante porque ésta última permanece en una fase líquido desordenada, también llamada fluido líquido cristalina (Lc), debido a las cadenas insaturadas de los fosfolípidos. Se puede decir que los rafts lipídicos son dominios relativamente ordenados que flotan en la desordenada bicapa fosfolipídica (Fig. 5).

Estudios realizados utilizando microscopía de fuerza atómica indican que los rafts miden aproximadamente 50 nm y solo una limitada cantidad de proteínas forman parte de estos dominios. La presencia de caveolina, una proteína con afinidad por el colesterol, define un tipo particular de dominio raft llamado caveola, caracterizado por la presencia de invaginaciones locales (50-100 nm de diámetro) en la membrana plasmática [196]. Los rafts lipídicos, incluidas las caveolas, están particularmente enriquecidos en proteínas que participan en transducción de señales [198, 199] (Fig. 6). Entre ellas se incluyen: 1) Proteínas externas asociadas a la membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI), entre las que se encuentran CD14 (receptor de LPS bacterianos), CD16 (FcγRIIIb), CD48 y CD58 (moléculas de adhesión/coestimulación). Aunque estas proteínas no poseen un dominio transmembrana o citoplasmático, muchas de ellas son capaces de activar la transducción de señales a través de su interacción con moléculas efectoras presentes en los rafts. 2) Proteínas transmembrana, por ejemplo, el receptor de IgE (FcεRI). 3) Proteínas citoplasmáticas que se asocian a la cara interna de los rafts a través de acilaciones, entre ellas se encuentran las proteínas pertenecientes a la familia de las Src tirosin quinasa, doblemente aciladas, que se encuentran asociadas



**Figura 6. Proteínas ancladas a dominios rafts.** El colesterol (púrpura) y los esfingolípidos (naranja) se asocian entre sí para formar dominios ricos en colesterol en la membrana. Las cabezas polares de los esfingolípidos sobresalen por sobre las cabezas de los fosfolípidos debido a su larga cadena de ácidos. A) Proteína anclada por GPI (violeta). B) Proteína transmembrana. C) Proteína básica (amarillo) anclada a la superficie interna de la membrana plasmática compuesta principalmente por colesterol y fosfatidilserina. (Fuente: Anderson RG & Jacobson K (2002) Science)

a estos dominios a través de cadenas de ácidos grasos saturadas. La acilación es un proceso post-traduccional lábil y reversible, lo que da a las células la potencialidad de modificar y así controlar la asociación de estas proteínas a los rafts. Otro tipo de asociación que se ha observado es por interacciones electrostáticas entre aminoácidos cargados en una proteína y la carga opuesta en la cabeza polar de los fosfolípidos.

### 1.8.2. Análisis de rafts lipídicos en las membranas celulares: Técnicas bioquímicas y morfológicas

La característica partición de los rafts lipídicos en fases líquidas ordenadas determina que los mismos sean relativamente insolubles en Triton X-100 a 4 °C [197, 200]. Debido a ello, los rafts pueden ser purificados como membranas insolubles en detergentes (DIMs) o membranas resistentes a detergentes (DRMs) por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa siendo esta técnica una de las más usadas para su estudio. Bajo estas condiciones, los DRMs son recuperados como complejos moleculares en fracciones de baja densidad. La migración de los rafts lipídicos hacia estas zonas es consistente con el alto contenido de lípidos presente en los mismos. El

análisis bioquímico de estas fracciones indica que los DRMs se encuentran enriquecidos en glicosfingolípidos, esfingomiélin y colesterol, encontrándose, a excepción del fosfatidilinositol, relativamente pobres en glicofosfolípidos lo cual está de acuerdo con el concepto de que las cadenas aciladas saturadas favorecen la asociación de los rafts [201]. Dado que este método requiere el aislamiento a bajas temperaturas y la presencia de detergentes, se ha generado una gran controversia respecto a si los rafts lipídicos existían realmente o eran simples artefactos producto de los métodos utilizados para su aislamiento. Numerosos experimentos, tanto *in vivo* como *in vitro*, han sido realizados para confirmar su existencia, pero quizá uno de los más definitivos ha sido el aislamiento de rafts en ausencia de detergentes [202]. El posterior análisis de estos microdominios aislados sin detergentes determinó que presentaban la misma composición que los aislados por el método tradicional.

Otra técnica popularmente utilizada para estudiar la estructura y función de los dominios rafts es la utilización de drogas capaces de extraer el colesterol de la membrana plasmática. El colesterol es una molécula clave necesaria para mantener la integridad de los rafts, su remoción de la membrana plasmática determina la dispersión de lípidos y proteínas asociadas a los mismos. Un compuesto comúnmente utilizado para remover el colesterol de membrana es la metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) [203], esta molécula es capaz de disolver lípidos en sus núcleos hidrofóbicos lo cual conlleva a la depleción del colesterol de la membrana plasmática seguido por la disociación de las proteínas asociadas a los rafts [204]. El mecanismo que permite a las ciclodextrinas remover el colesterol de las membranas celulares está relacionado con su habilidad para reducir la energía de activación para el reflujo de colesterol. El tratamiento de las células con agentes unidores de colesterol, como nistatina o filipina [205, 206], o la inhibición de la síntesis de colesterol con lovastatina, un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa [207], son otras de las estrategias utilizadas para desorganizar los rafts lipídicos resultando en la dispersión de las proteínas que pertenecen a los mismos.

También se han llevado a cabo estudios morfológicos para estudiar la localización de lípidos y proteínas asociados a dominios rafts de la membrana plasmática [208]. Por ejemplo, la colocalización de varias proteínas asociadas a rafts con el ganglioso GM1 o con la proteína flotilina, ambos marcadores de dominios rafts, ha sido demostrada en varios tipos celulares mediante microscopía confocal [209-211].

Técnicas microscópicas más modernas, como microscopía de fuerza atómica [212] y FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) [213] confirmaron la existencia de los rafts en las membranas celulares.

### 1.8.3. Rafts lipídicos y señalización intracelular

Hoy se sabe que los rafts lipídicos controlan numerosas interacciones lípido-lípido y proteína-lípido a través de su capacidad de coalescer formando grandes dominios en la membrana plasmática. La coalescencia entre dominios rafts permite a ciertas proteínas previamente separadas unirse regulando procesos complejos como los involucrados en la transducción de señales. Se especula que pequeños rafts presentes en una célula en reposo mantienen la señalización proteica en un estado-*off*. La estimulación de la célula induce el reclutamiento de estos pequeños dominios rafts, determinando la formación de dominios especializados en donde los patrones de señalización convergen y se activan [199, 214]. Esta señalización vía rafts lipídicos también involucra proteínas previamente no asociadas a los dominios rafts. El modelo de “coalescencia” en la transducción de señales puede ser ilustrado utilizando como ejemplo la señalización en la célula inmune [215-217]. El entrecruzamiento de los receptores de la célula T (TCR) o los receptores de la célula B (BCR) determina un aumento en su afinidad por los rafts lipídicos estabilizando su asociación con estos dominios y promoviendo su coalescencia durante el reconocimiento inmune de la célula T o de la célula B. La agregación de los rafts también favorece el acercamiento de las moléculas coestimuladoras CD4 y CD8 a los receptores de antígenos, lo cual es necesario para la correcta activación de la célula T [218].

Los rafts lipídicos no sólo son requeridos para la respuesta inmune adaptativa, también están involucrados en el reconocimiento inmune innato [219]. El receptor tipo toll 4 (TLR-4) se asocia con dominios rafts luego de la estimulación celular con LPS bacteriano. El TLR-4 no se encuentra normalmente en rafts, pero la unión del LPS al receptor anclado por GPI, CD14, dispara la asociación del TLR-4 con los rafts lipídicos, lo cual dispara la producción de citoquinas que intervienen en el montaje de la respuesta inmune frente al patógeno.

#### 1.8.4. Interacción de dominios rafts con microorganismos

Los rafts lipídicos son sitio de anclaje celular de una gran variedad de patógenos, entre los cuales se incluyen virus, bacterias, hongos y parásitos [199, 220-224]. Estos microorganismos interactúan tanto con las proteínas como con los lípidos asociados a estos dominios como sitios de adhesión (Tabla 1). Los residuos oligosacáridicos de los glicosfingolípidos (GSL) están proyectados hacia el espacio extracelular, proveyendo un considerable número de carbohidratos que son potenciales sitios de unión para adhesinas microbianas. La especificidad de secuencia del carbohidrato no es el único parámetro que controla la unión de un determinado patógeno, sino que también se requiere una densidad crítica de GSL sobre la superficie bacteriana para mediar la unión, lo cual sugiere que los GSL son activos sólo cuando se encuentran concentrados

**Tabla 1. Interacción patógeno bacteriano-raft lipídico. Receptores involucrados.**

| Patógeno                                      | Sitio de unión/Receptor  | Referencia |
|---|--|------------|
| <i>Helicobacter pylori</i>                    | GalCer, sulfatido, LacCer, GM3, glicoproteínas                       | [223, 224] |
| <i>Shigella</i>                               | GSL no identificado, CD44  | [226]      |
| <i>Salmonella</i>                             | CD55 (proteína anclada por GPI)                                      | [227]      |
| <i>Borrelia burgdorferi</i>                   | GalCer, LacCer, Gb3, GD1a, GT1b                                      | [228]      |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>               | Motivo GalNac $\beta$ 1-4 Gal en varios GSL                          | [229]      |
| <i>Mycobacterium</i>                          | Colesterol   | [230, 231] |
| <i>Brucella</i>                               | PrPc (cellular prion protein), GM1                                   | [232, 233] |
| <b>Fim H y Dr (+) <i>Escherichia coli</i></b> | CD48 (proteína anclada por GPI)<br>CD55, integrina $\alpha_5\beta_1$ | [234, 235] |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i>               | TLR2, CR3, CD14?   | [236]      |
| <i>Francisella tularensis</i>                 | No identificado  | [237]      |

en un dominio raft formando una plataforma operacional de adhesión [225]. Por lo tanto, mientras la unión individual entre una determinada adhesina y el GSL puede ser débil, la avidéz se ve incrementada significativamente dentro del entorno raft. Se ha encontrado que en la mayoría de los casos la unión de un determinado patógeno a la superficie celular requiere la presencia de GSL y de un segundo componente, generalmente una proteína, la que puede ser una proteína anclada a GPI o una proteína transmembrana. En estos casos se reconocen tres pasos en el proceso de adhesión [225].

Primero, el patógeno se adhiere a un dominio raft con un número determinado de sitios de unión a GSL, el raft “flota” sobre la superficie celular hasta que se encuentra con un receptor proteico de alta afinidad para el patógeno. Por último, el complejo GSL-patógeno-receptor se estabiliza dentro del dominio raft.

#### 1.8.5. Rafts lipídicos: sitios de entrada y evasión inmune

Los patógenos persistentes han desarrollado mecanismos de evasión de la respuesta inmune. Muchas de las señales involucradas en la respuesta inmune adaptativa y en la innata se inician en los rafts. Algunos microorganismos patógenos, en general de difícil erradicación, han desarrollado estrategias para subvertir estas señales utilizando la maquinaria de los rafts lipídicos para invadir y sobrevivir en las células del huésped. Esto se debe a que la entrada a través de los rafts lipídicos confiere ciertas ventajas entre las cuales se encuentran la evasión de la vía endocítica que conlleva a la degradación bacteriana, y la puesta en marcha de mecanismos de señalización celular que determinan la internalización no bactericida del patógeno [238]. Bacterias como *Mycobacterium spp.*, *Salmonella typhimurium*, *S. flexneri*, *Brucella spp.*, y *Legionella pneumophila* entran a la célula huésped a través de los rafts lipídicos y ello les permite permanecer en fagosomas que no maduran a fagolisosomas gracias a lo cual pueden sobrevivir dentro de células fagocíticas profesionales y no profesionales [230, 231, 233, 239-241]. La fagocitosis de *Escherichia coli* es otro ejemplo de este mecanismo. Esta bacteria expresa la adhesina asociada a pili tipo I, FIM-H, a través de la cual se une a CD48, ubicada en dominios rafts. Este tipo de unión a la célula inmune determina que la bacteria sobreviva a la interacción, mientras que la fagocitosis mediada por anticuerpos conlleva a la degradación del patógeno. Estas investigaciones confirman que el tipo de receptores utilizados para ingresar a la célula inmune puede, en gran medida, determinar el destino final del patógeno y que los sitios rafts son particularmente propicios para la interacción no bactericida entre ciertos patógenos y su hospedador [242, 243].

Hay al menos dos estrategias utilizadas por los patógenos bacterianos para evadir la acción bactericida de la vía degradativa que dependen de la asociación del patógeno con los rafts lipídicos. Una de ellas está basada en la incorporación de componentes de los rafts lipídicos en la membrana del fagosoma que determina un tráfico intracelular que resulta beneficioso para el microorganismo. Tal es el caso de

*Chlamydia spp.* que merced a su asociación con rafts lipídicos transita a través del aparato de Golgi donde el fagosoma secuestra vesículas conteniendo esfingolípidos y colesterol. De esta manera, el fagosoma bacteriano se encuentra enmascarado por estas moléculas simulando un origen biosintético [244]. Una segunda estrategia utiliza la entrada a través de dominios rafts para evadir la fusión del fagosoma con compartimientos lisosomales a través del reclutamiento de moléculas específicas. Los rafts lipídicos no están distribuidos estocásticamente a lo largo de la vía endosomal, sino que se encuentran protegidos de la vía degradativa [245], debido a ello el contenido de rafts lipídicos en endosomas tardíos y lisosomas es limitado. La incorporación de componentes proteicos o lipídicos pertenecientes a dominios rafts a la membrana del fagosoma podría limitar la accesibilidad de la bacteria a la maquinaria de procesamiento y presentación de antígenos resultando en la evasión del sistema inmune adaptativo [238]. Por ejemplo, los fagosomas conteniendo *Mycobacterium spp.*, reclutan la proteína TACO (*tryptophan-aspartate containing coat protein*) que previene la fusión con lisosomas [241]. TACO se asocia con la membrana del fagosoma por medio del colesterol reclutado durante la entrada de la bacteria a través de los dominios rafts. Esto inhibe la maduración del fagosoma y permite la sobrevivencia en este tipo de vesículas.

Muchas bacterias a través de su interacción con dominios rafts parasitan las cascadas de señalización de la célula huésped favoreciendo su propio ingreso. Tal es el caso de *S. flexneri* y *S. typhimurium*. Estas bacterias utilizan un mecanismo disparador multifactorial que involucra la secreción de invasinas bacterianas mediante el sistema de secreción tipo III una vez que la bacteria entra en contacto con la célula huésped. Estas proteínas interaccionan directamente con la membrana plasmática o con proteínas citosólicas para inducir pliegues en sitios localizados de la membrana (“membrane ruffling”) que engloban la bacteria promoviendo su internalización. Debido a que los rafts lipídicos están involucrados en el control espacial del ensamblaje de los filamentos de actina, se ha sugerido que algunas de las proteínas que interaccionan con las invasinas bacterianas se encuentran asociadas a rafts. Tal es el caso de IpaB de *S. flexneri* la cual a través de su interacción con CD44 induce cambios en el nivel de actividad de determinadas GTPasas de la familia Rho, que producen la reorganización del citoesqueleto de actina [246].

Si bien la interacción de *B. pertussis* con dominios rafts lipídicos no ha sido descrita ni estudiada, resulta particularmente interesante el hecho de que *B. pertussis*

presente alta afinidad por ciertos componentes, como lactosilceramidas y asialo-GM1 [247, 248], involucrados en la formación de dominios rafts. Dado el enorme avance que ha generado el estudio de los rafts lipídicos y su relación con ciertas patologías infecciosas en el conocimiento de los mecanismos de patogénesis de una gran variedad de microorganismos, resulta sumamente interesante estudiar el rol que desempeñan estos dominios en la interacción de *B. pertussis* con el hospedador.



## 1.9. Antecedentes y objetivos de este trabajo

Los patógenos, luego de co-evolucionar durante largos años 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. 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 de *B. pertussis* [6, 67], indicando que la 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. Si bien *B. pertussis* ha sido considerada históricamente un patógeno extracelular, una gran cantidad de trabajos sugieren que *B. pertussis* es capaz de invadir células epiteliales y del sistema inmune bajo determinadas circunstancias [63, 150, 151, 153, 154]. En particular, en trabajos previos de nuestro grupo, se ha encontrado que aunque en presencia de anticuerpos la interacción de *B. pertussis* con los neutrófilos determina la destrucción de la bacteria, la ausencia de los mismos determina que los mecanismos de intoxicación dependientes de metabolitos reactivos del oxígeno no se disparen favoreciendo la sobrevida bacteriana [172, 249].

A pesar de las implicancias que tendría la existencia de un estadio intracelular durante el período infeccioso de *B. pertussis* en el desarrollo de vacunas y en el tipo de inmunidad que las mismas deben inducir, son relativamente escasos los trabajos de investigación tendientes a evaluar esta posibilidad y caracterizar los mecanismos que permitirían a *B. pertussis* sobrevivir intracelularmente. La afinidad que *B. pertussis* presenta por lactosilceramidas y asialo-GM1 [247, 248], moléculas presentes en rafts lipídicos, sugiere que este patógeno es capaz de interaccionar con dominios rafts lipídicos, potencialmente involucrados en la adhesión e ingreso no bactericida de una gran variedad de patógenos de difícil erradicación a las células del hospedador. Debido a ello, en la presente tesis se estudió si estos dominios están involucrados en la interacción de *B. pertussis* con las células del hospedador, la sobrevida intracelular como eventual mecanismo de persistencia y el rol de los rafts lipídicos en este proceso.

A modo de resumen, los estudios realizados para definir la relevancia de los rafts

lipídicos en el proceso de adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales están descritos en el **Capítulo 2**, estos estudios indican que *B. pertussis* se adhiere a dominios lipídicos en un proceso dependiente de FHA. En el **Capítulo 3** se describen los estudios realizados para evaluar la capacidad de *B. pertussis* para invadir y sobrevivir en células epiteliales respiratorias y el rol de los rafts en este proceso. Los estudios indican que *B. pertussis* ingresa a las células epiteliales por un mecanismo dependiente de rafts lipídicos, microtúbulos y la activación de tirosin quinasas. Un porcentaje de bacterias es capaz de sobrevivir en localización intracelular lo que sugiere que la invasión de células epiteliales podría constituir un mecanismo de evasión de la respuesta inmune. En el **Capítulo 4** se describen los estudios realizados para caracterizar la interacción de *B. pertussis* con neutrófilos humanos en presencia y en ausencia de anticuerpos opsonizantes y el rol de los rafts lipídicos en la evasión de la respuesta inmune. Los estudios indican que bajo condiciones no opsonizantes *B. pertussis* es capturada y fagocitada a través de dominios rafts lo que determina que la bacteria sea transportada a compartimientos no lisosomales donde evade la acción bactericida de estas células inmunes. Por el contrario, la fagocitosis mediada por anticuerpos conlleva a la inactivación de la bacteria en compartimientos lisosomales poniendo énfasis en la importancia de la presencia de anticuerpos opsonizantes en el sitio de infección. En el **Capítulo 5** se describen estudios que evalúan el tráfico intracelular de *B. pertussis* luego de ser fagocitada por los macrófagos humanos así como los mecanismos de sobrevivencia a largo plazo. Los estudios indican que bajo condiciones no opsonizantes *B. pertussis* no sólo es capaz de sobrevivir por varios días dentro de los macrófagos sino que es capaz de replicar en compartimientos con características de endosomas tempranos. A su vez, estos estudios indican que la presencia de anticuerpos opsonizantes es fundamental para prevenir la replicación intracelular. En el **Capítulo 6** se presenta la Discusión General de este trabajo. En un **Anexo** de esta Tesis se presentan los estudios realizados para evaluar el rol de la variación antigénica en Prn, único antígeno presente en las actuales formulaciones vacunales que induce la producción de anticuerpos opsonizantes, en la evasión de las cepas circulantes a la respuesta inmune inducida por vacunación.

## Referencias

1. Cone TC, Jr. **Whooping cough is first described as a disease sui generis by Baillou in 1640.** Pediatrics. 1970;46:522.
2. Bordet J, Gengou O. **Le microbe de la coqueluche.** Ann Inst Pasteur Microbiol. 1906;20:48-68.
3. Ledermann WD. **Breve historia de la *Bordetella pertussis*, una elusiva damisela.** Revista chilena de infectología 2004;21:241-246.
4. Crowcroft NS, Stein C, Duclos P, Birmingham M. **How best to estimate the global burden of pertussis?** Lancet Infect Dis. 2003;3:413-418.
5. Cherry JD. **Epidemiological, Clinical, and Laboratory Aspects of Pertussis in Adults.** Clinical Infectious Diseases 1999;28:S112-S117.
6. 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;18:326-382.
7. Wheeler JG, Simmons AL. **Pertussis update.** Pediatr Infect Dis J. 2005;24:829-830.
8. Edwards K, Freeman DM. **Adolescent and adult pertussis: disease burden and prevention.** Curr Opin Pediatr. 2006;18:77-80.
9. Mink CM, Cherry JD, Christenson P, Lewis K, Pineda E, Shlian D, Dawson JA, Blumberg DA. **A search for *Bordetella pertussis* infection in university students.** Clin Infect Dis. 1992;14:464-471.
10. Fine PE, Clarkson JA. **The recurrence of whooping cough: possible implications for assessment of vaccine efficacy.** Lancet. 1982;1:666-669.
11. Sintchenko V. **The re-emergence of pertussis: implications for diagnosis and surveillance.** New South Wales Public Health Bulletin 2008;19:143-145.
12. Fingerhann M, Fernandez J, Sisti F, Rodríguez 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;24:3513-3521.
13. Halperin SA. **The Control of Pertussis.** N Engl J Med 2007;356:110-113.
14. McIntyre Pabc, Wood Nabc. **Pertussis in early infancy: disease burden and preventive strategies.** Current Opinion in Infectious Diseases June 2009;22:215-223.
15. 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, Fingerhann M, Graieb A. **Pertussis epidemiology in Argentina: trends over 2004-2007.** J Infect. 2009;59:225-231.
16. Riffelmann M, Littmann M, Hulsse C, Hellenbrand W, Wirsing von König CH. **Pertussis: Not Only a Disease of Childhood.** Dtsch Arztebl Int. 2008;105:623-628.
17. Cotter PA, Miller JF, Groisman EA. **Principles of Bacterial Pathogenesis.** London, United Kingdom.: Academic Press, Ltd. 2001:619-674.
18. 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;23:985-989.

19. 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. 1995,21:1211-1219.
20. Beiter A, Lewis K, Pineda EF, Cherry JD. **Unrecognized maternal peripartum pertussis with subsequent fatal neonatal pertussis.** Obstet Gynecol. 1993,82:691-693.
21. Christie CD, Baltimore RS. **Pertussis in neonates.** Am J Dis Child. 1989,143:1199-1202.
22. Hoppe JE. **Neonatal pertussis.** Pediatr Infect Dis J. 2000,19:244-247.
23. McGregor J, Ogle JW, Curry-Kane G. **Perinatal pertussis.** Obstet Gynecol. 1986,68:582-586.
24. Mikelova LK, Halperin SA, Scheifele D, Smith B, Ford-Jones E, Vaudry W, Jadavji T, Law B, Moore D; Members of the Immunization Monitoring Program, Active (IMPACT). **Predictors of death in infants hospitalized with pertussis: a case-control study of 16 pertussis deaths in Canada.** The Journal of Pediatrics 2003,143:576-581.
25. Cherry JD, Grimprel E, Guiso N, Heininger U, Mertsola J. **Defining pertussis epidemiology: clinical, microbiologic and serologic perspectives.** Pediatr Infect Dis J. 2005,24:S25-34.
26. 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. 1993,12:504-509.
27. Heininger U, Klich K, Stehr K, Cherry JD. **Clinical Findings in *Bordetella pertussis* Infections: Results of a Prospective Multicenter Surveillance Study.** Pediatrics 1997,100:e10-.
28. Long SS, Lischner HW, Deforest A, Clark JL. **Serologic evidence of subclinical pertussis in immunized children.** Pediatr Infect Dis J. 1990,9:700-705.
29. Long SS, Welkon CJ, Clark JL. **Widespread silent transmission of pertussis in families: antibody correlates of infection and symptomatology.** J Infect Dis. 1990,161:480-486.
30. Yeh SH, Mink CM. **Shift in the epidemiology of pertussis infection: an indication for pertussis vaccine boosters for adults?** Drugs. 2006,66:731-741.
31. Forsyth KD, Campins-Marti M, Caro J, Cherry JD, Greenberg D, Guiso N, Heininger U, Schellekens J, Tan T, von König CH, Plotkin S; Global Pertussis Initiative. **New pertussis vaccination strategies beyond infancy: recommendations by the global pertussis initiative.** Clin Infect Dis. 2004,39:1802-1809.
32. De Serres G, Duval B. **Pertussis vaccination beyond childhood.** The Lancet 2005,365:1015-1016.
33. Altunajji S, Kukuruzovic R, Curtis N, Massie J. **Antibiotics for whooping cough (pertussis).** Cochrane Database Syst Rev. 2007:CD004404.
34. González-Hachero J. **Diagnóstico y tratamiento de la tos ferina.** Vox Paediatrica, 1999,7:135-138.
35. Cotter PA, DiRita VJ. **Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective.** Annu Rev Microbiol. 2000,54:519-565.
36. Cotter PA, Jones AM. **Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*.** Trends Microbiol 2003,11:367-373.

37. Stibitz S, Yang MS. **Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the vir locus of *Bordetella pertussis***. J. Bacteriol. 1991,173:4288-4296.
38. Boucher P, Stibitz S. **Synergistic binding of RNA polymerase and BvgA phosphate to the pertussis toxin promoter of *Bordetella pertussis***. J. Bacteriol. 1995,177:6486-6491.
39. Deora R, Bootsma HJ, Miller JF, Cotter PA. **Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene**. Mol Microbiol. 2001,40:669-683.
40. Melton AR, Weiss AA. **Characterization of environmental regulators of *Bordetella pertussis***. Infect. Immun. 1993,61:807-815.
41. Merkel TJ, Boucher PE, Stibitz S, Grippe VK. **Analysis of bvgR expression in *Bordetella pertussis***. J Bacteriol. 2003,185:6902-6912.
42. Merkel TJ, Barros C, Stibitz S. **Characterization of the bvgR locus of *Bordetella pertussis***. J Bacteriol. 1998,180:1682-1690.
43. 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. 2005,73:748-760.
44. 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. 1998,66:4640-4650.
45. Comeau DE, Ikenaka K, Tsung KL, 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. 1985,164:578-584.
46. Alpuche Aranda CM, Swanson JA, Loomis WP, Miller SI. ***Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes**. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992,89:10079-10083.
47. Miller SI, Kukral AM, Mekalanos JJ. **A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence**. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989,86:5054-5058.
48. Zimna K, Medina E, Jungnitz H, Guzmán CA. **Role played by the response regulator Ris in *Bordetella bronchiseptica* resistance to macrophage killing**. FEMS Microbiology Letters 2001,201:177-180.
49. 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. 2005,73:5995-6004.
50. Croinin TO, Grippe VK, Merkel TJ. **Activation of the vrg6 Promoter of *Bordetella pertussis* by RisA**. J. Bacteriol. 2005,187:1648-1658.
51. Mazar J, Cotter PA. **Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion**. Mol Microbiol 2006,62:641-654.
52. Boucher PE, Yang M-S, Schmidt DM, Stibitz S. **Genetic and Biochemical Analyses of BvgA Interaction with the Secondary Binding Region of the fha Promoter of *Bordetella pertussis***. J. Bacteriol. 2001,183:536-544.

53. Roy CR, Falkow S. **Identification of *Bordetella pertussis* regulatory sequences required for transcriptional activation of the fhaB gene and autoregulation of the bvgAS operon.** J. Bacteriol. 1991,173:2385-2392.
54. 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. 2000,275:30202-30210.
55. Jacob-Dubuisson F, El-Hamel C, Saint N, Guédin 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. 1999,274:37731-37735.
56. 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.** Molecular Microbiology 2006,61:368-382.
57. 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. 2001,20:5040-5048.
58. Rodriguez ME, Hellwig SMM, Perez Vidakovics MLA, Berbers GAM, van de Winkel JGJ. ***Bordetella pertussis* attachment to respiratory epithelial cells can be impaired by fimbriae-specific antibodies.** FEMS Immunol Med Microbiol 2006,46:39-47.
59. 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. 2006,48:140-147.
60. Relman DA, Domenighini M, Tuomanen E, Rappuoli R, Falkow S. **Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1989,86:2637-2641.
61. Ishibashi Y, Claus S, Relman D. ***Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18).** J. Exp. Med. 1994,180:1225-1233.
62. Ishibashi Y, Yoshimura K, Nishikawa A, Claus S, Laudanna C, Relman DA. **Role of phosphatidylinositol 3-kinase in the binding of *Bordetella pertussis* to human monocytes.** Cellular Microbiology 2002,4:825-833.
63. 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. 2001,30:279-288.
64. Prasad SM, Yin Y, Rodzinski E, Tuomanen EI, Masure HR. **Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*.** Infect Immun. 1993,61:2780-2785.
65. Hannah JH, Menozzi FD, Renauld G, Loch C, Brennan MJ. **Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA.** Infect Immun. 1994,62:5010-5019.
66. McGuirk P, Mills K. **Direct anti-inflammatory effect of a bacterial virulence factor: IL-10-dependent suppression of IL-12 production by filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*.** European Journal of Immunology 2000,30:415-422.
67. Mills KHG. **Immunity to *Bordetella pertussis*.** Microbes and Infection 2001,3:655-677.

68. 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. 1993,61:399-410.
69. Hafler JP, Pohl-Koppe A. **The cellular immune response to *Bordetella pertussis* in two children with whooping cough.** Eur J Med Res. 1998,3:523-526.
70. Boschwitz JS, Batanghari JW, Kedem H, Relman DA. ***Bordetella pertussis* infection of human monocytes inhibits antigen-dependent CD4 T cell proliferation.** J Infect Dis. 1997,176:678-686.
71. Abramson T, Kedem H, Relman DA. **Modulation of the NF-KB Pathway by *Bordetella pertussis* Filamentous Hemagglutinin.** PLoS ONE 2008,3:e3825.
72. Mooi FR, van der Heide HGJ, ter Avest AR, Welinder KG, Livey I, van der Zeijst BA, Gaastra W. **Characterization of fimbrial subunits from *Bordetella* species.** Microbial Pathogenesis 1987,2:473-484.
73. 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/pha gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA.** Mol Microbiol. 1994,11:337-347.
74. 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. 1995,171:924-929.
75. 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.** Microbial Pathogenesis 1992,12:127-135.
76. Hazenbos WL, van den Berg BM, van't Wout JW, Mooi FR, van Furth R. **Virulence factors determine attachment and ingestion of nonopsonized and opsonized *Bordetella pertussis* by human monocytes.** Infect Immun. 1994,62:4818-4824.
77. Geuijen C, Willems R, Bongaerts M, Top J, Gielen H, Mooi F. **Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract.** Infect. Immun. 1997,65:4222-4228.
78. Hazenbos W, van den Berg B, Geuijen C, Mooi F, 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 1995,155:3972-3978.
79. Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. **Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*.** Vaccine 1998,16:1907-1916.
80. Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, Stehr K. **A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses.** Vaccine 1998,16:1901-1906.
81. Henderson IR, Nataro JP. **Virulence Functions of Autotransporter Proteins.** Infect. Immun. 2001,69:1231-1243.
82. Emsley P, McDermott G, Charles IG, Fairweather NF, Isaacs NW. **Crystallographic Characterization of Pertactin, a Membrane-associated Protein from *Bordetella pertussis*.** Journal of Molecular Biology 1994,235:772-773.
83. 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. 2003,188:738-742.
84. Cherry JD. **Comparative efficacy of acellular pertussis vaccines: an analysis of recent trials.** Pediatr Infect Dis J. 1997,16:S90-96.

85. Cherry J, Heininger U. **Pertussis and other *Bordetella* infections.** In R. D. Feigin, J. D. Cherry, G. J. Demmler, and S. Kaplan (ed.), Textbook of pediatric infectious diseases, 5th ed. The W. B. Saunders Co, Philadelphia, Pa. 2004:1588-1608.
86. Finn TM, Stevens LA. **Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant.** Mol Microbiol. 1995,16:625-634.
87. Fernandez RC, Weiss AA. **Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus.** Infect. Immun. 1994,62:4727-4738.
88. Finn TM, Amsbaugh DF. **Vag8, a *Bordetella pertussis* bvg-Regulated Protein.** Infect. Immun. 1998,66:3985-3989.
89. Barnes MG, Weiss AA. **BrkA Protein of *Bordetella pertussis* Inhibits the Classical Pathway of Complement After C1 deposition.** Infect Immun. 2001,69:3067-3072.
90. Welch RA. **Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria.** Mol Microbiol. 1991,5:521-528.
91. Rose T, Sebo P, Bellalou J, Ladant D. **Interaction of Calcium with *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin.** J. Biol. Chem. 1995,270:26370-26376.
92. Glaser P, Sakamoto H, Bellalou J, Ullmann A, Danchin A. **Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*.** Embo J. 1988,7:3997-4004.
93. Hewlett E, Gordon V, McCaffery J, Sutherland W, Gray M. **Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Identification and purification of the holotoxin molecule.** J. Biol. Chem. 1989,264:19379-19384.
94. Rogel A, Schultz JE, Brownlie RM, Coote JG, Parton R, Hanski E. ***Bordetella pertussis* adenylate cyclase: purification and characterization of the toxic form of the enzyme.** Embo J. 1989,8:2755-2760.
95. Rogel A, Meller R, Hanski E. **Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. The relationship between induction of cAMP and hemolysis.** J. Biol. Chem. 1991,266:3154-3161.
96. Zaretzky F, Gray M, Hewlett E. **Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of *Bordetella pertussis*: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction.** Molecular Microbiology 2002,45:1589-1598.
97. 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. 2001,193:1035-1044.
98. 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. 2003,278:38514-38521.
99. Wolff J, Cook GH, Goldhammer AR, Berkowitz SA. **Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1980,77:3841-3844.
100. Confer DL, Slungaard AS, Graf E, Panter SS, Eaton JW. ***Bordetella* adenylate cyclase toxin: entry of bacterial adenylate cyclase into mammalian cells.** Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res. 1984,17:183-187.
101. Hanski E, Farfel Z. ***Bordetella pertussis* invasive adenylate cyclase. Partial resolution and properties of its cellular penetration.** J. Biol. Chem. 1985,260:5526-5532.



102. Hanski E. **Invasive adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis***. Trends in Biochemical Sciences 1989,14:459-463.
103. Moulallem M, Farfel Z, Hanski E. ***Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: intoxication of host cells by bacterial invasion**. Infect. Immun. 1990,58:3759-3764.
104. Gray MC, Donato GM, Jones FR, Kim T, Hewlett EL. **Newly secreted adenylate cyclase toxin is responsible for intoxication of target cells by *Bordetella pertussis***. Mol Microbiol. 2004,53:1709-1719.
105. Confer DL, Eaton JW. **Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase**. Science. 1982,217:948-950.
106. Khelef N, Zychlinsky A, Guiso N. ***Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin**. Infect Immun. 1993,61:4064-4071.
107. Pearson RD, Symes P, Conboy M, Weiss AA, Hewlett EL. **Inhibition of monocyte oxidative responses by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin**. J Immunol. 1987,139:2749-2754.
108. Hickey FB, Brereton CF, Mills KHG. **Adenylate cyclase toxin from *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; jlb.0208113.
109. Spensieri F, Fedele G, Fazio C, Nasso M, Stefanelli P, Mastrantonio P, Ausiello CM. ***Bordetella pertussis* inhibition of interleukin-12 (IL-12) p70 in human monocyte-derived dendritic cells blocks IL-12 p35 through adenylate cyclase toxin-dependent cyclic AMP induction**. Infect Immun. 2006,74:2831-2838.
110. Ross PJ, Lavelle EC, Mills KHG, 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. 2004,72:1568-1579.
111. Fedele G, Spensieri F, Palazzo R, Nasso M, Cheung GY, Coote JG, Ausiello CM. ***Bordetella pertussis* commits human dendritic cells to promote a Th1/Th17 response through the activity of adenylate cyclase toxin and MAPK-pathways**. PLoS 2010,5:e8734.
112. Carbonetti NH. **Immunomodulation in the pathogenesis of *Bordetella pertussis* infection and disease**. Current Opinion in Pharmacology 2007,7:272-278.
113. Zhang YL, Sekura RD. **Purification and characterization of the heat-labile toxin of *Bordetella pertussis***. Infect Immun. 1991,59:3754-3759.
114. Cowell JL, Hewlett EL, Manclark CR. **Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis***. Infect. Immun. 1979,25:896-901.
115. Fukui A, Horiguchi Y. ***Bordetella* dermonecrotic toxin exerting toxicity through activation of the small GTPase Rho**. J Biochem. 2004,136:415-419.
116. 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. 2004,279:2866-2872.
117. Nicosia A, Perugini M, Franzini C, Casagli MC, Borri MG, Antoni G, Almoni M, Neri P, Ratti G, Rappuoli R. **Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: operon structure and gene duplication**. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986,83:4631-4635.

118. Locht C, Keith JM. **Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization.** Science. 1986,232:1258-1264.
119. Tamura M, Nogimori K, Murai S, Yajima M, Ito K, Katada T, Ui M, Ishii S. **Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model.** Biochemistry. 1982,21:5516-5522.
120. Farizo KM, Cafarella TG, Burns DL. **Evidence for a Ninth Gene, ptII, in the Locus Encoding the Pertussis Toxin Secretion System of *Bordetella pertussis* and Formation of a PtlI-PtlF Complex.** J. Biol. Chem. 1996,271:31643-31649.
121. Verma A, Burns DL. **Requirements for Assembly of PtlH with the Pertussis Toxin Transporter Apparatus of *Bordetella pertussis*.** Infect. Immun. 2007,75:2297-2306.
122. Kaslow H, Burns D. **Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation.** FASEB J. 1992,6:2684-2690.
123. Katada T, Tamura M, Ui M. **The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein.** Archives of Biochemistry and Biophysics 1983,224:290-298.
124. Pittman M. **The concept of pertussis as a toxin-mediated disease.** Pediatr Infect Dis. 1984,3:467-486.
125. Munoz J, Wardlaw A, Parton R. **Action of pertussigen (pertussis toxin) on the host immune system in pathogenesis and immunity in pertussis.** Pathogenesis and Immunity in pertussis. New York, N. Y.: John Wiley & Sons, Ltd. 1988:173-192.
126. 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. 2005,115:3594-3601.
127. 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. 2007,75:1713-1720. Epub 2007 Jan 1722.
128. Shumilla JA, Lacaille V, Hornell TM, Huang J, Narasimhan S, Relman DA, Mellins ED. ***Bordetella pertussis* infection of primary human monocytes alters HLA-DR expression.** Infect Immun. 2004,72:1450-1462.
129. 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. 1992,60:3303-3308.
130. Martino A, Volpe E, Auricchio G, Colizzi V, Baldini P. **Influence of Pertussis toxin on CD1a Isoform Expression in Human Dendritic Cells.** Journal of Clinical Immunology 2006,26:153-159.
131. Luker KE, Collier JL, Kolodziej EW, Marshall GR, Goldman WE. ***Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin and other muramyl peptides: distinct structure-activity relationships for respiratory epithelial cytopathology.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1993,90:2365-2369.
132. 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. 1991,59:337-345.
133. Flak TA, Goldman WE. **Autotoxicity of nitric oxide in airway disease.** Am J Respir Crit Care Med. 1996,154:S202-206.
134. Flak T, Goldman W. **Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis.** Cellular Microbiology 1999,1:51-60.

135. Preston A, Thomas R, Maskell D. **Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* wlb LPS biosynthesis locus.** Microbial Pathogenesis 2002,33:91-95.
136. Nakase Y, Tateishi M, Sekiya K, Kasuga T. **Chemical and biological properties of the purified O antigen of *Bordetella pertussis*.** Jpn J Microbiol. 1970,14:1-8.
137. Watanabe M, Takimoto H, Kumazawa Y, Amano K. **Biological properties of lipopolysaccharides from *Bordetella* species.** J Gen Microbiol. 1990,136:489-493.
138. Ayme G, Caroff M, Chaby R, Haeffner-Cavaillon N, Le Dur A, Moreau M, Muset M, Mynard MC, Roumiantzeff M, Schulz D, Szabó L. **Biological activities of fragments derived from *Bordetella pertussis* endotoxin: isolation of a nontoxic, Shwartzman-negative lipid A possessing high adjuvant properties.** Infect. Immun. 1980,27:739-745.
139. Schaeffer LM, McCormack FX, Wu H, Weiss AA. ***Bordetella pertussis* lipopolysaccharide resists the bactericidal effects of pulmonary surfactant protein A.** J Immunol. 2004,173:1959-1965.
140. Fedele G, Nasso M, Spensieri F, Palazzo R, Frasca L, Watanabe M, Ausiello CM. **Lipopolysaccharides from *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* differently modulate human dendritic cell functions resulting in divergent prevalence of Th17-polarized responses.** J Immunol. 2008,181:208-216.
141. Tuomanen E, Weiss A. **Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory-epithelial cells.** J Infect Dis. 1985,152:118-125.
142. 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. 2001,69:6038-6043.
143. Luker KE, Tyler AN, Marshall GR, Goldman WE. **Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in pertussis.** Mol Microbiol. 1995,16:733-743.
144. Perez 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. 2007,51:414-421.
145. 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. 2003,197:735-742.
146. McGuirk P, McCann C, Mills KHG. **Pathogen-specific T Regulatory 1 Cells Induced in the Respiratory Tract by a Bacterial Molecule that Stimulates Interleukin 10 Production by Dendritic Cells: A Novel Strategy for Evasion of Protective T Helper Type 1 Responses by *Bordetella pertussis*.** J. Exp. Med. 2002,195:221-231.
147. Boyd AP, Ross PJ, Conroy H, Mahon N, Lavelle EC, Mills KHG. ***Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin Modulates Innate and Adaptive Immune Responses: Distinct Roles for Acylation and Enzymatic Activity in Immunomodulation and Cell Death.** J Immunol 2005,175:730-738.
148. Fedele G, Celestino I, Spensieri F, Frasca L, Nasso M, Watanabe M, Remoli ME, Coccia EM, Altieri F, Ausiello CM. **Lipooligosaccharide from *Bordetella pertussis* induces mature human monocyte-derived dendritic cells and drives a Th2 biased response.** Microbes and Infection 2007,9:855-863.

149. Cherry JD. **The Epidemiology of Pertussis: A Comparison of the Epidemiology of the Disease Pertussis With the Epidemiology of *Bordetella pertussis* Infection.** *Pediatrics* 2005,115:1422-1427.
150. 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.* 2000,68:1934-1941.
151. Hellwig SMM, Hazenbos WLW, van de Winkel JGJ, Mooi FR. **Evidence for an intracellular niche for *Bordetella pertussis* in broncho-alveolar lavage cells of mice.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1999,26:203-207.
152. Ewanowich CA, Melton AR, Weiss AA, Sherburne RK, Peppler MS. **Invasion of HeLa 229 cells by virulent *Bordetella pertussis*.** *Infect Immun.* 1989,57:2698-2704.
153. Gueirard P, Bassinet L, Bonne I, Prevost M-C, Guiso N. **Ultrastructural analysis of the interactions between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* and human tracheal epithelial cells.** *Microbial Pathogenesis* 2005,38:41-46.
154. Friedman RL, Nordensson K, Wilson L, Akporiaye ET, Yocum DE. **Uptake and Intracellular Survival of *Bordetella pertussis* in Human Macrophages.** *Infect Immun.* 1992,60:4578-4585.
155. Vandebriel RJ, Hellwig SMM, Vermeulen JP, Hoekman JH, Dormans JA, Roholl PJ, Mooi FR. **Association of *Bordetella pertussis* with host immune cells in the mouse lung.** *Microbial Pathogenesis* 2003,35:19-29.
156. Bromberg K, Tannis G, Steiner P. **Detection of *Bordetella pertussis* associated with the alveolar macrophages of children with human immunodeficiency virus infection.** *Infect Immun.* 1991,59:4715-4719.
157. 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.* 2008,47:328-338.
158. Serra D, Bosch A, Russo DM, Rodríguez 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* 2007,387:1759-1767.
159. 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* 2006,71:736-747.
160. Donlan RM, Costerton JW. **Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms.** *Clin Microbiol Rev.* 2002,15:167-193.
161. Yasuda H, Ajiki Y, Aoyama J, Yokota T. **Interaction between human polymorphonuclear leucocytes and bacteria released from in-vitro bacterial biofilm models.** *J Med Microbiol.* 1994,41:359-367.
162. Qadri F, Haque A, Hossain A, Albert MJ. **Production of slime polysaccharides by *Shigella dysenteriae* type 1.** *Microbiol Immunol.* 1994,38:11-18.
163. Shiau AL, Wu CL. **The inhibitory effect of *Staphylococcus epidermidis* slime on the phagocytosis of murine peritoneal macrophages is interferon-independent.** *Microbiol Immunol.* 1998,42:33-40.
164. Meluleni GJ, Grout M, Evans DJ, Pier GB. **Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoid**

- exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients.** *J Immunol.* 1995,155:2029-2038.
165. Mishra M, Parise G, Jackson KD, Wozniak DJ, Deora R. **The BvgAS Signal Transduction System Regulates Biofilm Development in *Bordetella*.** *J. Bacteriol.* 2005,187:1474-1484.
166. Heiss LN, Flak TA, Lancaster JR, Jr., McDaniel ML, Goldman WE. **Nitric oxide mediates *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin damage to the respiratory epithelium.** *Infect Agents Dis.* 1993,2:173-177.
167. 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.* 1991,59:337-345.
168. Bassinet L, Fitting C, Housset B, Cavaillon J-M, Guiso N. ***Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase-Hemolysin Induces Interleukin-6 Secretion by Human Tracheal Epithelial Cells.** *Infect Immun.* 2004,72:5530-5533.
169. 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.* 2000,97:13847-13852.
170. Bruss JB, Siber GR. **Protective effects of pertussis immunoglobulin (P-IGIV) in the aerosol challenge model.** *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999,6:464-470.
171. Granstrom M, Olinder-Nielsen AM, Holmblad P, Mark A, Hanngren K. **Specific immunoglobulin for treatment of whooping cough.** *Lancet.* 1991,338:1230-1233.
172. Rodriguez ME, Hellwig SMM, Hozbor DF, Leusen J, van der Pol W-L, van de Winkel JGJ. **Fc Receptor-Mediated Immunity Against *Bordetella pertussis*.** *J Immunol* 2001,167:6545-6551.
173. Redhead K, Wiley J. **Pertussis vaccines – old and new.** *Ala'Alden D.A.A., Hormaeche C. (Eds.) Molecular and Clinical Aspects of Vaccine Development* 1995:259-322.
174. Boursaux-Eude C, Guiso N. **Polymorphism of Repeated Regions of Pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*.** *Infect. Immun.* 2000,68:4815-4817.
175. Podda A, Nencioni L, De Magistris MT, Di Tommaso A, Bossù P, Nuti S, Pileri P, Peppoloni S, Bugnoli M, Ruggiero P. **Metabolic, humoral, and cellular responses in adult volunteers immunized with the genetically inactivated pertussis toxin mutant PT-9K/129G.** *J Exp Med.* 1990,172:861-868.
176. De Magistris MT, Romano M, Nuti S, Rappuoli R, Tagliabue A. **Dissecting human T cell responses against *Bordetella* species.** *J Exp Med.* 1988,168:1351-1362.
177. Di Tommaso A, Domenighini M, Bugnoli M, Tagliabue A, Rappuoli R, De Magistris MT. **Identification of subregions of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin that stimulate human T-cell responses.** *Infect Immun.* 1991,59:3313-3315.
178. 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.* 1991,59:3768-3773.
179. Ryan M, Murphy G, Gothefors L, Nilsson L, Storsaeter J, Mills KH. ***Bordetella pertussis* respiratory infection in children is associated with preferential activation of type 1 T helper cells.** *J Infect Dis.* 1997,175:1246-1250.

180. 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.
181. 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.* 1998,93:1-10.
182. 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.* 1997,65:2168-2174.
183. 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* 2009,27:6042-6047.
184. Mascart F, Hainaut M, Peltier A, Verscheure V, Levy J, Loch C. **Modulation of the infant immune responses by the first pertussis vaccine administrations.** *Vaccine* 2007,25:391-398.
185. Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KHG. **TLR4 Mediates Vaccine-Induced Protective Cellular Immunity to Bordetella pertussis: Role of IL-17-Producing T Cells.** *J Immunol* 2006,177:7980-7989.
186. Donnelly S, Loscher CE, Lynch MA, Mills KHG. **Whole-Cell but Not Acellular Pertussis Vaccines Induce Convulsive Activity in Mice: Evidence of a Role for Toxin-Induced Interleukin-1 $\beta$  in a New Murine Model for Analysis of Neuronal Side Effects of Vaccination.** *Infect. Immun.* 2001,69:4217-4223.
187. 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.* 2004,34:2579-2588.
188. Mahon BP, Sheahan BJ, Griffin F, Murphy G, Mills KHG. **Atypical Disease after Bordetella pertussis Respiratory Infection of Mice with Targeted Disruptions of Interferon- $\gamma$  Receptor or Immunoglobulin  $\mu$  Chain Genes.** *J. Exp. Med.* 1997,186:1843-1851.
189. Barbic J, Leef M, Burns D, Shahin R. **Role of gamma interferon in natural clearance of Bordetella pertussis infection.** *Infect. Immun.* 1997,65:4904-4908.
190. Mills KHG, 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.* 1998,66:594-602.
191. 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.* 1998,28:153-163.
192. He Q, Minh NNT, Edelman K, Viljanen MK, Arvilommi H, Mertsola J. **Cytokine mRNA Expression and Proliferative Responses Induced by Pertussis Toxin, Filamentous Hemagglutinin, and Pertactin of Bordetella pertussis in the Peripheral Blood Mononuclear Cells of Infected and Immunized Schoolchildren and Adults.** *Infect. Immun.* 1998,66:3796-3801.

193. Torre D, Pugliese A, Speranza F, Fiori GP, Perversi L, Marone P, Tambini R. **Interferon-gamma levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of mice infected with *Bordetella pertussis*.** *J Infect Dis.* 1993,167:762-765.
194. McGuirk P, Mills KHG. **Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases.** *Trends in Immunology* 2002,23:450-455.
195. Rietveld A, Simons K. **The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts.** *Biochim Biophys Acta.* 1998,1376:467-479.
196. Thomas CM, Smart EJ. **Caveolae structure and function.** *J Cell Mol Med.* 2008,12:796-809.
197. London E, Brown DA. **Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts).** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2000,1508:182-195.
198. Anderson RG, Jacobson K. **A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains.** *Science.* 2002,296:1821-1825.
199. Fantini J, Garmy N, Mahfoud R, Yahi N. **Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimers and prion diseases.** *Expert Rev Mol Med.* 2002,2002:1-22.
200. Brown DA, Rose JK. **Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface.** *Cell.* 1992,68:533-544.
201. Fridriksson EK, Shipkova PA, Sheets ED, Holowka D, Baird B, McLafferty FW. **Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry.** *Biochemistry.* 1999,38:8056-8063.
202. Smart EJ, Ying YS, Mineo C, Anderson RG. **A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995,92:10104-10108.
203. Christian A, Haynes M, Phillips M, Rothblat G. **Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content.** *J Lipid Res.* 1997,38:2264-2272.
204. Ilangumaran S, Hoessli DC. **Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane.** *Biochem J.* 1998,335:433-440.
205. Hooper NM. **Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review).** *Mol Membr Biol.* 1999,16:145-156.
206. Dhungana S, Merrick BA, Tomer KB, Fessler MB. **Quantitative proteomic analysis of macrophage rafts reveals compartmentalized activation of the proteasome and of proteasome-mediated ERK activation in response to lipopolysaccharide.** *Mol Cell Proteomics* 2008:M800286-MCP800200.
207. Keller P, Simons K. **Cholesterol Is Required for Surface Transport of Influenza Virus Hemagglutinin.** *J. Cell Biol.* 1998,140:1357-1367.
208. Matko J, Szollosi J. **Landing of immune receptors and signal proteins on lipid rafts: a safe way to be spatio-temporally coordinated?** *Immunol Lett.* 2002,82:3-15.
209. Slaughter N, Laux I, Tu X, Whitelegge J, Zhu X, Effros R, Bickel P, Nel A. **The flotillins are integral membrane proteins in lipid rafts that contain TCR-associated signaling components: implications for T-cell activation.** *Clinical Immunology* 2003,108:138-151.

210. Barrias ES, Dutra JMF, Souza WD, Carvalho TMU. **Participation of macrophage membrane rafts in *Trypanosoma cruzi* invasion process.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007,363:828-834.
211. Haglund K, Ivankovic-Dikic I, Shimokawa N, Kruh GD, Dikic I. **Recruitment of Pyk2 and Cbl to lipid rafts mediates signals important for actin reorganization in growing neurites.** *J Cell Sci.* 2004,117:2557-2568. Epub 2004 May 2555.
212. Connell SD, Smith DA. **The atomic force microscope as a tool for studying phase separation in lipid membranes.** *Mol Membr Biol.* 2006,23:17-28.
213. Rao M, Mayor S. **Use of Forster's resonance energy transfer microscopy to study lipid rafts.** *Biochim Biophys Acta.* 2005,1746:221-233.
214. Simons K, Toomre D. **Lipid rafts and signal transduction.** 2000,1:31-39.
215. Pierce SK. **Lipid rafts and B-cell activation.** *Nat Rev Immunol.* 2002,2:96-105.
216. Pizzo P, Viola A. **Lipid rafts in lymphocyte activation.** *Microbes Infect.* 2004,6:686-692.
217. Harder T. **Lipid raft domains and protein networks in T-cell receptor signal transduction.** *Current Opinion in Immunology* 2004,16:353-359.
218. Miceli MC, Moran M, Chung CD, Patel VP, Low T, Zinnanti W. **Co-stimulation and counter-stimulation: lipid raft clustering controls TCR signaling and functional outcomes.** *Semin Immunol.* 2001,13:115-128.
219. Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, Triantafilou K. **Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation.** *J Cell Sci* 2002,115:2603-2611.
220. Duncan MJ, Shin JS, Abraham SN. **Microbial entry through caveolae: variations on a theme.** *Cell Microbiol.* 2002,4:783-791.
221. Norkin LC. **Caveolae in the uptake and targeting of infectious agents and secreted toxins.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001,49:301-315.
222. van der Goot FG, Harder T. **Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack.** *Seminars in Immunology* 2001,13:89-97.
223. Tang W, Seino K, Ito M, Konishi T, Senda H, Makuuchi M, Kojima N, Mizuochi T. **Requirement of ceramide for adhesion of *Helicobacter pylori* to glycosphingolipids.** *FEBS Lett.* 2001,504:31-35.
224. Simon PM, Goode PL, Mobasser A, Zopf D. **Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides.** *Infect Immun.* 1997,65:750-757.
225. Taieb N, Yahi N, Fantini J. **Rafts and related glycosphingolipid-enriched microdomains in the intestinal epithelium: bacterial targets linked to nutrient absorption.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004,56:779-794.
226. Lafont F, Tran Van Nhieu G, Hanada K, Sansonetti P, van der Goot FG. **Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction.** *EMBO J.* 2002,21:4449-4457.
227. Catron DM, Sylvester MD, Lange Y, Kadekoppala M, Jones BD, Monack DM, Falkow S, Haldar K. **The *Salmonella*-containing vacuole is a major site of intracellular cholesterol accumulation and recruits the GPI-anchored protein CD55.** *Cell Microbiol.* 2002,4:315-328.



228. Backenson PB, Coleman JL, Benach JL. ***Borrelia burgdorferi* shows specificity of binding to glycosphingolipids.** *Infect Immun.* 1995,63:2811-2817.
229. Krivan HC, Roberts DD, Ginsburg V. **Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc beta 1-4Gal found in some glycolipids.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988,85:6157-6161.
230. Gatfield J, Pieters J. **Essential role for cholesterol in entry of *Mycobacteria* into macrophages.** *Science* 2000,288:1647-1651.
231. Peyron P, Bordier C, N'Diaye E-N, Maridonneau-Parini I. **Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins.** *J Immunol* 2000,165:5186-5191.
232. Watarai M. **Interaction between *Brucella abortus* and cellular prion protein in lipid raft microdomains.** *Microbes and Infection* 2004,6:93-100.
233. Naroeni A, Porte F. **Role of Cholesterol and the Ganglioside GM1 in Entry and Short-Term Survival of *Brucella suis* in Murine Macrophages.** *Infect Immun.* 2002,70:1640-1644.
234. Baorto DM, Gao Z, Malaviya R, Dustin ML, van der Merwe A, Lublin DM, Abraham SN. **Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic.** *Nature.* 1997,389:636-639.
235. Kansau I, Berger C, Hospital M, Amsellem R, Nicolas V, Servin AL, Bernet-Camard MF. **Zipper-Like Internalization of Dr-Positive *Escherichia coli* by Epithelial Cells Is Preceded by an Adhesin-Induced Mobilization of Raft-Associated Molecules in the Initial Step of Adhesion.** *Infect Immun.* 2004,72:3733-3742.
236. Min Wang GH. **Lipid raft-dependent uptake, signalling and intracellular fate of *Porphyromonas gingivalis* in mouse macrophages.** *Cellular Microbiology* 2008,10:2029-2042.
237. Tamilselvam B, Daefler S. ***Francisella* Targets Cholesterol-Rich Host Cell Membrane Domains for Entry into Macrophages.** *J Immunol* 2008,180:8262-8271.
238. Manes S, del Real G, Martinez-A C. **Pathogens: raft hijackers.** 2003,3:557-568.
239. Watarai M, Makino S-i, Michikawa M, Yanagisawa K, Murakami S, Shirahata T. **Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to *Brucella abortus* infection of mice.** *Infect. Immun.* 2002,70:4818-4825.
240. Kim S, Watarai M, Makino S-i, Shirahata T. **Membrane sorting during swimming internalization of *Brucella* is required for phagosome trafficking decisions.** *Microbial Pathogenesis* 2002,33:225-237.
241. Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J. **A Coat Protein on Phagosomes Involved in the Intracellular Survival of *Mycobacteria*.** *Cell* 1999,97:435-447.
242. Shin JS, Gao Z, Abraham SN. **Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells.** *Science* 2000,289:785-788.
243. Selvarangan R, Goluszko P, Popov V, Singhal J, Pham T, Lublin DM, Nowicki S, Nowicki B. **Role of decay-accelerating factor domains and anchorage in internalization of Dr-fimbriated *Escherichia coli*.** *Infect Immun.* 2000,68:1391-1399.
244. Norkin LC, Wolfrom SA, Stuart ES. **Association of Caveolin with *Chlamydia trachomatis* Inclusions at Early and Late Stages of Infection.** *Experimental Cell Research* 2001,266:229-238.

245. Simons K, Gruenberg J. **Jamming the endosomal system: lipid rafts and lysosomal storage diseases.** *Trends in Cell Biology* 2000,10:459-462.
246. Skoudy A, Mounier J, Aruffo A, Ohayon H, Gounon P, Sansonetti P, Tran Van Nhieu G. **CD44 binds to the *Shigella* IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells.** *Cellular Microbiology* 2000,2:19-33.
247. Brennan M, Hannah J, Leininger E. **Adhesion of *Bordetella pertussis* to sulfatides and to the GalNAc beta 4Gal sequence found in glycosphingolipids.** *J. Biol. Chem.* 1991,266:18827-18831.
248. Tuomanen E, Towbin H, Rosenfelder G, Braun D, Larson G, Hansson GC, Hill R. **Receptor analogs and monoclonal antibodies that inhibit adherence of *Bordetella pertussis* to human ciliated respiratory epithelial cells.** *J Exp Med.* 1988,168:267-277.
249. Hellwig SM, van Oirschot HF, Hazenbos WL, van Spriel 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.* 2001,183:871-879.

## **CAPÍTULO 2**

**Dominios ricos en colesterol participan en la interacción de *B. pertussis* con células del epitelio respiratorio**



## CAPÍTULO 2

### 2. Dominios ricos en colesterol participan en la interacción de *B. pertussis* con células del epitelio respiratorio

#### 2.1. Introducción

Un evento crucial en la colonización del tracto respiratorio por *B. pertussis* es la adhesión a las células epiteliales. Se ha descrito que la interacción entre *B. pertussis* y el epitelio respiratorio involucra al menos cinco adhesinas [1] de las cuales, la hemaglutinina filamentosa (FHA) ha sido descrita como la más importante. FHA es una proteína de 220 kDa con al menos cuatro dominios diferentes que median la adhesión con la célula huésped. Algunos de los receptores con los cuales FHA interacciona han sido identificados: lactosil ceramidas del epitelio respiratorio [2], azúcares sulfatados de la superficie de las células epiteliales [3] e integrinas de los leucocitos [4].

A través de la interacción con sus receptores celulares en la célula eucariótica, las adhesinas no solo median la adhesión bacteriana a un determinado tipo celular sino que determinan en muchos casos el inicio de cascadas de señalización que conllevan a la internalización del microorganismo o a la generación de determinadas respuestas inflamatorias y/o inmunomodulatorias [5, 6]. Si bien la interacción inicial patógeno-hospedador puede ocurrir de forma más o menos azarosa en la superficie celular, solamente determinada por la localización de un posible receptor celular, se ha encontrado que muchas bacterias, así como sus exotoxinas, interaccionan con dominios especializados de la membrana plasmática ricos en colesterol y glicoesfingolípidos, denominados rafts lipídicos como ya se mencionó. Estos dominios aseguran una alta concentración local de receptores sobre la superficie celular facilitando el proceso de adhesión [7]. Una característica importante de los rafts lipídicos es su naturaleza dinámica que permite la formación transitoria de plataformas de señalización en la membrana plasmática que conllevan a la activación de mecanismos involucrados en la transducción de señales [8] y en la endocitosis [9]. Se ha demostrado que ciertos

microorganismos, entre los que se encuentran patógenos de difícil erradicación como *Mycobacterium tuberculosis* [10, 11], *Brucella suis* [12-14], *Chlamydia* [15], *Escherichia coli* Dr-Positiva [16], *Leishmania donovani* [17] y *Shigella flexneri* [18] utilizan estos dominios como vía de ingreso a la célula huésped lo cual determina, en muchos casos, la evasión de los mecanismos de defensa y la sobrevivencia intracelular. Si bien la asociación de *B. pertussis* con los rafts lipídicos no ha sido descrita, la alta afinidad que esta bacteria presenta por glicolípidos [19] y lactosil ceramidas [20] sugiere que estos dominios podrían estar involucrados en la interacción con la célula huésped, lo cual tal vez contribuya al establecimiento de la infección. En este contexto, en el presente Capítulo se describen los estudios realizados para investigar si los rafts lipídicos participan en la adhesión de *B. pertussis* al epitelio respiratorio.

## 2. 2. Materiales y métodos

### 2.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Para la realización de este estudio se utilizaron la cepa salvaje *B. pertussis* Tohama I y la cepa BPGR4, una mutante defectiva en la expresión de FHA derivada de Tohama [21], transformadas con el plásmido pCW505 (provisto gentilmente por Dr. Weiss, Cincinnati, Ohio) que induce la expresión citoplasmática de la proteína fluorescente verde GFP (Green Fluorescent Protein) sin alterar el crecimiento o la expresión de antígenos [22]. Las bacterias fueron cultivadas en placas de Agar Bordet Gengou (DIFCO Laboratories, USA), suplementada con 15 % v/v de sangre desfibrinada de carnero (ABGs), durante 72 hs a 37 °C. Al cabo de este tiempo se repicó en una nueva placa ABGs y se cultivó a 37 °C durante 24 hs. En determinados ensayos la cepa salvaje Tohama se cultivo en ABGs con el agregado de un agente modulador (50 mM MgSO<sub>4</sub>).

En experimentos control se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transformada con el plásmido PML2 el cual induce la expresión citoplasmática de GFP (cedida gentilmente por el Dr. Antonio Lagares del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, La Plata, Argentina). La bacteria fue cultivada en medio Luria Bertani (LB) a 37 °C durante toda la noche y utilizada en ensayos de adhesión.

### 2.2.2. Células y condiciones de cultivo

Los ensayos de infección se llevaron a cabo utilizando la línea celular A549 (neumocitos humanos tipo II) provista por la American Type Culture Collection [23]. Las células A549 se cultivaron en botellas (Falcon 3002; Becton Dickinson, San Jose, CA) en medio mínimo modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL, Gran Island, NY) suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (SFB) (Cansera, Rexdale, ON, Canada) inactivado por calor, 100 unidades/ml de penicilina, y 100 mg/ml de streptomycin (Pen/Strep) (BioWhittaker, Walkersville, MD) a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 100 % de humedad. Cuando el cultivo alcanzó un 80 % de confluencia, las células fueron removidas con tripsina (0.25 % v/v)-EDTA (0.1 % p/v) (KuraboCo., Ltd., Osaka, Japón) y cultivadas en placas de 24 pocillos. El estado del cultivo se monitoreó por

observación microscópica periódica y recuento de células viables mediante tinción con Trypan blue en pocillos elegidos al azar.

### 2.2.3. Anticuerpos y sueros

Los siguientes anticuerpos fueron utilizados en este ensayo: anticuerpo monoclonal (mAc) de ratón anti-caveolina humana (mIgG<sub>2a</sub>) (Pharmlingen, San Diego, CA), mAc de ratón anti-receptor de transferrina humana (mIgG<sub>2a</sub>) (Pharmlingen), y anticuerpo policlonal (pAc) producido en conejo anti-flotilina-1 humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

En este estudio se emplearon además, fracciones de IgG obtenidas a partir de un pool de sueros de pacientes con elevado título anti-*B. pertussis*, según se determinó por ELISA [24], obtenida como se describe en Rodríguez *et al.* [25]; suero de conejo anti-*B. pertussis* obtenido según se describe en Hellwig *et al.* [26]; y suero de ratón anti-FHA de *B. pertussis* obtenido según se describe en Sato & Sato [27].

### 2.2.4. Tratamiento de células A549 con drogas que afectan el colesterol de membrana

La disrupción de los dominios lipídicos de las células A549 se llevó a cabo por remoción del colesterol de membrana incubando las células con 10 mM de metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) (Sigma) durante 15 min a 37 °C en medio DMEM suplementado con BSA (0,2 % p/v) y lovastatina (5  $\mu$ g/ml) (Sigma) (DMEM-BSA-L). En algunos experimentos las células fueron incubadas con 35 mg/ml de nistatina (Sigma) o con 5  $\mu$ g/ml de filipina (Sigma), drogas que unen colesterol sin extraerlo, durante 30 min a 37 °C en DMEM-BSA-L. La viabilidad celular no se vio afectada por ninguno de los tratamientos según pudo determinarse mediante tinción vital con Trypan blue.

En experimentos control, el colesterol de membrana fue restituido por incubación de las células previamente tratadas con M $\beta$ CD, con 8 mg/ml de colesterol soluble en agua (Sigma) disuelto en DMEM-BSA (DMEM suplementado con BSA (0,2 % p/v)), durante 30 min a 37 °C.

El contenido total de colesterol en células tratadas y no tratadas con M $\beta$ CD fue determinado utilizando el kit Amplex Red Cholesterol (Molecular Probes). Bajo las



condiciones experimentales utilizadas en estos ensayos, el tratamiento con M $\beta$ CD extrajo alrededor del 54 % del contenido total de colesterol celular.

### 2.2.5. Ensayos de adhesión

La adhesión bacteriana a células A549 se estudió según se detalla en Rodriguez *et al.* [28] con algunas modificaciones. Células A549 se cultivaron en placas de 24 pocillos (Nunc, Rockside, Denmark) en los cuales se colocó, previo al cultivo de células, un cubreobjeto circular de vidrio de 12 mm de diámetro. Se colocaron aproximadamente  $5 \times 10^3$  células por pocillo y se cultivaron durante 18 hs en medio DMEM adicionado con SFB 10 % v/v y Pen/Strep. El medio de cultivo con antibióticos fue removido mediante lavados con PBS y las células fueron tratadas con drogas extractoras de colesterol o con medio de cultivo solo (control). Las células fueron luego lavadas con medio DMEM-BSA previo a la incubación con GFP-*B. pertussis* (proporción: 150 bacterias por célula) en DMEM-BSA-L durante 2 hs a 37 °C o con 34  $\mu$ g de FHA nativa purificada (Glaxo-SmithKline) en DMEM-BSA-L durante 1 h a 37 °C. Para facilitar el contacto entre bacterias y células las placas fueron centrifugadas 5 min a  $640 \times g$ . No se detectaron cambios en el número de células A549 viables luego de la incubación con bacterias o FHA según pudo determinarse mediante tinción con Trypan blue. La asociación de *B. pertussis* con las células A549 se evaluó empleando microscopía de fluorescencia. Para ello, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) 3 % (1 h a 4 °C) y se estimó el número de bacterias adheridas por célula por observación microscópica de 20 campos representativos seleccionados al azar. El recuento de bacterias adheridas por célula se realizó utilizando el programa SigmaScan Pro Versión 5.0. El inóculo bacteriano inicial se determinó por recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en ABGs. El control de número de células se determinó por recuento de células en Cámara de Neubauer. Con estos datos, se estimó el número inicial de bacterias por célula ( $R_i$ b/c).

La asociación de FHA con las células A549 se estudió empleando citometría de flujo y microscopía de fluorescencia (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ). Para el análisis por citometría de flujo, las células previamente incubadas con FHA purificada fueron removidas de la placa empleando PBS-EDTA (0.2 % p/v) antes del paso de fijación con paraformaldehído. Para el análisis por microscopía de fluorescencia las células adheridas al cubreobjeto fueron directamente fijadas con PFA. Las muestras se

incubaron con suero de ratón anti-FHA, seguido por la incubación con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con cianina 3 (CY3) (Jackson ImmunoResearch, West Grove). Todos los experimentos fueron realizados al menos tres veces en triplicado. Como control de pegado inespecífico se incubaron células A549 con suero de ratón anti-FHA seguido por anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados con CY3.

En algunos experimentos,  $6 \times 10^6$  *B. pertussis* expresando GFP fueron incubadas con 1.8 mg/ml de colesterol (Sigma) en DMEM-BSA durante 1 h a 37 °C. Luego de tres lavados las bacterias fueron incubadas con células A549 en una R<sub>i</sub>b/c de 150.

En experimentos control, la adhesión de *E. coli* DH5α expresando GFP fue evaluada como se ha descrito anteriormente utilizando una R<sub>i</sub>b/c de 500.

### 2.2.6. Ensayos de unión a colesterol

Para evaluar la capacidad de *B. pertussis* de pegar colesterol se utilizó un ensayo descrito por Rostand & Esko [29] con algunas modificaciones, según se detalla a continuación. 1 mg de colesterol diluido en etanol se utilizó para cubrir los pocillos de una placa de polipropileno para ELISA. El pegado de colesterol a la placa se llevó a cabo durante 14 hs a temperatura ambiente. Los pocillos tratados con colesterol fueron luego lavados seis veces con PBS y bloqueados con una solución de PBS-BSA (1 % p/v) durante 1 h a 37 °C. Posteriormente se adicionaron  $2 \times 10^7$  bacterias por pocillo (Tohama cepa salvaje o BPGR4) en PBS-BSA (1 % p/v) y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Las bacterias no adheridas fueron removidas mediante tres lavados con PBS. El nivel de asociación con colesterol se determinó por la incubación con anticuerpos IgG humanos anti-*B. pertussis* (30 °C, 2 hs) seguido por la incubación con anticuerpos anti-IgG humana conjugadas con peroxidasa (37 °C, 2 hs). Luego de una serie de lavados, la reacción enzimática fue iniciada mediante la adición de O-fenilendiamina (0.1 mg/ml) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 volúmenes en 100 ml de buffer citrato-fosfato, pH 5). Luego de 15 min en la oscuridad, la reacción se detuvo mediante la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4N). El nivel de adhesión bacteriana se estimó midiendo la absorbancia a 492 nm. Pocillos recubiertos únicamente con etanol o solución de bloqueo fueron utilizados como control de unión no específica. En experimentos control se evaluó la capacidad de unión a colesterol de

*E. coli* DH5 $\alpha$ . El nivel de asociación se determinó utilizando suero anti-*E. coli* de conejo seguido por la incubación con anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa.

### 2.2.7. Fraccionamiento celular y aislamiento de membranas resistentes a detergentes (DRMs).

DRMs de células incubadas con *B. pertussis* o FHA fueron aislados según se detalla a continuación.  $1 \times 10^7$  células A549 cultivadas a un 80 % de confluencia fueron incubadas durante 2 hs a 37 °C con *B. pertussis* a una R<sub>0</sub>/c de 150, o con 17 mg/ml de FHA purificada durante 1 h a 37 °C. Los componentes insolubles en Triton X-100 fueron luego aislados según ha sido descrito en Chamberlain *et al.* [30]. Brevemente, las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y removidas de la placa empleando PBS-EDTA (0.2 % p/v). La suspensión de células fue centrifugada a 450 x g, y el paquete celular resuspendido en 1,8 ml de buffer Tris (TBS) (20 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA, y 140 mM NaCl) conteniendo 1 % v/v de Triton X-100, 1 mM de fenilmetilsulfóxido (PMSF), y 1 % v/v de cocktail inhibidor de proteasas (Sigma) e incubado en frío durante 30 min. En algunos experimentos la solución de Triton X-100 1 % v/v fue reemplazada por una solución de Triton X-100 0.5 % v/v + saponina 0.5 % p/v (Sigma). Posteriormente las células fueron lisadas a través de una serie de pasajes por una aguja 27G1/2. El lisado celular se mantuvo durante 15 min en hielo y luego fue centrifugado a 800 x g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante (libre de núcleos) se ajustó a 40 % p/v de sacarosa mediante el agregado de 1,8 ml de sacarosa 80 % p/v en TBS, y colocado en la base de un tubo de centrifuga SW41. Por encima de este preparado se adicionaron 6 ml de sacarosa 30 % p/v en TBS y 3 ml de sacarosa 5 % p/v en TBS. Posteriormente las muestras fueron sometidas a ultracentrifugación (247000 x g) durante 15 hs a 4 °C empleando un rotor Beckman modelo SW41. Finalizada la centrifugación se tomaron fracciones de 1 ml del gradiente desde arriba (fracción 1) hacia abajo (fracción 12). Las proteínas de cada fracción se precipitaron con ácido tricloroacético al 10 % p/v en presencia de 0.2 % p/v de deoxicolato de sodio. El precipitado se resuspendió en PBS y se mantuvo a -20 °C hasta su utilización.

### 2.2.8. Análisis de las fracciones obtenidas en gradientes de sacarosa

En cada una de las fracciones obtenidas en gradientes de sacarosa de células tratadas con *B. pertussis* o de células no tratadas con *B. pertussis* (control) se investigó la presencia de *B. pertussis*, caveolina y receptor de transferrina por técnicas de inmunoquímica sobre membrana. Para ello, volúmenes iguales de cada muestra (10  $\mu$ l) se aplicaron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Immobilon, Millipore, Bedford, MA, USA) que se dejó secar a temperatura ambiente. Luego, las membranas se trataron durante 2 hs a temperatura ambiente con solución de bloqueo (PBS, 5 % p/v BSA), y otras 2 hs con mAc de ratón anti-caveolina, mAc de ratón anti-transferrina o IgG humana anti-*B. pertussis*. Luego de una serie de lavados con solución PBS-BSA (5 % p/v), la unión específica de anticuerpos se visualizó mediante incubación con anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con fosfatasa alcalina (Jackson, ImmunoResearch, BaltimorePike) o con anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con fosfatasa alcalina como anticuerpos secundarios (Jackson, ImmunoResearch, BaltimorePike), y NBT/BCIP (Bio-Rad) como sustrato de reacción.

Por otro lado, las fracciones obtenidas en gradientes de sacarosa de células incubadas con FHA o con medio de cultivo solo (control), fueron analizadas por SDS-PAGE e inmunodetección (Western blot). Para ello, las muestras del gradiente fueron sometidas a una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE; 7 %), transferidas a membranas PVDF [31] e incubadas con anticuerpo policlonal de ratón anti-FHA, mAc de ratón anti-caveolina, o mAc de ratón anti-transferrina durante 2 hs a temperatura ambiente. La detección inmunoquímica se realizó empleando anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research, BaltimorePike). Como sustrato de reacción se utilizó NBT/BCIP.

### 2.2.9. Microscopía confocal

Células A549 fueron incubadas con GFP-*B. pertussis* (R<sub>i</sub>b/c 100) durante 2 hs a 37 °C. Luego de varios lavados para eliminar las bacterias no adheridas, las células se fijaron con PFA 3 % p/v durante 1 h a 4 °C. Luego de la fijación las células fueron lavadas con PBS e incubadas durante 10 min con NH<sub>4</sub>Cl 50 mM en PBS. Luego de dos lavados, las células se permeabilizaron mediante la incubación con saponina 0.1 % p/v en PBS-BSA (0.5 % p/v) durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se

incubaron con anticuerpos policlonales de conejo anti-flotilina en presencia de saponina 0.1 % p/v-BSA 0.5 % v/v durante toda la noche a 4 °C. Como segundo anticuerpo se utilizaron fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con CY3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove) los cuales fueron incubados durante 30 min a 4 °C. Para evitar el pegado inespecífico de los anticuerpos, todas las incubaciones fueron realizadas en presencia de 25 % v/v de suero normal humano inactivado por calor (en todos los ensayos en los que se utilizó suero normal humano para evitar el pegado inespecífico de anticuerpos se tomó la precaución de utilizar sueros que no presentaran anticuerpos contra *B. pertussis*). Las muestras fueron analizadas mediante microscopía de fluorescencia confocal utilizando un microscopio marca Olympus FV 300. El porcentaje de bacterias colocalizando con flotilina fue calculado mediante el análisis de al menos 50 células tomadas de distintos campos seleccionados al azar.

#### 2.2.10. Análisis estadístico

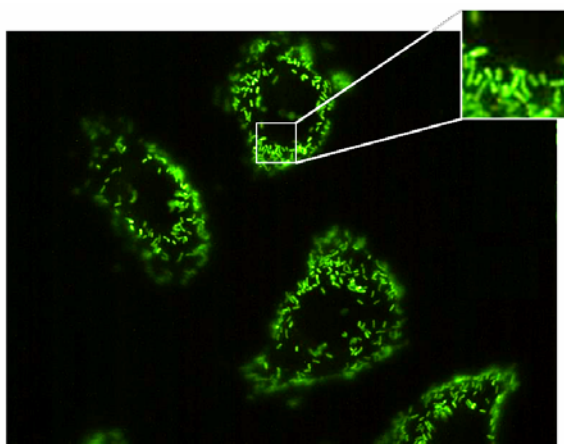
Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación de los valores obtenidos (medias) se utilizó el test de Menor Diferencia Significativa (LSD) con un grado de significación (P) de 0.05.



## 2.3. Resultados

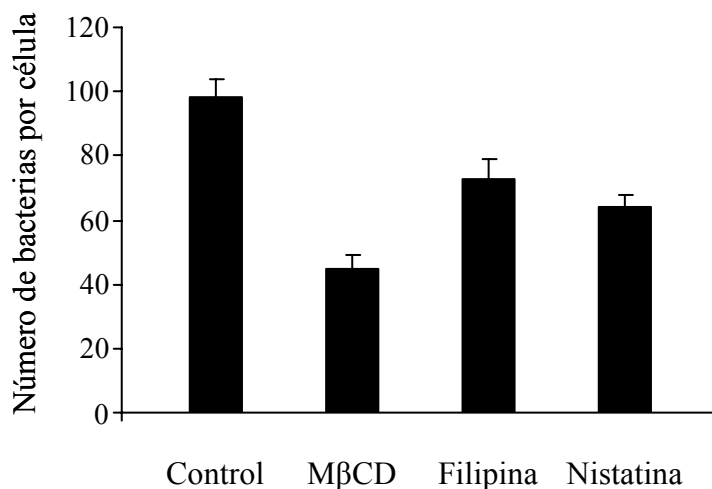
### 2.3.1. El colesterol de membrana está involucrado en la adhesión de *B. pertussis* a células del epitelio respiratorio

La adhesión de *B. pertussis* a las células del epitelio respiratorio es un evento crucial en la colonización. Con el fin de evaluar si los rafts lipídicos están involucrados en este proceso, se estudió la asociación de *B. pertussis* con células de la línea A549 (neumocitos tipo II, epitelio alveolar humano) previamente tratadas con drogas que desorganizan los dominios rafts o con medio de cultivo solo (control). Cabe señalar que esta línea celular es la de elección como modelo de estudio para evaluar la interacción de *B. pertussis* con células epiteliales respiratorias [6, 28, 32-35]. En este estudio se empleó M $\beta$ CD para desorganizar los rafts lipídicos. Esta droga ha sido ampliamente utilizada para estudiar el rol de los dominios rafts en los procesos celulares dada su alta afinidad por el colesterol, molécula clave en la estabilización de estos dominios [10, 36-38]. Los experimentos fueron desarrollados en presencia de lovastatina para inhibir la síntesis *de novo* de colesterol [39]. La viabilidad celular no fue afectada por estos tratamientos según pudo ser comprobado mediante tinción con el colorante vital Trypan blue. La adhesión de *B. pertussis* expresando GFP a células previamente tratadas con o sin M $\beta$ CD fue evaluada mediante microscopía de fluorescencia, donde se contó el número de bacterias adheridas por célula en al menos 20 campos tomados al azar que contuvieran entre 3 y 9 células. La Figura 1 muestra una imagen representativa en la que se observa la adhesión de GFP-*B. pertussis* a células epiteliales A549.



**Figura 1. Adhesión de *B. pertussis* a células epitelio-alveolares A549.** Se muestra una imagen (1000  $\times$ ) representativa de una toma microscópica donde se observan bacterias verdes (por expresión de GFP) adheridas a células A549.

El tratamiento de las células A549 con M $\beta$ CD determinó una significativa disminución en la adhesión bacteriana (55 % respecto al control) (Fig. 2) sugiriendo que el colesterol de membrana está involucrado en la interacción de *B. pertussis* con células epiteliales respiratorias. Dado que la extracción del colesterol de membrana puede tener efectos pleiotrópicos, entre los que se incluyen la alteración de la permeabilidad de membrana y la afectación de los procesos de endocitosis mediados por clatrina [40], el tratamiento con M $\beta$ CD no puede ser utilizado como único criterio para definir si los rafts lipídicos están involucrados en la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales. Debido a ello, se estudió si la adhesión de *B. pertussis* se ve afectada por el tratamiento de las células con otras drogas desorganizadoras de rafts lipídicos, como nistatina o filipina que, a diferencia de la M $\beta$ CD, se unen al colesterol sin extraerlo de la membrana plasmática [41]. Como puede observarse en la Figura 2, ambas drogas produjeron una disminución significativa de la adhesión de *B. pertussis* respecto al control.



**Figura 2. La adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales depende de la presencia de colesterol de membrana.** Células A549 tratadas con DMEM + BSA (control), con 13 mg/ml de M $\beta$ CD, 5  $\mu$ g/ml de filipina, o 35 mg/ml de nistatina en DMEM + BSA fueron incubadas con GFP-*B. pertussis* (R<sub>t</sub>b/c 150) durante 2 hs a 37 °C. La adhesión bacteriana fue evaluada mediante microscopía de fluorescencia. Los datos presentados representan la media  $\pm$  DE de cuatro experimentos independientes. El número de *B. pertussis* adheridas a células A549 tratadas con M $\beta$ CD, filipina o nistatina difiere significativamente del número de bacterias adheridas a células A549 sin tratar ( $P < 0.05$ ).

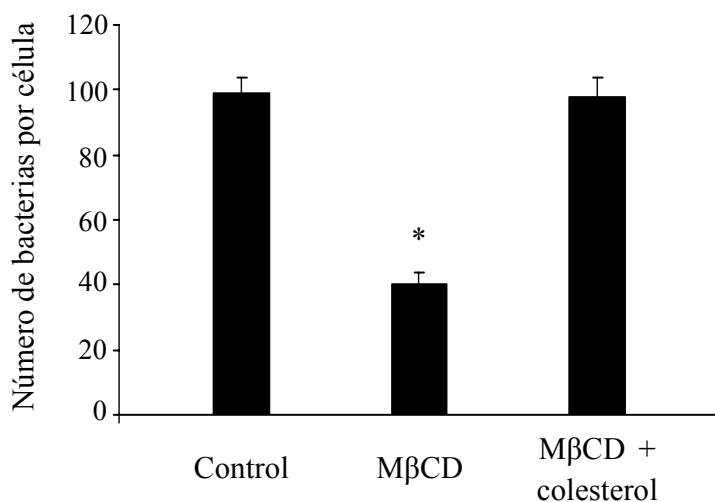
En experimentos control se estudió el efecto de la M $\beta$ CD sobre la adhesión de *E. coli* DH5 $\alpha$  a células A549. Según estudios previos [17], la interacción de esta bacteria



con la célula huésped no depende del colesterol de membrana. De acuerdo a lo esperado, la adhesión de *E. coli* DH5 $\alpha$  no se vio afectada por el tratamiento (resultados no mostrados) confirmando que la extracción de colesterol afecta específicamente la interacción de *B. pertussis* con la célula epitelial.

### 2.3.2. La reposición del colesterol de membrana restaura la adhesión de *B. pertussis*

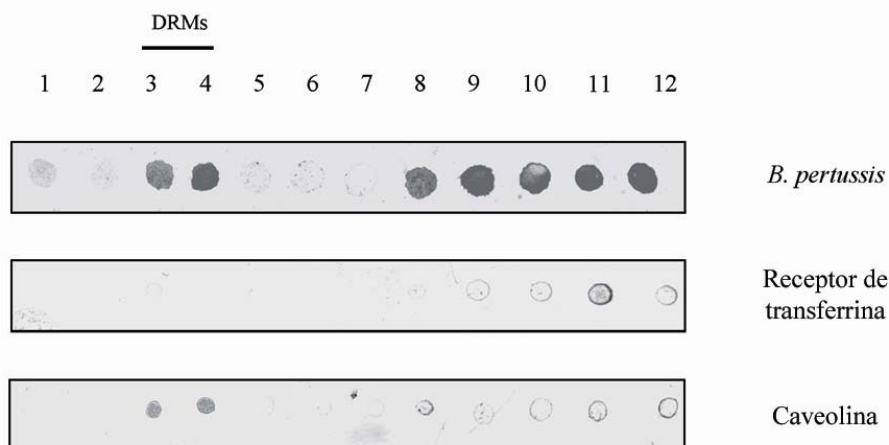
Con el fin de evaluar si la reposición del colesterol de membrana logra reestablecer el nivel de adhesión de *B. pertussis* a la célula epitelial, se realizaron ensayos en los cuales células tratadas con M $\beta$ CD fueron incubadas con colesterol soluble en agua. El incremento en el contenido de colesterol de membrana determinó un aumento en la adhesión de *B. pertussis* (Fig. 3) indicando que la disminución en la asociación a las células epiteliales luego del tratamiento con M $\beta$ CD no se debe a una disrupción general de la integridad de la membrana celular, sino que resulta de un efecto específico debido al menor contenido de colesterol.



**Figura 3. La reincorporación de colesterol reestablece la adhesión de *B. pertussis*.** GFP-*B. pertussis* en DMEM-BSA fue incubada durante 2 hs a 37 °C (R<sub>i</sub>b/c 150) con células A549 sin tratar (control), o tratadas con M $\beta$ CD y luego incubadas con DMEM-BSA (M $\beta$ CD) o con colesterol disuelto en DMEM-BSA (M $\beta$ CD + colesterol). Las células fueron luego lavadas y fijadas. La adhesión bacteriana fue evaluada mediante microscopía de fluorescencia. Los datos presentados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. La adhesión de *B. pertussis* a células tratadas con M $\beta$ CD difiere significativamente de la adhesión a células control y a células tratadas con M $\beta$ CD + colesterol (\*P<0.05).

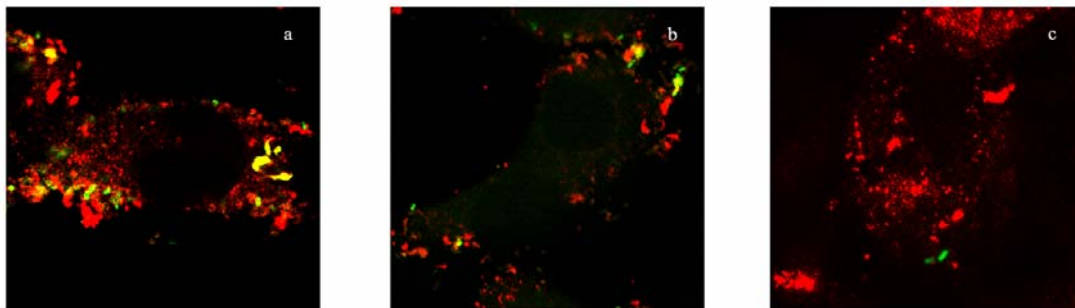
### 2.3.3. Los raft lipídicos están involucrados en la interacción de *B. pertussis* con células epiteliales

Con el fin de evaluar si la dependencia de colesterol observada en la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales significa realmente que existe una intervención de los dominios raft en este proceso, se emplearon técnicas de fraccionamiento subcelular de células infectadas para analizar la localización de *B. pertussis*. Para ello, se aislaron los dominios rafts de células A549 incubadas con *B. pertussis* mediante tratamiento con Triton X-100 seguido de fraccionamiento en gradiente de sacarosa. En la Figura 4 se muestran dot blots correspondientes a las diferentes fracciones recogidas del gradiente. Las fracciones en las cuales se localizan los rafts fueron identificadas mediante la utilización del marcador de rafts, caveolina. De acuerdo con lo esperado según bibliografía, esta proteína fue hallada en las fracciones 3 y 4, densidades a las cuales se espera que los rafts se localicen. En contraste, y como era de esperarse, el receptor de transferrina, que no se encuentra asociado a rafts lipídicos, fue hallado en las fracciones 8 a 12. *B. pertussis* fue encontrada en las fracciones 3 y 4 lo cual sugiere que esta bacteria se encuentra asociada a dominios rafts, sin embargo, y debido a que las fracciones 8 a 12 también se vieron enriquecidas en *B. pertussis*, es posible que otros receptores no asociados a los rafts lipídicos medien junto con éstos últimos la interacción de *B. pertussis* con células epiteliales.



**Figura 4. Los rafts lipídicos están involucrados en la interacción de *B. pertussis* con células epiteliales respiratorias.** Células A549 incubadas con *B. pertussis* durante 2 hs a 37 °C fueron sometidas a fraccionamiento subcelular. Volúmenes iguales de cada fracción fueron analizados mediante Dot blot. Las fracciones fueron reveladas con anticuerpos IgG anti-*B. pertussis* (*B. pertussis*), anticuerpos anti-receptor de transferrina (Receptor de transferrina) y anticuerpos anti-caveolina (Caveolina). Se muestran dot blots representativos de tres experimentos independientes.

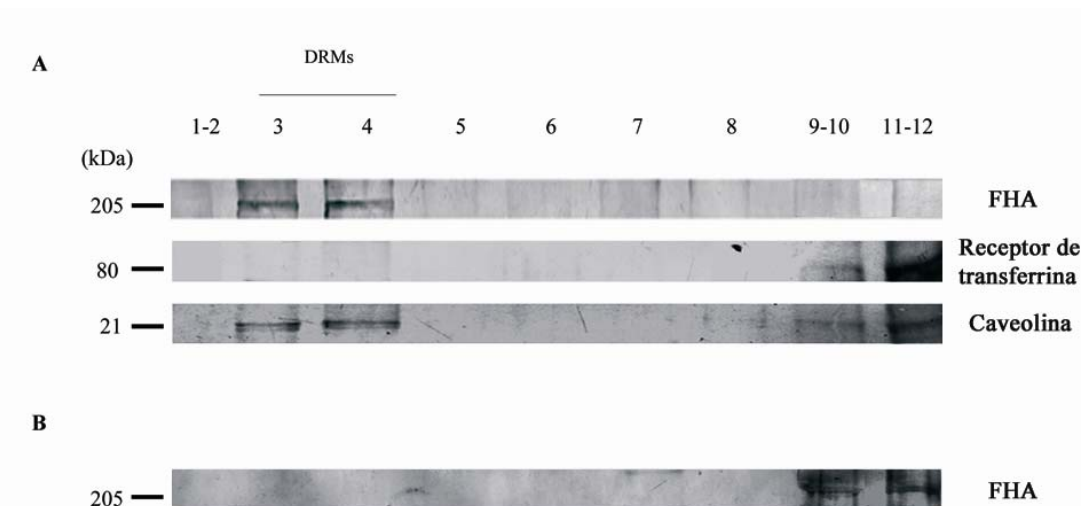
Para confirmar la asociación de *B. pertussis* con los rafts lipídicos, se empleó microscopía confocal para evaluar la interacción de *B. pertussis* con flotilina, otro marcador de rafts lipídicos. Aproximadamente el 60 % de *B. pertussis* se encontró colocalizando con flotilina confirmando el rol que estos dominios tienen en la interacción de *B. pertussis* con las células epiteliales (Fig. 5a). Un resultado particularmente interesante fue observado en las células previamente tratadas con M $\beta$ CD. Según se ve en la Fig. 5b, luego del tratamiento con M $\beta$ CD aún se observan cúmulos ricos en flotilina que reflejan que todavía hay dominios rafts en la membrana celular aunque en menor cantidad y sugieren que los rafts lipídicos no fueron completamente desorganizados por el tratamiento con M $\beta$ CD. Bajo estas condiciones se observa que *B. pertussis* aún colocaliza con flotilina sugiriendo que aquellas bacterias que se adhieren a la célula epitelial después de ser tratada con drogas extractoras de colesterol lo hacen principalmente a expensas de dominios rafts que no han sido afectados. En este estudio se evaluó en paralelo la adhesión de *E. coli* DH5 $\alpha$  como control negativo. En la Fig. 5c se observa que no hay colocalización de la bacteria con cúmulos ricos en flotilina.



**Figura 5. *B. pertussis* colocaliza con el marcador de rafts lipídicos flotilina.** Células A549 tratadas con DMEM-BSA (panel a y c) o con DMEM-BSA-M $\beta$ CD (panel b) fueron incubadas durante 2 hs a 37 °C con GFP-*B. pertussis* (paneles a y b) o GFP-*E. coli* DH5 $\alpha$  (panel c), lavadas, fijadas y permeabilizadas previo a la incubación con anticuerpos de conejo anti-flotilina, seguido de anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con CY3. Los paneles a y b muestran a *B. pertussis* (verde) colocalizando con flotilina (rojo), reflejado por la presencia de áreas amarillas (60 % y 70 % de colocalización, respectivamente). El panel c muestra la ausencia de colocalización de *E. coli* DH5 $\alpha$  con flotilina. En la Figura se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes.

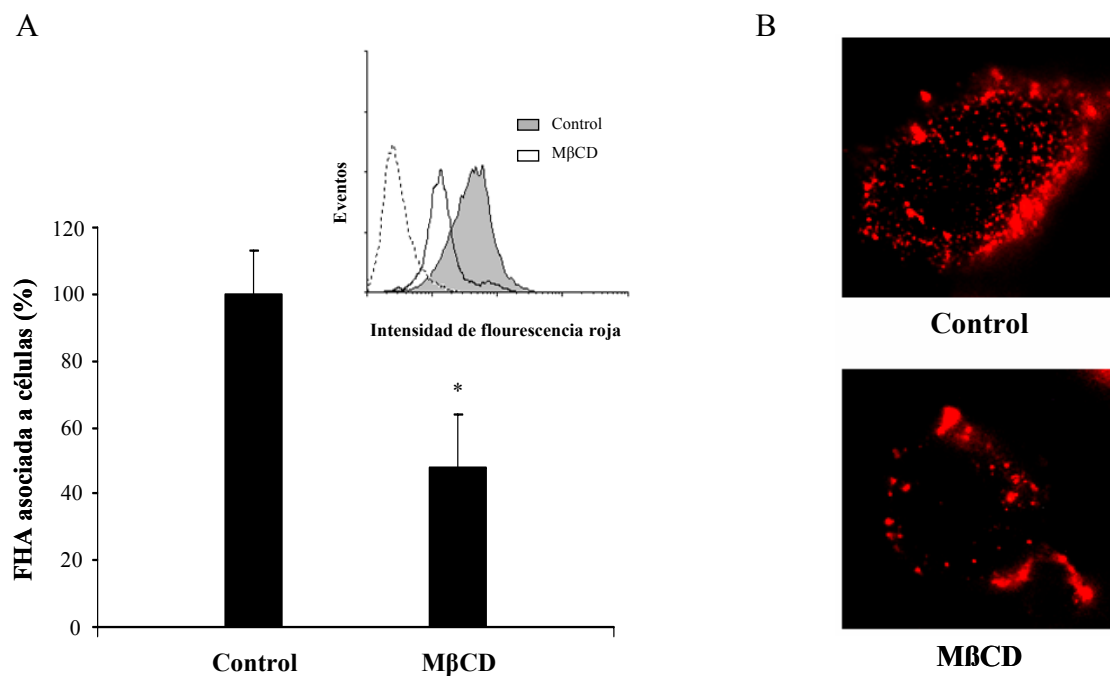
### 2.3.4. FHA está involucrada en la interacción de *B. pertussis* con los rafts lipídicos

Con el fin de determinar el rol de FHA, principal adhesina de *B. pertussis*, en la interacción con dominios ricos en colesterol de la membrana plasmática, se incubaron células A549 con FHA purificada previo a la separación de los componentes insolubles en Triton X-100 por gradiente de centrifugación en gradiente de sacarosa. Los resultados de la Figura 6A muestran que la mayor parte de FHA asociada a la célula se encontró en fracciones de baja densidad donde también se encuentra caveolina, el marcador de rafts lipídicos, lo cual sugiere que FHA interacciona con estos dominios. En ensayos en los que las células se incubaron con saponina, una droga que desorganiza los rafts lipídicos [30], FHA se encontró por fuera de las fracciones 3 y 4, confirmando que la localización de FHA en esas fracciones se debió a la interacción con estos dominios (Fig. 6B). En experimentos control, se analizó si FHA purificada era capaz de flotar a bajas densidades en el gradiente de sacarosa, los resultados demuestran que FHA pura se localiza en zonas de alta densidad (fracciones 8 a 12) (resultado no mostrado).



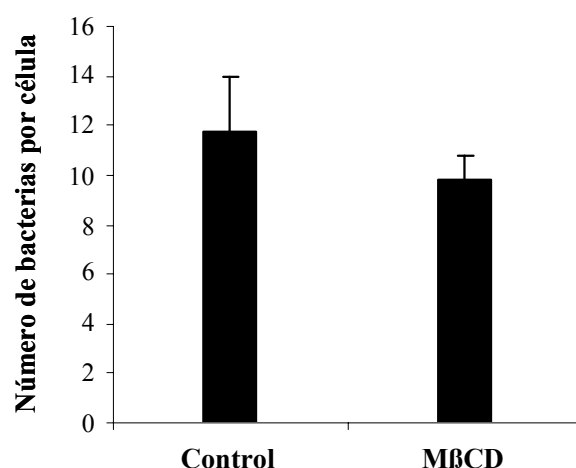
**Figura 6. FHA interacciona con los rafts lipídicos.** FHA purificada fue incubada con células A549 durante 1 h a temperatura ambiente previo al aislamiento de los rafts lipídicos por fraccionamiento subcelular. A) Las diferentes fracciones recogidas del gradiente fueron analizadas por inmunoblot utilizando anticuerpos anti-FHA (FHA), anticuerpos anti-receptor de transferrina (Receptor de transferrina) y anticuerpos anti-caveolina (Caveolina). B) Células incubadas con FHA fueron lisadas utilizando 0,5 % v/v de Triton X-100 con el agregado de saponina (0,5 % p/v) y analizadas por inmunoblot empleando anticuerpo anti-FHA (FHA). Se muestran inmunoblots representativos de tres experimentos independientes.

En experimentos realizados en paralelo, se estudió si la interacción de FHA con la célula epitelial se ve afectada por el tratamiento con M $\beta$ CD. Para ello, se evaluó mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia la asociación de FHA con células tratadas con M $\beta$ CD. En la Figura 7 puede observarse que la interacción de FHA con la célula epitelial respiratoria se vio significativamente disminuida cuando se extrajo el colesterol de membrana sugiriendo que los rafts lipídicos actúan como plataformas que concentran moléculas involucradas en la interacción de FHA con la célula epitelial.



**Figura 7. La extracción de colesterol de membrana afecta la adhesión de FHA a las células epiteliales.** Células A549 ( $5 \times 10^3$ ) tratadas con DMEM-BSA (control) o DMEM-BSA-M $\beta$ CD (M $\beta$ CD) durante 15 min a 37 °C fueron incubadas con 34  $\mu$ g de FHA durante 1 h a 37 °C. Luego de varios lavados, FHA adherida a membrana fue detectada mediante incubación con anticuerpos de ratón anti-FHA seguido de anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados con CY3. (A) El nivel de adhesión de FHA a células A549 tratadas con o sin M $\beta$ CD se determinó por citometría de flujo. Como control de pegado inespecífico, células A549 no incubadas con FHA fueron tratadas con anticuerpos de ratón anti-FHA seguido de anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados con CY3 en ausencia de FHA (línea de puntos). El nivel de asociación de FHA a la célula se evaluó a través de la media geométrica de la fluorescencia roja asociada a la célula epitelial. El porcentaje de FHA asociado a las células A549 fue expresado en función del nivel de asociación de FHA a células control, arbitrariamente fijado como 100 %. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. El nivel de asociación de FHA a células tratadas con M $\beta$ CD difiere significativamente del nivel de asociación a células no tratadas (\* $P < 0.05$ ). B) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia. En ella se observa el nivel de asociación de FHA a células tratadas con o sin M $\beta$ CD.

Para evaluar la contribución relativa de esta adhesina en la asociación de *B. pertussis* con los dominios rafts se realizaron ensayos de adhesión en presencia de M $\beta$ CD utilizando una cepa defectiva en la expresión de FHA (BPGR4). En la Figura 8 se observa que, si bien la adhesión de BPGR4 a las células tratadas con M $\beta$ CD es menor que la adhesión a las células no tratadas, esta diferencia no es significativa, indicando que FHA es el principal factor de interacción de *B. pertussis* con los rafts lipídicos.

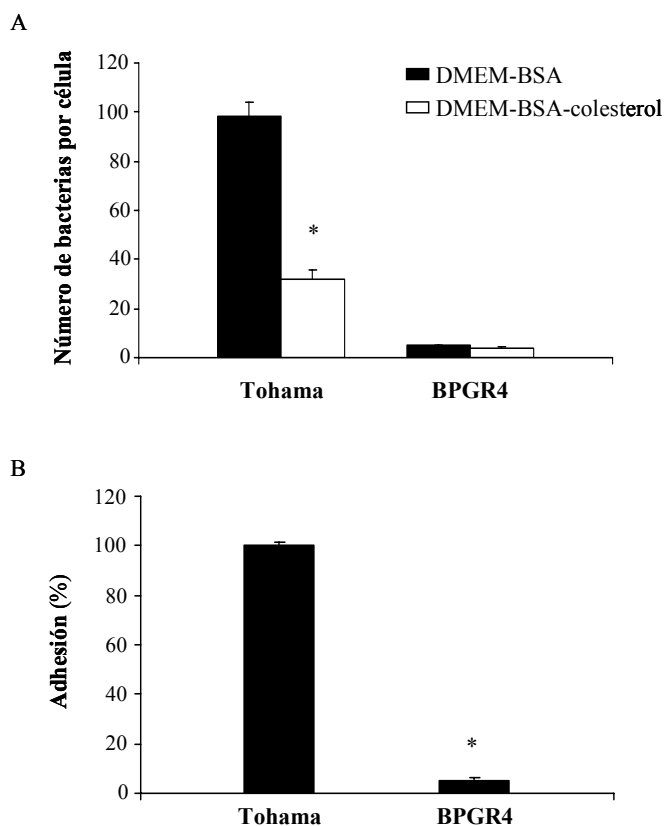


**Figura 8.** La interacción de *B. pertussis* con dominios rafts se produce fundamentalmente a través de FHA. Células A549 tratadas con DMEM + BSA (control) o con 13 mg/ml de M $\beta$ CD fueron incubadas con GFP-*B. pertussis* defectiva en la expresión de FHA (BPGR4) (R<sub>i</sub>b/c 150) durante 2 hs a 37 °C. La adhesión bacteriana fue evaluada mediante microscopía de fluorescencia. Los datos presentados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. No se observan diferencias significativas entre el nivel de adhesión de BPGR4 a células tratadas con M $\beta$ CD respecto al nivel de adhesión a células control (\*P<0.05).

### 2.3.5. *B. pertussis* es capaz de unir colesterol

Los resultados anteriores sugieren que FHA es la principal adhesina involucrada en la adhesión de *B. pertussis* a dominios ricos en colesterol. Una característica distintiva de esta proteína es su alto grado de hidrofobicidad que facilita su capacidad de interacción con dominios hidrofóbicos de la membrana celular [42, 43]. Con el fin de determinar si *B. pertussis*, a través de FHA, puede interaccionar directamente con el colesterol o bien la interacción de FHA con los rafts lipídicos se produce a expensas de otras moléculas presentes en estos dominios se estudió la capacidad de unión a colesterol de *B. pertussis* cepa salvaje y de BPGR4. La Figura 9A muestra que mientras la incubación de la cepa salvaje con colesterol previo a la incubación con células A549

disminuyó la adhesión bacteriana respecto al control no incubado con colesterol, la incubación de BPGR4 con colesterol no afectó la capacidad de unión del mutante a las células epiteliales. Estos resultados sugieren que el colesterol, además de estabilizar los dominios rafts, actuaría como receptor de esta bacteria a través de FHA (Fig. 9A).



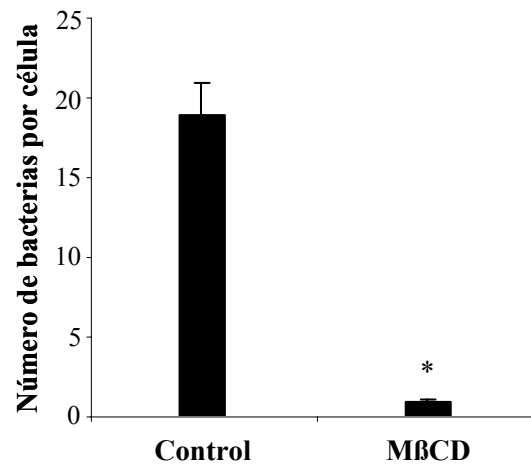
**Figura 9. *B. pertussis* interacciona con colesterol.** A) La cepa Tohama (*B. pertussis* cepa salvaje) o la cepa BPGR4 (*B. pertussis* defectiva en FHA), ambas expresando GFP, fueron incubadas con DMEM-BSA o en DMEM-BSA suplementado con colesterol (1,8 mg/ml) durante 1 h a 37 °C. Luego de dos lavados para remover el colesterol no unido, las bacterias fueron incubadas con células A549 durante 2 hs a 37 °C ( $R_i/b/c$  150). La adhesión bacteriana fue evaluada mediante microscopía de fluorescencia. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  DE de cuatro experimentos independientes. La adhesión de *B. pertussis* cepa salvaje preincubada con colesterol difiere significativamente de la adhesión de la misma cepa en ausencia de colesterol (\* $P < 0.05$ ). B) La unión de *B. pertussis* Tohama a placas recubiertas con colesterol es diferente a la de BPGR4. En la Figura se muestran los valores de absorbancia de una y otra cepa. La absorbancia debido a la adhesión de la cepa Tohama se fijó como 100 % de adhesión. Los datos representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. La unión de Tohama difiere significativamente de la unión de BPGR4 (\* $P < 0.05$ ).

La unión de *B. pertussis* a colesterol a través de FHA fue posteriormente confirmada mediante ensayos de adhesión bacteriana a placas de microtitulación recubiertas con colesterol. Como se muestra en la Figura 9B, la ausencia de FHA en la superficie bacteriana determina una significativa disminución en la adhesión de *B. pertussis* al colesterol. En experimentos control se analizó la capacidad de unión a colesterol de *E. coli* DH5 $\alpha$ . De acuerdo a lo esperado los resultados demuestran que esta bacteria no tiene afinidad por esta molécula (datos no mostrados).

### 2.3.6. Los dominios rafts también funcionan como sitios de anclaje de *B. pertussis* en fase avirulenta.

Una serie de estudios sugieren que la regulación diferencial de los factores de virulencia activados por el sistema de dos componentes BvgAS cumple un rol en la patogénesis de *B. pertussis*. Se ha postulado que durante la etapa de transmisión, la temperatura ambiente podría modular la bacteria de manera que la entrada al nuevo hospedador ocurriría en fase intermedia o avirulenta, esta última caracterizada por la ausencia de expresión de los genes regulados positivamente por el BvgAS, entre los cuales se encuentra *pha*, y la expresión de una serie de genes conjuntamente denominados *vrg* (*virulence repressed genes*), los cuales se encuentran reprimidos en la fase virulenta. Esto significa que en el fenotipo avirulento, postulado como predominante durante las etapas iniciales de infección, no sólo no está presente FHA sino que además es en general muy diferente al fenotipo virulento, posiblemente predominante en estadios posteriores del proceso infeccioso (fase virulenta). Debido a ello, se investigó si los rafts lipídicos podrían actuar como receptores celulares de *B. pertussis* en fase avirulenta. Para ello, se realizaron ensayos de adhesión a células A549 con bacterias sometidas a modulación mediante cultivo en presencia de  $\text{SO}_4\text{Mg}$ . Dado que el nivel de adhesión de *B. pertussis* en la fase avirulenta es significativamente menor que el de la fase virulenta, los ensayos fueron realizados utilizando una  $R_{i/b/c}$  de 300 lo cual permitió trabajar con niveles de adhesión aceptables. Los resultados de la Figura 10 demuestran que la adhesión de *B. pertussis* avirulenta disminuye drásticamente en aquellas células tratadas con M $\beta$ CD sugiriendo que *B. pertussis* en fase avirulenta expresa factores no presentes en fase virulenta con gran afinidad por los dominios rafts.





**Figura 10. La interacción de *B. pertussis* avirulenta con la célula epitelial es altamente dependiente de dominios rafts.** Células A549 tratadas con DMEM + BSA (control) o con 13 mg/ml de MβCD (MβCD) fueron incubadas con GFP-*B. pertussis* modulada a fase avirulenta (Rib/c 300) durante 2 hs a 37 °C. La adhesión bacteriana fue evaluada mediante microscopía de fluorescencia. Los datos presentados representan la media ± DE de tres experimentos independientes. La adhesión de *B. pertussis* avirulenta a células tratadas con MβCD difiere significativamente de la adhesión a células control (\*P<0.05).



## 2.4. Discusión

La adhesión al epitelio respiratorio es un evento central en la patogénesis de *B. pertussis* dado que la unión a la superficie epitelial promueve la liberación de toxinas y el establecimiento de la infección. La determinación de los factores que participan en esta interacción nos permite entender mejor la patogénesis de *B. pertussis* y los mecanismos a bloquear en la prevención de la colonización. En este Capítulo hemos analizado el rol de los rafts lipídicos en la interacción de *B. pertussis* con células epiteliales respiratorias de origen humano. Los resultados muestran por primera vez que el colesterol de membrana y los rafts lipídicos constituyen sitios de unión de *B. pertussis* a las células epiteliales. En esta interacción estaría involucrada FHA, una de las principales adhesinas de este patógeno.

Varios métodos han sido utilizados para estudiar el rol de los rafts lipídicos en los procesos infecciosos, uno de los más utilizados es el empleo de agentes secuestradores de colesterol como M $\beta$ CD, el cual, al remover el colesterol de membrana desorganiza estos dominios. En este estudio se observó que el tratamiento de las células A549 con M $\beta$ CD determinó una significativa disminución en la adhesión de *B. pertussis* a las células epiteliales. La desorganización de los rafts lipídicos utilizando otro tipo de drogas como nistatina y filipina, que unen colesterol de la membrana sin extraerlo, también determinó una disminución en la adhesión de la bacteria indicando que *B. pertussis* requiere colesterol para adherirse eficientemente a la superficie celular. La restitución del colesterol de membrana permitió reestablecer el nivel de adhesión a niveles normales lo cual confirma que el colesterol de membrana tiene un rol específico en el proceso de adhesión.

Debido a sus características fisicoquímicas, estos microdominios de membrana enriquecidos en colesterol y glicolípidos forman complejos insolubles (DRMs) luego de la solubilización de la membrana con Triton X-100 y se localizan en fracciones de baja densidad en gradientes de centrifugación [44], propiedad que permite separarlos del resto de los componentes de membrana. Mediante el aislamiento de dominios rafts de células infectadas con *B. pertussis* se encontró que este patógeno interacciona con estos dominios sugiriendo que uno o varios receptores celulares para *B. pertussis* se localizan en los rafts lipídicos de las células epiteliales. Estudios de colocalización mediante

microscopía confocal confirman estos resultados al revelar que *B. pertussis* colocaliza con flotilina, un marcador de dominios raft. Estudios de colocalización con células previamente tratadas con M $\beta$ CD demuestran que aquellas bacterias que aun se encuentran adheridas a la membrana epitelial luego de la extracción del colesterol presentan un alto grado de colocalización con flotilina sugiriendo que la interacción con la célula epitelial post-tratamiento con M $\beta$ CD se produce principalmente a expensas de dominios rafts remanentes. Estos resultados refuerzan nuestra hipótesis de que los rafts lipídicos funcionan como sitios de anclaje de *B. pertussis* a la célula epitelial.

Los resultados obtenidos en estos estudios demuestran que el colesterol de membrana, además de estabilizar los dominios rafts, podría funcionar como receptor de *B. pertussis*. Dado que el colesterol es uno de los componentes principales de las secreciones traqueales y su concentración aumenta bajo condiciones de hipersecreción [45, 46] como las encontradas durante la infección con *B. pertussis* [47], es probable que ésta capacidad de unión de *B. pertussis* directamente a colesterol contribuya significativamente a la colonización del tracto respiratorio durante la infección.

En experimentos en los cuales se evaluó la interacción de FHA, principal adhesina de *B. pertussis* [28], con células epiteliales se encontró que esta proteína se encuentra principalmente asociada a DRMs sugiriendo que los rafts lipídicos funcionan como plataformas de adhesión que reclutan receptores con los cuales FHA interacciona, contribuyendo a una efectiva adhesión. Una característica distintiva de esta adhesina es que una proporción importante de la misma es secretada al medio extracelular [48, 49]. Por otro lado, *B. pertussis* expresa una proteasa capaz de clivar FHA, lo cuál le permite a la bacteria liberarse del sitio de anclaje inicial. Se ha postulado que la existencia de esta actividad proteasa conjuntamente con la secreción de FHA al medio extracelular favorecen la dispersión de *B. pertussis* del foco inicial de infección a otros sitios permitiendo la unión de FHA libre a la membrana de células no infectadas y la posterior asociación de *B. pertussis* a través de interacciones FHA-FHA [50, 51]. Los resultados aquí expuestos sugieren que los rafts lipídicos, además de actuar como receptores celulares de *B. pertussis*, son importantes sitios de anclaje de FHA libre lo cual podría contribuir a la eficiencia de la colonización del tracto respiratorio. Mediante la utilización de mutantes defectivos en la expresión de FHA (BPGR4) se evaluó la contribución de FHA asociada a la superficie bacteriana en la interacción de *B. pertussis* con dominios rafts. El pretratamiento de las células con M $\beta$ CD no afecta la capacidad

de unión de este mutante a la célula epitelial indicando que la asociación de *B. pertussis* a los rafts lipídicos está mediada fundamentalmente por FHA, aunque no podemos excluir que otros factores contribuyan en esta interacción. Una característica de esta proteína es su alto grado de hidrofobicidad, propiedad que favorece la adhesión de la bacteria a la superficie de la célula eucariota [42]. Este componente hidrofóbico es probablemente el responsable de la alta afinidad que *B. pertussis* presenta por el colesterol, según pudo comprobarse en ensayos en los cuales mediante la utilización de mutantes defectivos en la expresión de FHA, se demostró que la unión de la bacteria a colesterol se encuentra principalmente mediada por esta adhesina. Al menos cuatro dominios de adhesión han sido identificados en FHA [48], entre los cuales se encuentran un dominio de unión a heparina, que media la adhesión a células no ciliadas, y un sitio de unión a carbohidratos que media la unión a lactosilceramidas. Los resultados aquí mostrados sugieren que la interacción de FHA con la célula epitelial se produce principalmente a través de los rafts lipídicos los cuales al concentrar moléculas con las que FHA es capaz de interactuar, como colesterol, lactosilceramidas y glicolípidos (por ej, asialo-GM1) asegurarían una alta concentración local de receptores favoreciendo la interacción de *B. pertussis* con la superficie celular. Otros estudios serán necesarios para dilucidar que otras moléculas reclutadas en los rafts lipídicos están involucradas en esta interacción.

*B. pertussis* posee un sistema de dos componentes, el BvgAS, que regula la expresión de genes involucrados en la virulencia según las condiciones del entorno. A través de este sistema este patógeno es capaz de modular su virulencia desde una fase avirulenta, caracterizada por la ausencia de expresión de los genes regulados positivamente por el BvgAS y la expresión de otros reprimidos por este sistema, a una fase virulenta caracterizada por la expresión de los principales factores de virulencia que produce esta bacteria entre los que se encuentran las adhesinas FHA, Fim y Prn, y las toxinas ACT y PT. Existe evidencia que sugiere que factores ambientales durante la transmisión persona a persona podrían modular *B. pertussis* de manera tal que al ingresar al nuevo hospedador la bacteria presenta un fenotipo avirulento o intermedio [52]. De ser así, durante los primeros estadios de colonización este patógeno interacciona con el hospedador con un fenotipo sustancialmente diferente al presente en estadios posteriores del proceso infeccioso. Debido a ello, el tipo de receptores potencialmente involucrados en la interacción de *B. pertussis* en fase avirulenta podría

resultar relevante. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que si bien la asociación de *B. pertussis* avirulenta con la célula epitelial es significativamente menor que en la fase virulenta, ésta se produce fundamentalmente a través de dominios rafts, lo cual se ve reflejado en la significativamente disminuida capacidad de unión de *B. pertussis* avirulenta a células tratadas con M $\beta$ CD. Estos resultados indican que aun si la bacteria se encuentra en fase avirulenta durante la transmisión, y por lo tanto no expresa FHA, los dominios rafts se comportarían como sitios de anclaje desde donde comenzar la infección.

La asociación con dominios rafts podría favorecer, a través del inicio de cascadas de señalización, la internalización de la bacteria y su sobrevivencia intracelular. Si bien la entrada vía rafts *per se* no determina que un patógeno sobreviva a la interacción con célula huésped, se ha postulado que la incorporación de componentes rafts lipídicos en la membrana del fagosoma contribuye a la evasión la vía degradativa. Por ejemplo, se ha demostrado que macropinosomas conteniendo *Brucella abortus* o *Brucella suis* se encuentran enriquecidos en GM1, proteínas ancladas a GPI y colesterol, todos provenientes del ingreso de la bacteria a través de los rafts lipídicos [12, 13]. La presencia de estas moléculas excluye la adquisición de marcadores característicos de la vía endosomal/lisosomal como Rab5, EEA1 y LAMP-1 evitando que la bacteria sea destruida en compartimientos lisosomales [53].

La asociación de un patógeno a dominios rafts también tiene otras consecuencias. Los rafts lipídicos no solo median la interacción de microorganismos con la célula huésped, sino que también funcionan como receptores celulares de una gran variedad de toxinas. En un trabajo recientemente publicado se demostró que la proteína BteA, secretada por el sistema de secreción tipo III (SSTT) de *B. bronchiseptica* e involucrada en procesos de intoxicación celular, interacciona con la membrana de la célula epitelial a través de dominios rafts. La unión de *B. bronchiseptica* a los rafts lipídicos favorecería este proceso permitiendo la acción local de BteA. Aunque no ha podido ser demostrado que *B. pertussis* Tohama posea un SSTT activo, en aislados clínicos de *B. pertussis* se ha encontrado un SSTT funcional, que estaría involucrado en mecanismos de subversión de la respuesta inmune innata y adaptativa [54]. Si bien mediante técnicas de espectroscopía de masa y análisis por MALDI-TOF no se pudo identificar a BteA entre las proteínas secretadas por este

sistema en *B. pertussis*, resultaría particularmente interesante investigar si la activación del SSTT de *B. pertussis* requiere el contacto previo con dominios ricos en colesterol.





## 2.5. Conclusiones

Los resultados descritos en este Capítulo demuestran que los rafts lipídicos están involucrados en la interacción de *B. pertussis* con la membrana plasmática de las células epiteliales. Esta interacción está mediada principalmente por FHA aunque no se puede excluir la posibilidad de que otras adhesinas también estén involucradas.

Los rafts lipídicos podrían funcionar como receptores celulares de FHA secretada facilitando la colonización de sitios distantes del foco primario de infección.

El colesterol cumple un rol crucial en el proceso de adhesión vía FHA lo cual podría ser importante no solo en la interacción de la bacteria con la célula epitelial sino también en el proceso de colonización del tracto respiratorio debido a las grandes cantidades de colesterol presentes en las secreciones traqueales.

Los rafts lipídicos también están involucrados en el anclaje de *B. pertussis* avirulenta a células epiteliales respiratorias lo cual podría ser relevante en algunos estadios del ciclo infeccioso.



## Referencias

1. Rappuoli R. **Pathogenicity mechanisms of *Bordetella***. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994,192:319-336.
2. Prasad SM, Yin Y, Rodzinski E, Tuomanen EI, Masure HR. **Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis***. *Infect Immun*. 1993,61:2780-2785.
3. Hannah JH, Menozzi FD, Renauld G, Loch C, Brennan MJ. **Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA**. *Infect Immun*. 1994,62:5010-5019.
4. 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*. 1990,61:1375-1382.
5. Inatsuka CS, Julio SM, Cotter PA. ***Bordetella* filamentous hemagglutinin plays a critical role in immunomodulation, suggesting a mechanism for host specificity**. *PNAS* 2005,102:18578-18583.
6. 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*. 2001,30:279-288.
7. Taieb N, Yahi N, Fantini J. **Rafts and related glycosphingolipid-enriched microdomains in the intestinal epithelium: bacterial targets linked to nutrient absorption**. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004,56:779-794.
8. Shaul PW, Anderson RG. **Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction**. *Am J Physiol*. 1998,275:L843-851.
9. Nichols B. **Caveosomes and endocytosis of lipid rafts**. *J Cell Sci*. 2003,116:4707-4714.
10. Peyron P, Bordier C, N'Diaye E-N, Maridonneau-Parini I. **Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins**. *J Immunol* 2000,165:5186-5191.
11. Maldonado-Garcia G, Chico-Ortiz M, Lopez-Marin LM, Sanchez-Garcia FJ. **High-Polarity *Mycobacterium avium*-Derived Lipids Interact with Murine Macrophage Lipid Rafts**. *Scandinavian Journal of Immunology* 2004,60:463-470.
12. Naroeni A, Porte F. **Role of Cholesterol and the Ganglioside GM1 in Entry and Short-Term Survival of *Brucella suis* in Murine Macrophages**. *Infect Immun*. 2002,70:1640-1644.
13. Watarai M, Makino S, Fujii Y, Okamoto K, Shirahata T. **Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication**. *Cell Microbiol*. 2002,4:341-355.
14. Watarai M, Makino S-i, Michikawa M, Yanagisawa K, Murakami S, Shirahata T. **Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to *Brucella abortus* infection of mice**. *Infect. Immun*. 2002,70:4818-4825.

15. Stuart ES, Webley WC, Norkin LC. **Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by *Chlamydiae* into host cells.** *Experimental Cell Research* 2003,287:67-78.
16. Kansau I, Berger C, Hospital M, Amsellem R, Nicolas V, Servin AL, Bernet-Camard MF. **Zipper-Like Internalization of Dr-Positive *Escherichia coli* by Epithelial Cells Is Preceded by an Adhesin-Induced Mobilization of Raft-Associated Molecules in the Initial Step of Adhesion.** *Infect Immun.* 2004,72:3733-3742.
17. Pucadyil TJ, Tewary P, Madhubala R, Chattopadhyay A. **Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: implications in leishmaniasis.** *Molecular and Biochemical Parasitology* 2004,133:145-152.
18. Lafont F, Tran Van Nhieu G, Hanada K, Sansonetti P, van der Goot FG. **Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction.** *EMBO J.* 2002,21:4449-4457.
19. Brennan M, Hannah J, Leininger E. **Adhesion of *Bordetella pertussis* to sulfatides and to the GalNAc beta 4Gal sequence found in glycosphingolipids.** *J. Biol. Chem.* 1991,266:18827-18831.
20. Tuomanen E, Towbin H, Rosenfelder G, Braun D, Larson G, Hansson GC, Hill R. **Receptor analogs and monoclonal antibodies that inhibit adherence of *Bordetella pertussis* to human ciliated respiratory epithelial cells.** *J Exp Med.* 1988,168:267-277.
21. Locht C, Geoffroy MC, Renauld G. **Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the papC and papD gene families.** *Embo J.* 1992,11:3175-3183.
22. Weingart CL, Broitman-Maduro G, Dean G, Newman S, Pepler M, Weiss AA. **Fluorescent Labels Influence Phagocytosis of *Bordetella pertussis* by Human Neutrophils.** *Infect Immun.* 1999,67:4264-4267.
23. Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. **A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells.** *Int J Cancer.* 1976,17:62-70.
24. Nagel J, de Graaf S, Schijf-Evers D. **Improved serodiagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis* by determination of IgG anti-LPF antibody levels.** *Dev Biol Stand.* 1985,61:325-330.
25. Rodriguez ME, Hellwig SMM, Hozbor DF, Leusen J, van der Pol W-L, van de Winkel JGJ. **Fc Receptor-Mediated Immunity Against *Bordetella pertussis*.** *J Immunol* 2001,167:6545-6551.
26. Hellwig SM, van Oirschot HF, Hazenbos WL, van Spriel 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.* 2001,183:871-879.
27. Sato H, Sato Y. ***Bordetella pertussis* infection in mice: correlation of specific antibodies against two antigens, pertussis toxin, and filamentous hemagglutinin with mouse protectivity in an intracerebral or aerosol challenge system.** *Infect. Immun.* 1984,46:415-421.
28. Rodriguez ME, Hellwig SMM, Perez Vidakovic MLA, Berbers GAM, van de Winkel JGJ. ***Bordetella pertussis* attachment to respiratory epithelial cells can be impaired by fimbriae-specific antibodies.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006,46:39-47.
29. Rostand K, Esko J. **Cholesterol and cholesterol esters: host receptors for *Pseudomonas aeruginosa* adherence.** *J. Biol. Chem.* 1993,268:24053-24059.

30. Chamberlain LH, Burgoyne RD, Gould GW. **SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001,98:5619-5624.
31. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979,76:4350-4354.
32. Schipper H, Krohne GF, Gross R. **Epithelial cell invasion and survival of *Bordetella bronchiseptica*.** *Infect Immun.* 1994,62:3008-3011.
33. 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.* 2001,69:6038-6043.
34. Perez 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.* 2007,51:414-421.
35. 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.* 2006,48:140-147.
36. Raghu H, Sharma-Walia N, Veetil MV, Sadagopan S, Caballero A, Sivakumar R, Varga L, Bottero V, Chandran B. **Lipid rafts of primary endothelial cells are essential for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8-induced phosphatidylinositol 3-kinase and RhoA-GTPases critical for microtubule dynamics and nuclear delivery of viral DNA but dispensable for binding and entry.** *J Virol.* 2007,81:7941-7959.
37. Allen JA, Yu JZ, Donati RJ, Rasenick MM. **Beta-adrenergic receptor stimulation promotes G alpha s internalization through lipid rafts: a study in living cells.** *Mol Pharmacol.* 2005,67:1493-1504.
38. Haglund K, Ivankovic-Dikic I, Shimokawa N, Kruh GD, Dikic I. **Recruitment of Pyk2 and Cbl to lipid rafts mediates signals important for actin reorganization in growing neurites.** *J Cell Sci.* 2004,117:2557-2568.
39. Simons K, Toomre D. **Lipid rafts and signal transduction.** 2000,1:31-39.
40. Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K. **Extraction of Cholesterol with Methyl-beta -Cyclodextrin Perturbs Formation of Clathrin-coated Endocytic Vesicles.** *Mol. Biol. Cell* 1999,10:961-974.
41. Smart EJ, Anderson RG. **Alterations in membrane cholesterol that affect structure and function of caveolae.** *Methods Enzymol.* 2002,353:131-139.
42. Fish F, Navon Y, Goldman S. **Hydrophobic adherence and phase variation in *Bordetella pertussis*.** *Medical Microbiology and Immunology* 1987,176:37-46.
43. Skelton SK, Wong KH. **Simple, efficient purification of filamentous hemagglutinin and pertussis toxin from *Bordetella pertussis* by hydrophobic and affinity interaction.** *J. Clin. Microbiol.* 1990,28:1062-1065.
44. Rietveld A, Simons K. **The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts.** *Biochim Biophys Acta.* 1998,1376:467-479.
45. Reid LM. **The pathology of obstructive and inflammatory airway diseases.** *Eur J Respir Dis Suppl.* 1986,147:26-37.

46. Widdicombe JG. **Role of lipids in airway function.** *Eur J Respir Dis Suppl.* 1987,153:197-204.
47. Mattoo S, Cherry JD. **Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies.** *Clin. Microbiol. Rev.* 2005,18:326-382.
48. Locht C, Bertin P, Menozzi FD, Renauld G. **The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella* spp.** *Mol Microbiol.* 1993,9:653-660.
49. Renauld-Mongenie G, Cornette J, Mielcarek N, Menozzi FD, Locht C. **Distinct roles of the N-terminal and C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin.** *J Bacteriol.* 1996,178:1053-1060.
50. Tuomanen E. **Piracy of adhesins: attachment of superinfecting pathogens to respiratory cilia by secreted adhesins of *Bordetella pertussis*.** *Infect. Immun.* 1986,54:905-908.
51. Coutte L, Alonso S, Reveneau N, Willery E, Quatannens B, Locht C, Jacob-Dubuisson F. **Role of Adhesin Release for Mucosal Colonization by a Bacterial Pathogen.** *J. Exp. Med.* 2003,197:735-742.
52. 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.* 2005,73:748-760.
53. Kim S, Watarai M, Makino S-i, Shirahata T. **Membrane sorting during swimming internalization of *Brucella* is required for phagosome trafficking decisions.** *Microbial Pathogenesis* 2002,33:225-237.
54. 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.* 2008,76:1257-1266.

## CAPÍTULO 3

***B. pertussis* ingresa a las células epiteliales a través de mecanismos dependientes de colesterol**





## CAPÍTULO 3

### 3. *B. pertussis* ingresa a las células epiteliales a través de mecanismos dependientes de colesterol

#### 3.1. Introducción

En los últimos años el número de casos reportados de tos convulsa ha aumentado considerablemente aun en países con elevada incidencia de vacunación. La reemergencia de esta enfermedad ha sido atribuida en parte a la corta duración de la inmunidad conferida por vacunación, a la deficiencia de las vacunas en uso de proteger contra la colonización y a la inmunoselección de variantes de *B. pertussis* con diferencias inmunogénicas respecto de la cepa vacunal [1]. Esta deficiencia en la protección determina que adultos e infantes vacunados, que en la mayoría de los casos cursan la infección de forma asintomática o con sintomatología leve, se conviertan en importantes reservorios y fuentes de contagio de esta enfermedad. La localización de esta bacteria durante eventuales periodos crónicos y asintomáticos se desconoce. En una serie de estudios realizados *in vitro* se ha encontrado a *B. pertussis* en localización intracelular [2-4], lo que ha llevado a especular que este patógeno, históricamente considerado extracelular, podría tener una fase intracelular durante el período infeccioso constituyendo tal vez un mecanismo de persistencia. No obstante, la capacidad de *B. pertussis* de invadir células epiteliales es aun motivo de controversia debido, en parte, a que no se ha descrito ninguna invasina en esta bacteria y se desconocen los mecanismos que posibilitarían su entrada y eventual sobrevivencia en la célula huésped.

La invasión de las células epiteliales puede ocurrir mediante diferentes mecanismos, que han sido caracterizados en una gran variedad de patógenos. Por ejemplo, la entrada de bacterias como *Yersinia*, *Neisseria*, *Listeria*, *Helicobacter pylori* y *Streptococcus* ocurre a través de un mecanismo pasivo tipo “zipper” o en cremallera, el cual se caracteriza por la invaginación de la membrana de la célula huésped en el sitio de adhesión de la bacteria de manera tal que la membrana celular se cierra como una cremallera alrededor de la superficie de la bacteria [5-8]. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) parece ser internalizada mediante un mecanismo similar

precedido por la formación de un pedestal de adhesión [9-11]. En contraste, la internalización de *Salmonella* y *Shigella* ocurre activamente por macropinocitosis e involucra la formación de “membrane ruffles” [12, 13]. Varios estudios han demostrado que la adhesión bacteriana a la superficie celular puede promover la activación de cascadas de señalización intracelular que muchas veces conllevan a la inducción de rearrreglos a nivel del citoesqueleto. Tal es el caso de *Yersinia* cuya internalización requiere la activación de tirosin-quinazas [14]. La invasión de *Salmonella* es dependiente de la activación de la fosfolipasa C [15], y *Shigella* una vez internalizada es capaz de inducir el ensamble de filamentos de actina para facilitar su dispersión entre las células [16]. *Listeria* ingresa a células HeLa a través de la activación de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K), una quinasa que juega un rol importante en procesos de fagocitosis, promoviendo la activación de la GTPasa Rac, y rearrreglos del citoesqueleto [17]. La controversia que se ha generado en torno a la capacidad de *B. pertussis* de invadir células epiteliales, se debe fundamentalmente a no se han caracterizado aun los potenciales mecanismos involucrados en la entrada de *B. pertussis*. En el Capítulo anterior se ha demostrado que *B. pertussis* se adhiere a dominios rafts lipídicos, los cuales participan activamente en la invasión de una gran variedad de patógenos [18]. La adhesión a dominios rafts permite el reclutamiento de moléculas involucradas en mecanismos de señalización intracelular facilitando el ingreso del microorganismo y determinando, en muchos casos, la evasión de la vía degradativa y la sobrevivencia intracelular. Es por ello que en los ensayos descritos en este Capítulo se intentó evaluar si en realidad existe invasión a células epiteliales a través del estudio de eventuales rutas de señalización activadas a partir de la interacción de *B. pertussis* con la célula eucariota, la importancia de los dominios rafts en este proceso y la capacidad de sobrevivencia de *Bordetella pertussis* en este tipo celular.

## 3.2. Materiales y métodos

### 3.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Para la realización de este estudio se utilizó la cepa salvaje *B. pertussis* Tohama I. La bacteria fue cultivada en placas de Agar Bordet Gengou (DIFCO Laboratories, USA) suplementada con 15 % v/v de sangre desfibrinada de carnero (ABGs) durante 72 hs a 37 °C, al cabo del cual se repicó en una nueva placa ABGs y se cultivó a 37 °C durante 24 hs.

### 3.2.2. Células y condiciones de cultivo

Como modelo de infección se utilizó la línea celular humana (neumocitos tipo II) A549 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) [19] y la línea celular humana Calu-6 (células del epitelio bronquial) (gentilmente cedidas por el Dr. Baldi, Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires). Las células fueron cultivadas en botellas (Falcon 3002; Becton Dickinson, San Jose, CA) en medio simple modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL, Gran Island, NY) suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (SFB) (Cansera, Rexdale, ON, Canada) inactivado por calor, 100 unidades/ml de penicilina, y 100 mg/ml de streptomina (Pen/Strep) (BioWhittaker, Walkersville, MD) en estufas a 37 °C, con 5 % de CO<sub>2</sub> y 100 % de humedad. Cuando el cultivo alcanzó un 80 % de confluencia, las células fueron removidas con tripsina (0.25 % v/v)-EDTA (0.1 % p/v) (KuraboCo., Ltd., Osaka, Japón) y cultivadas en placas de 24 pocillos. El estado del cultivo se testeó por observación microscópica y recuento de células viables por exclusión mediante tinción con Trypan blue en pocillos elegidos al azar.

### 3.2.3. Extracción del colesterol de membrana

El colesterol de membrana fue extraído mediante la incubación de las células A549 con 10 mM de metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) (Sigma) durante 15 min a 37 °C en medio DMEM suplementado con BSA (0,2 % p/v) y lovastatina (5  $\mu$ g/ml) (Sigma)

(DMEM-BSA-L). La viabilidad celular no se vio afectada por ninguno de los tratamientos según pudo determinarse mediante tinción vital con Trypan blue.

#### 3.2.4. Ensayos de sobrevida

Células A549 o Calu-6 fueron lavadas con medio DMEM suplementado con BSA al 0.2 % p/v (DMEM-BSA) previo a la infección con *B. pertussis* suspendida en DMEM-BSA ( $R_i b/c$  100). El inóculo bacteriano fue cuantificado mediante recuento en placas ABGs. Para facilitar la interacción entre las bacterias y las células epiteliales, las células fueron centrifugadas durante 5 min a 640 x g. Posteriormente fueron incubadas durante 2 hs a 37 °C con 5 % CO<sub>2</sub>, y lavadas para eliminar las bacterias no adheridas. A menos que se especifique lo contrario, luego de estos lavados las células fueron incubadas durante 24 hs para permitir que la internalización ocurra y posteriormente incubadas durante 1 h a 37 °C con sulfato de polimixina B (100 µg/ml) (Sigma), un antibiótico que no puede penetrar en las células eucariotas [20] en las condiciones de cultivo utilizadas, con el fin de eliminar las bacterias extracelulares remanentes. Finalmente el número de bacterias viables intracelulares se determinó según se detalla a continuación: las células infectadas fueron removidas con tripsina (0.25 % v/v)-EDTA (0.1 % p/v) y se dividieron en dos alícuotas, una de ellas se utilizó para determinar el número de células epiteliales viables mediante tinción con Trypan blue; la otra alícuota fue centrifugada a 800 x g y las células fueron lisadas por tratamiento con saponina al 0,1 % p/v en agua destilada durante 30 min a 4 °C. El número de bacterias intracelulares viables se determinó por recuento en placas de ABG de diluciones seriadas.

En ensayos de sobrevida a largo plazo, las células epiteliales fueron incubadas durante 2 hs a 37 °C con *B. pertussis* ( $R_i b/c$  100), lavadas e incubadas durante 24 hs a 37 °C para que la internalización ocurra. Posteriormente se agregó sulfato de polimixina B (100 µg/ml). Luego de 1 h de incubación con antibiótico, la concentración de polimixina B fue reducida a 5 µg/ml y el recuento de bacterias viables intracelulares fue determinado a las 0 y 24 hs post-tratamiento con el antibiótico según ha sido detallado anteriormente.

En experimentos control se evaluó la actividad bactericida del antibiótico. Brevemente, muestras de  $5 \times 10^7$  bacterias fueron incubadas con 1 ml de polimixina B

(100 µg/ml), durante 1h a 37 °C, lavadas y plaqueadas en placas ABGs. El tratamiento determinó una disminución del 99,999 % de UFC.

### 3.2.5. Ensayos de inhibición

Para el estudio de las vías de señalización, células A549 fueron tratadas con 1,5 µM de wortmanina (Calbiochem), 100 µM de genisteína (Calbiochem), 10 µM del aminoesteroide U73122 (Sigma), 450 nM de calfostina C (Sigma), 400 nM de staurosporina (Sigma), 0,5 µM de citocalasina D (Sigma) ó 5 µg/ml de nocodazol (Sigma) (gentilmente cedidas por el Dr. Pablo Perez, Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, CONICET-UNLP, La Plata) durante 15 min a 37 °C en 5 % CO<sub>2</sub>. Posteriormente se realizó la infección con *B. pertussis* utilizando una R<sub>i</sub>b/c de 100. Luego de 2 hs de incubación a 37 °C las células fueron lavadas e incubadas a 37 °C durante 24 hs. El número de bacterias intracelulares se determinó luego del tratamiento con polimixina B 100 µg/ml durante 1 h según ha sido detallado anteriormente. La concentración de inhibidores se mantuvo a lo largo de las 24 hs de incubación. La integridad celular no se vio afectada por los tratamientos según pudo comprobarse mediante tinción con Trypan Blue.

### 3.2.6. Cuantificación de bacterias internalizadas mediante microscopía de fluorescencia

*B. pertussis* suspendida en DMEM-BSA se utilizó para infectar células A549 y Calu-6 en una R<sub>i</sub>b/c de 100, según fue detallado anteriormente. Luego de 2 hs de incubación a 37 °C con 5 % CO<sub>2</sub>, las bacterias no adheridas fueron removidas mediante la realización de tres lavados e incubadas a 37 °C durante 24 hs previo a la fijación con paraformaldehído al 3 % p/v. El número de bacterias adheridas e internalizadas fue estimado mediante microscopía de fluorescencia. Para ello, las células infectadas se incubaron con anticuerpos policlonales de conejo anti-*B. pertussis* (30 min a 4 °C), seguido de la incubación con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con CY3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) (30 min a 4 °C). Para evitar el pegado inespecífico todas las incubaciones fueron realizadas en presencia de 25 % v/v de suero normal humano inactivado por calor. Posteriormente las

células fueron incubadas con saponina al 0,1 % p/v para permeabilizar la membrana celular y las bacterias intra y extracelulares fueron teñidas con anticuerpos policlonales de conejo anti-*B. pertussis* (30 min a 4 °C) seguidos por la incubación con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) (30 min a 4 °C). Las muestras fueron analizadas mediante microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio DMLB acoplado a una cámara DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Switzerland). El número de bacterias extracelulares (rojas y verdes) e intracelulares (verdes) fue evaluado mediante recuento de al menos 20 campos conteniendo entre 3 y 5 células.

### 3.2.7. Microscopía electrónica de barrido

Células A549 incubadas con *B. pertussis* (R<sub>i</sub>b/c 100) durante 2 hs a 37 °C fueron lavadas para eliminar bacterias no adheridas, incubadas durante 24 hs a 37 °C y posteriormente fijadas con glutaraldehído al 2 % v/v en PBS durante 2 hs a 4 °C. Las muestras fueron deshidratadas con concentraciones crecientes de etanol absoluto en agua bidestilada. La deshidratación final se realizó por punto crítico en CO<sub>2</sub> líquido (Baltec CP 30, Japón). Por último las muestras se recubrieron con una capa de oro durante 4 a 5 min en vacío en un equipo Jeol Fine Coat Sputter JFC-1100 y se observaron en un microscopio electrónico de barrido modelo JSM-6360 LV.

### 3.2.8. Microscopía confocal

Células A549 o Calu-6 incubadas con *B. pertussis* (R<sub>i</sub>b/c 100) durante 2 hs a 37 °C fueron lavadas para eliminar bacterias no adheridas e incubadas durante 24 hs a 37 °C para permitir la internalización de la bacteria. Las células fueron luego tratadas con polimixina B (100 µg/ml) durante 1 h y posteriormente incubadas durante 24 hs en presencia de 5 µg/ml de Polimixina B. Finalmente las muestras fueron fijadas con PFA 3 % p/v y procesadas para su observación en microscopio de fluorescencia según se detalla a continuación. Las células fueron lavadas con PBS e incubadas durante 10 min con NH<sub>4</sub>Cl 50 mM en PBS. Luego de dos lavados, las células se permeabilizaron mediante la incubación con saponina 0.1 % p/v y BSA 0.5 % p/v en PBS durante 30 min a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpos monoclonales de ratón anti-

LAMP-1 humana (PharMingen, San Diego, CA, USA) y anticuerpos policlonales de conejo anti-*B. pertussis* en presencia de saponina 0.1 % p/v-BSA 0.5 % p/v durante 1 h a 4 °C. Como segundo anticuerpo se utilizaron fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con CY3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove) y fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove). La incubación se llevó a cabo durante 30 min a 4 °C en presencia de 25 % v/v de suero normal humano inactivado por calor para evitar el pegado inespecífico de los anticuerpos. Las muestras fueron analizadas mediante microscopía de fluorescencia confocal utilizando un microscopio marca Olympus FV 300. El porcentaje de bacterias colocalizando con LAMP fue calculado mediante el análisis de al menos 20 campos conteniendo entre 3 y 5 células.

Para la visualización de filamentos de actina, células A549 infectadas con *B. pertussis* durante 2 hs fueron lavadas e incubadas durante 24 hs para permitir que la internalización ocurra. Posteriormente las muestras fueron fijadas y permeabilizadas con saponina. *B. pertussis* fue visualizada mediante tinción con anticuerpo policlonal de conejo anti-*B. pertussis* seguido por fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti IgG de conejo conjugados con CY3. Los filamentos de actina fueron detectados mediante la incubación con faloidina conjugada con FITC (Sigma) (gentilmente cedida por el Dr. Pablo Perez, Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, CONICET-UNLP, La Plata).

### 3.2.9. Análisis estadístico

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

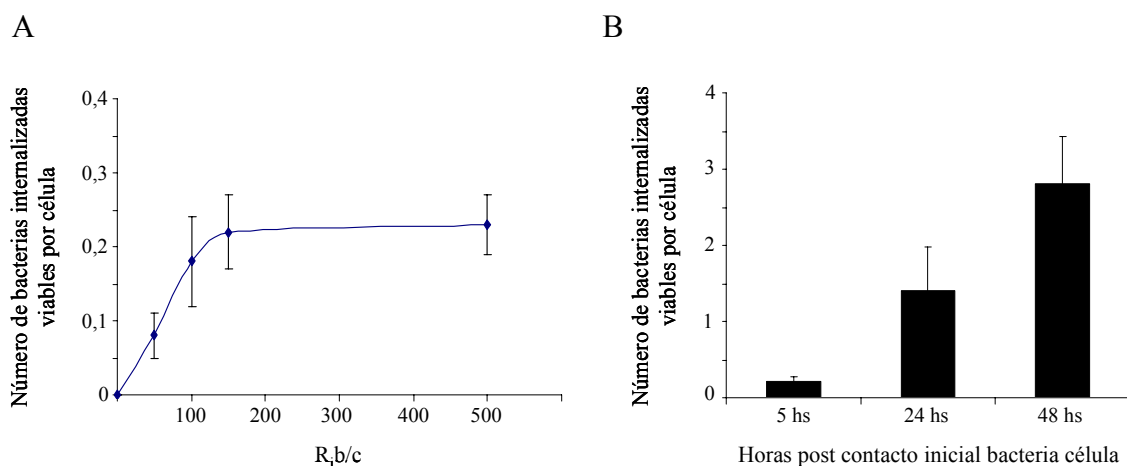




### 3. 3. Resultados

#### 3.3.1. Optimización de los niveles de invasión

Datos previos de nuestro grupo sugieren que *B. pertussis* es capaz de invadir células epiteliales A549 dentro de las cinco horas post-contacto con la célula epitelial. Sin embargo los niveles de invasión alcanzados en este período de tiempo son relativamente bajos lo que dificulta la realización de estudios de tráfico intracelular y de sobrevivencia a largo plazo. Debido a ello, en una primera etapa, se realizaron estudios para optimizar los tiempos de interacción patógeno-célula epitelial. Células A549 fueron incubadas con *B. pertussis* utilizando diferentes  $R_i$ b/c iniciales y se variaron los tiempos de infección. Para disminuir los niveles de toxicidad provocados por la secreción de toxinas bacterianas, en todas las condiciones ensayadas luego de un período de adhesión de 2 hs las células fueron lavadas para eliminar las bacterias no adheridas. Las células así lavadas fueron incubadas a 37 °C durante diferentes períodos de tiempo para permitir la internalización. El número de bacterias viables intracelulares a diferentes tiempos se evaluó mediante recuento de UFC post-tratamiento con polimixina B para inactivar las bacterias remanentes en la superficie celular. En la Figura 1 se observa que mientras una  $R_i$ b/c mayor que 100 no determina un aumento significativo en el nivel de internalización, el aumento en los tiempos de incubación conllevó a un incremento importante en el número de bacterias internalizadas. Si bien a las 48 hs post-infección



**Figura 1. Invasión de *B. pertussis* a células A549.** A) *B. pertussis* cepa salvaje fue incubada con células A549 utilizando diferentes  $R_i$ b/c en medio DMEM-BSA. Luego de 2 hs de adhesión, las células fueron

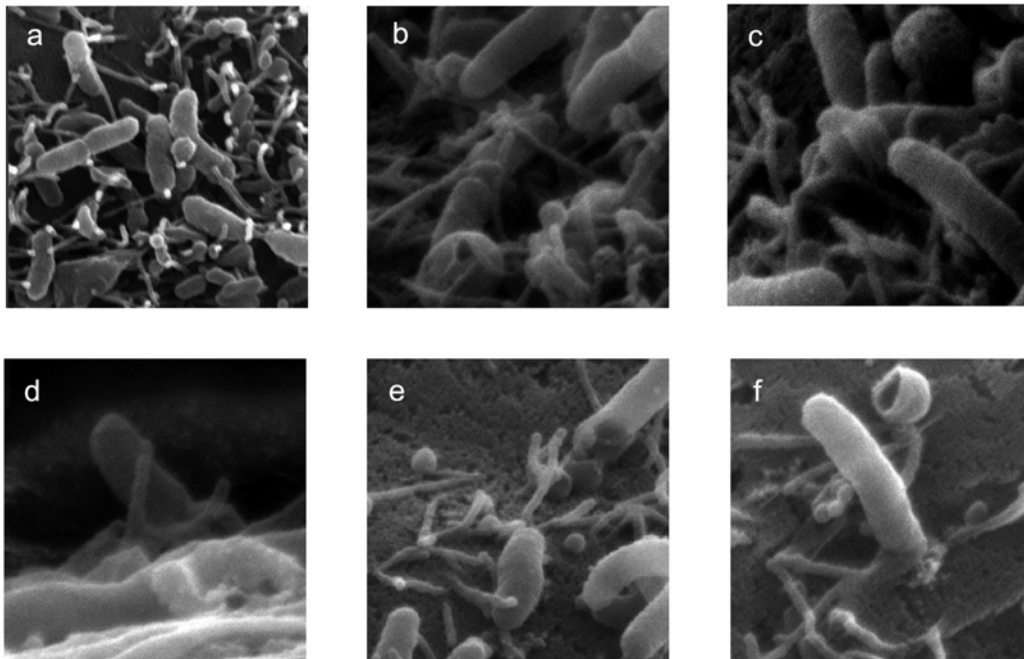
lavadas para eliminar bacterias no adheridas, e incubadas durante cinco horas para permitir que la internalización ocurra. Posteriormente las células fueron tratadas con polimixina B para inactivar bacterias adheridas a la superficie celular y el número de bacterias viables por célula se determinó mediante recuento de UFC. B) Células A549 incubadas con *B. pertussis* ( $R_i$ /b/c 100) en DMEM-BSA durante 2 hs a 37 °C fueron lavadas e incubadas durante 5, 24 o 48 horas en medio DMEM + SFB 10 %. Posteriormente fueron tratadas con polimixina B y el número de bacterias intracelulares viables se determinó por recuento de UFC.

el nivel de internalización alcanza un máximo, comienzan a observarse signos de apoptosis celular lo que determinó que los estudios de invasión descritos en este Capítulo se realizaran utilizando un período de incubación bacteria-célula de 24 horas y una  $R_i$ /b/c de 100.

### 3.3.2. Caracterización de la entrada de *B. pertussis* a la célula epitelial.

#### 3.3.2.1. Análisis a nivel ultraestructural de la interacción de *B. pertussis* con células A549

Para comenzar el estudio de la internalización de *B. pertussis* por la célula epitelial se realizaron estudios de microscopía electrónica de barrido de células infectadas con *B. pertussis*. La mayoría de las bacterias se unen longitudinalmente a la superficie epitelial, observándose la presencia de extensiones tipo microvellocidades



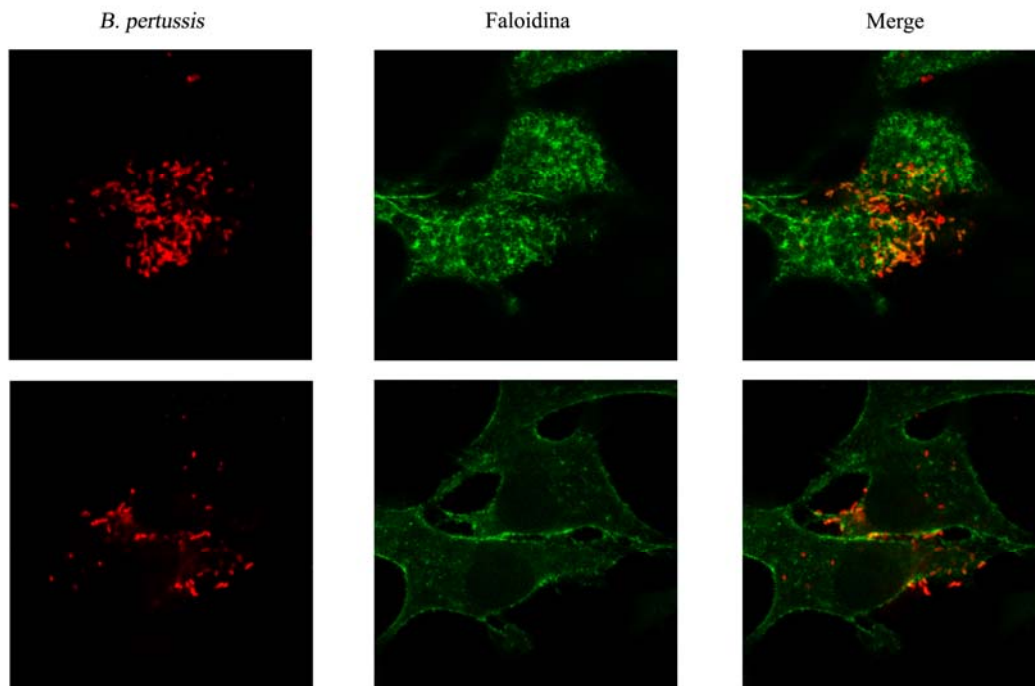
**Figura 2. Microscopía electrónica de células infectadas con *B. pertussis*.** Células A549 fueron infectadas con *B. pertussis* ( $R_i$ /b/c 100) durante 2 hs, lavadas e incubadas durante 24 hs en medio DMEM

+ SFB 10 % v/v. Posteriormente las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 2 % v/v y procesadas para su observación en microscopio electrónico de barrido.

que se proyectan desde la superficie de la célula y que se encuentran en estrecho contacto con la bacteria adherida (Fig. 2a y b), en algunos casos estas extensiones presentan signos de fusión (Fig. 2c y d) sugiriendo que la entrada podría ocurrir por un mecanismo tipo zipper. Con menor frecuencia se observan bacterias ingresando de forma polar a la célula epitelial e interaccionando con proyecciones de la membrana plasmática (Fig. 2e y 2f).

### 3.3.2.2. Rol del citoesqueleto en la entrada de *B. pertussis* a la célula epitelial

El citoesqueleto está compuesto fundamentalmente por filamentos de actina y microtúbulos. El ingreso de las bacterias a las células eucariotas generalmente involucra arreglos a nivel del citoesqueleto. El rol de los filamentos de actina en la interacción de *B. pertussis* con las células A549 se evaluó mediante microscopía confocal. Como se puede ver en la Figura 3 (panel superior) la mayoría de las bacterias adheridas a la superficie apical de la membrana celular presentan un alto grado de colocación con faloidina, una marca que se une específicamente a filamentos de actina, sugiriendo que

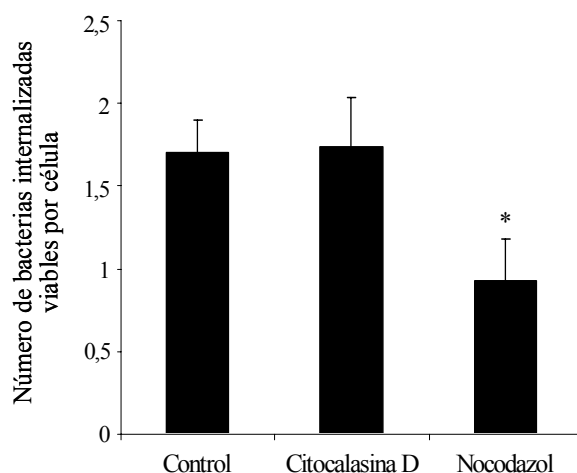


**Figura 3. Reclutamiento de filamentos de actina en los sitios de unión de *B. pertussis* a la superficie epitelial.** Células A549 fueron infectadas con *B. pertussis* (R<sub>i</sub>b/c 100) durante 24 hs, permeabilizadas con saponina 0.1 % p/v y marcadas con faloidina-FITC. *B. pertussis* fue detectada por incubación con

anticuerpo policlonal de conejo anti-*B. pertussis* seguido por fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con CY3. Las imágenes fueron obtenidas en varios planos focales mediante escaneos desde el plano apical al plano basal de la célula. En el panel superior se observan bacterias (rojas) adheridas a la superficie apical de la célula epitelial colocalizando con filamentos de actina (verde). En el panel inferior se muestran imágenes correspondientes a un plano más basal en el que se observan *B. pertussis* en localización intracelular y bacterias adheridas a la periferia de la célula. No se observan signos de colocalización entre *B. pertussis* intracelular y los filamentos de actina. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes.

se produce una movilización de actina alrededor de la bacteria adherida. Sin embargo, las bacterias que se encuentran en localización intracelular (Fig. 3, panel inferior) no presentan signos de colocalización con este marcador.

Para evaluar si el paso de internalización de *B. pertussis* es un evento dependiente de la polimerización de filamentos de actina se realizaron estudios de invasión en presencia de citocalasina D. La disrupción de los filamentos de actina no afectó el nivel de internalización de *B. pertussis* (Fig. 4) sugiriendo que la entrada de este patógeno a las células A549 no es un proceso dependiente de la movilización de F actina alrededor de las células adheridas. Para evaluar el rol de otros componentes del citoesqueleto en la internalización de *B. pertussis* se realizaron ensayos de invasión utilizando nocodazol, un desorganizador de microtúbulos. El tratamiento con esta droga determinó una disminución en la internalización del  $54 \pm 4 \%$  (Fig. 4) respecto al control sugiriendo que el ingreso de *B. pertussis* a la célula epitelial es un proceso dependiente de los microtúbulos.

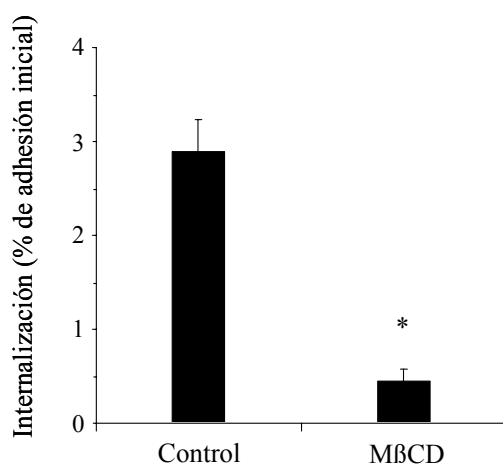


**Figura 4. Efecto de la desorganización del citoesqueleto en la internalización de *B. pertussis*.** Células A549 tratadas con DMEM-BSA (control), citocalasina D (0,5  $\mu$ M) o nocodazol (5 $\mu$ g/ml) durante 15 min a 37 °C fueron infectadas con *B. pertussis* (R<sub>0</sub>/c 100). Luego de 2 hs de adhesión, las células fueron lavadas para eliminar bacterias no adheridas e incubadas durante 24 horas para permitir que la internalización ocurra. Posteriormente las células fueron tratadas con polimixina B para inactivar bacterias extracelulares, y el número de bacterias viables por célula se determinó mediante recuento de

UFC. El porcentaje de invasión en células tratadas con nocodazol difiere significativamente del porcentaje de invasión en células control (\* $P < 0,05$ ).

### 3.3.2.3. Los rafts lipídicos participan en la entrada de *B. pertussis* a la célula epitelial.

Para evaluar si los dominios rafts lipídicos están involucrados en la internalización de *B. pertussis* por las células epiteliales, se determinó el número de bacterias intracelulares viables en células tratadas con o sin metil- $\beta$ -ciclodextrina. La internalización se expresó en función del número de bacterias adheridas lo cual permitió evaluar este parámetro de forma independiente de la adhesión inicial que, según se determinó en el Capítulo anterior, se ve afectada por el tratamiento con M $\beta$ CD. Los resultados indican que el número de bacterias intracelulares viables se encuentra significativamente disminuido cuando las células son tratadas con M $\beta$ CD (Fig. 5) sugiriendo que los rafts lipídicos están implicados en la internalización de *B. pertussis*.



**Figura 5. La extracción del colesterol reduce el número de bacterias viables intracelulares.** Células A549 incubadas con medio DMEM-BSA (control) o con medio conteniendo 13 mg/ml de M $\beta$ CD (M $\beta$ CD) durante 15 min a 37 °C fueron infectadas con *B. pertussis* (R<sub>i</sub>b/c 100) durante 2 hs y lavadas. Algunos covers fueron fijados con paraformaldehído y observados en microscopio de fluorescencia (nivel de adhesión inicial) mientras que otros fueron incubados durante 24 horas en medio DMEM-BSA (control) o en medio DMEM-BSA-L (M $\beta$ CD). Transcurridas las 24 hs se agregó Polimixina B y el número de bacterias viables por célula se determinó mediante recuento de UFC. El nivel de internalización fue calculado como porcentaje del correspondiente valor de adhesión. La internalización de *B. pertussis* por células tratadas con M $\beta$ CD difiere significativamente de la internalización por células control (\* $P < 0,05$ ).

### 3.3.2.4. *B. pertussis* ingresa a la célula epitelial en un proceso dependiente de tirosin-quinazas.

Para evaluar los componentes de señalización celular involucrados en la internalización de *B. pertussis* se realizaron estudios de invasión utilizando una serie de inhibidores que afectan los procesos endocíticos. El tratamiento con genistéina, un inhibidor de tirosin-quinazas de amplio espectro que afecta selectivamente la

endocitosis mediada por dominios rafts [21], disminuyó significativamente la invasión de *B. pertussis*, confirmando que la internalización de este patógeno ocurre a través de dominios rafts e involucra la activación de tirosin-quinasa. Los otros inhibidores utilizados fueron wortmanina, un inhibidor de fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K); staurosporina, un potente inhibidor de Ser/Thr quinasa; calfofostina C, un inhibidor de la proteína quinasa C (PKC), y U73122, un inhibidor de la fosfolipasa C (PLC). Estas enzimas están involucradas en un amplio espectro de funciones celulares, y participan en la internalización de una gran variedad de patógenos. Los resultados de la Tabla 1 indican que el ingreso de *B. pertussis* a las células A549 no se encuentra afectado por el bloqueo de ninguna de estas enzimas sugiriendo que las mismas no están involucradas en la internalización de *B. pertussis* por este tipo celular.

**Tabla 1.** Efecto de inhibidores de señalización en la internalización de *B. pertussis* por células A549.

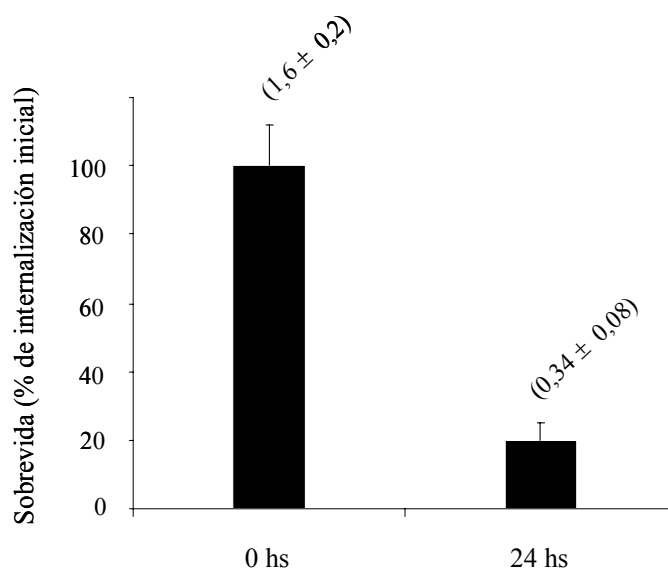
| Inhibidor <sup>a</sup> | Bacterias intracelulares viables/célula | % de invasión <sup>b</sup> |
|------------------------|---|----------------------------|
| Ninguno                | 1,89 ± 0,4                              | 2,7                        |
| Staurosporina          | 1,55 ± 0,5                              | 2,4                        |
| Calfofostina C         | 1,77 ± 0,5                              | 2,6                        |
| U73122                 | 2,5 ± 0,3                               | 3,1                        |
| Wortmanina             | 1,6 ± 0,2                               | 2,7                        |
| Genisteína             | 0,97 ± 0,3                              | 1,5                        |

<sup>a</sup> Agente con que se trataron las células A549 antes de su infección con *B. pertussis*. DMEM-BSA (ninguno) o DMEM-BSA con: staurosporina (400 nM), calfofostina C (450 nM), U73122 (10 µM), wortmanina (1,5 µM), ó genisteína (100 µM).

<sup>b</sup> Valor calculado como porcentaje del valor de adhesión observado en cada tratamiento.

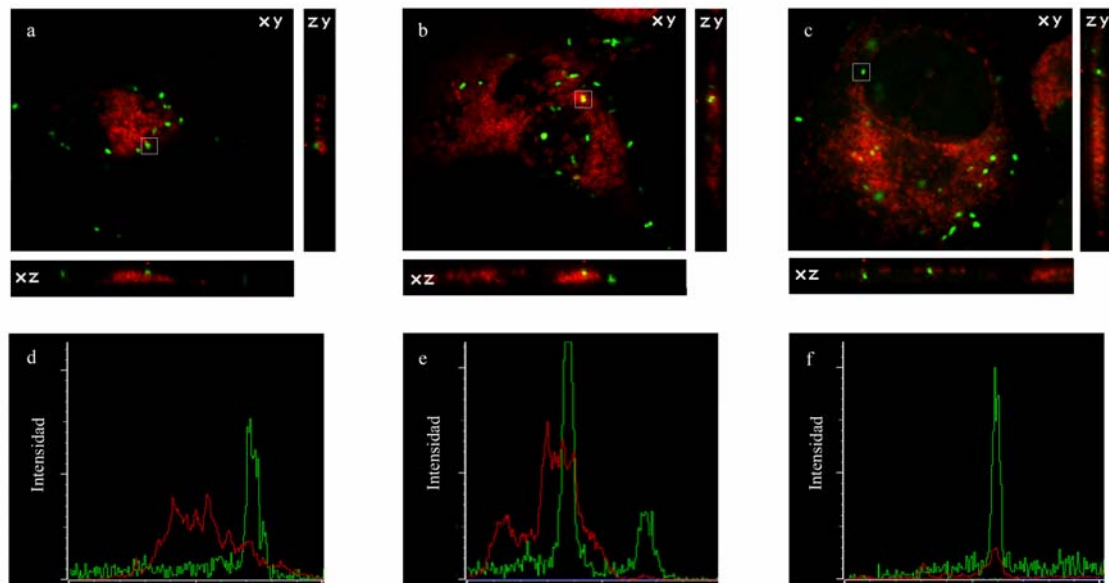
### 3.3.3. *B. pertussis* es capaz de sobrevivir en células epiteliales A549.

La invasión de células del hospedador es una estrategia de inmunoevasión común a muchos patógenos persistentes. En este estudio se evaluó la posibilidad de que las células epiteliales constituyan un nicho de persistencia para *B. pertussis*. Para ello se estudió la capacidad de sobrevivir de *B. pertussis* en células A549. Luego de 24 horas de infección, las células fueron incubadas con 100 µg/ml de polimixina B durante 1 h a 37 °C y el número de bacterias viables por célula fue determinado inmediatamente después del agregado del antibiótico (tiempo 0 hs) y 24 hs post-tratamiento con antibiótico. Los resultados indican que aproximadamente el 20 % de las bacterias que son internalizadas permanecen viables luego de un período de 24 hs (Fig. 6).



**Figura 6. Sobrevida de *B. pertussis* en células A549.** *B. pertussis* fue incubada con células A549 en una R<sub>i</sub>b/c de 100. Luego de 2 hs a 37 °C las células se lavaron para remover las bacterias no adheridas y se permitió que la internalización transcurra durante 24 hs. Posteriormente las bacterias aún adheridas a la superficie celular se inactivaron por incubación (1 h, 37 °C) con Polimixina B (100 µg/ml). La internalización se determinó por recuento de bacterias viables por célula eucariota después de la incubación con Polimixina B (0 hs) y se fijó arbitrariamente como 100 %. La sobrevivencia bacteriana en localización intracelular se determinó por recuento de bacterias viables por célula a las 24 hs post-tratamiento con Polimixina B y se expresó como porcentaje del valor de invasión inicial (0 hs). El número de bacterias internalizadas viables por célula está expresado entre paréntesis.

En forma paralela se evaluó la localización intracelular de *B. pertussis* por medio de estudios de colocalización con el marcador de endosomas tardíos y de compartimientos lisosomales, LAMP-1. La realización de cortes en Z de al menos 50 células elegidas al azar permitió discriminar entre bacterias intracelulares, extracelulares, y el grado de colocalización con LAMP-1 (Fig. 7). Los resultados indican que luego de 24 hs post-tratamiento con polimixina B la mayor parte de las bacterias internalizadas se encuentran en compartimientos LAMP positivos mientras que el  $8 \pm 4$  % no presenta signos de colocalización con este marcador ( $0,36 \pm 0,07$  b/c). La correlación existente entre el número de bacterias LAMP-negativas y el número de bacterias viables por célula post-tratamiento con polimixina B ( $0,34 \pm 0,08$ , Fig. 6) sugiere que sólo aquellas bacterias que evaden su fusión con compartimientos lisosomales sobreviven en localización intracelular.



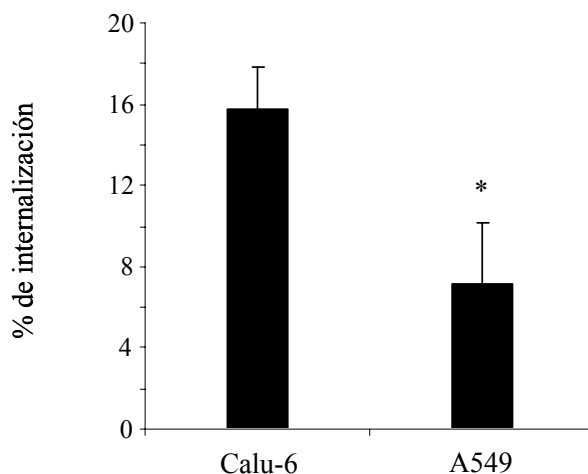
**Figura 7. Colocalización de *B. pertussis* con LAMP-1.** Células A549 infectadas con *B. pertussis* (R<sub>i</sub>b/c 100) fueron incubadas durante 2 hs a 37 °C en medio DMEM+BSA, lavadas e incubadas a 37 °C durante 24 hs para permitir la internalización. Posteriormente se agregó Polimixina B para inactivar bacterias extracelulares y se continuó la incubación durante 24 hs más. Las muestras fueron luego fijadas, permeabilizadas y procesadas para su visualización en microscopio confocal. La tinción de los compartimentos lisosomales se realizó utilizando como primer anticuerpo anti-LAMP-1 humana y como segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con CY3 (rojo). *B. pertussis* fue detectada por incubación con anticuerpo policlonal de conejo anti-*B. pertussis* seguido por fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con FITC (verde). Se muestran secciones ópticas (0,3 μm de ancho) representativas tres experimentos independientes. En cada uno de los paneles se muestran cortes en los planos xz y zy realizados a nivel de una determinada bacteria (remarcada por recuadro). Las imágenes tomadas en estos planos permiten discriminar entre bacterias intracelulares y extracelulares. En el panel **a** se señala una bacteria en localización extracelular. En el panel **b** se observa una bacteria colocalizando con LAMP reflejado por la presencia de áreas amarillas. En el panel **c** se señala una bacteria intracelular que no presenta signos de colocalización con LAMP. El grado de colocalización con LAMP fue verificado mediante la realización de escaneos de intensidades de fluorescencia roja y verde a lo largo del eje x en los sitios en donde se encuentra una determinada bacteria. Los paneles **d**, **e** y **f** muestran las intensidades de fluorescencia correspondientes a los paneles **a**, **b** y **c**, respectivamente. Únicamente en el panel **e** se observa un alto grado de colocalización de LAMP (curva roja) con *B. pertussis* (curva verde).

#### 3.3.4. Calu-6 es una línea celular más permisiva para *B. pertussis*.

Para evaluar si los resultados anteriores pueden ser extendidos a otros tipos celulares igualmente relevantes en el proceso infeccioso de pertussis, se estudió la capacidad de *B. pertussis* de ingresar y sobrevivir en la línea celular humana Calu-6 derivada del epitelio bronquial. El nivel de internalización de *B. pertussis* en células Calu-6 y A549 fue evaluado en forma paralela mediante tinción fluorescente diferencial y recuento de número de bacterias extra e intracelulares. En la Figura 8 puede observarse que el porcentaje de bacterias internalizadas en células Calu-6 es



significativamente mayor que en células A549 indicando que el tipo de célula huésped puede modificar la eficiencia de internalización.



**Figura 8. Comparación del nivel de internalización de *B. pertussis* en células A549 y Calu-6.** Células infectadas con *B. pertussis* (R<sub>i</sub>b/c 100) durante 2 hs a 37 °C fueron lavadas e incubadas durante 24 hs para permitir la internalización. Luego las células fueron fijadas y las bacterias extracelulares fueron detectadas por incubación con anticuerpo policlonal de conejo anti-*B. pertussis* seguido por fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con CY3. Posteriormente las células se incubaron con saponina 0,1 % p/v y las bacterias intra y extracelulares fueron teñidas mediante incubación con anticuerpo policlonal de conejo anti-*B. pertussis* seguido por fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con FITC. El número de bacterias extracelulares (rojas y verdes) e intracelulares (verde) por célula fue determinado mediante observación en microscopio confocal. El porcentaje de internalización fue calculado como el número de bacterias intracelulares respecto al número de bacterias totales por célula. Se muestran los resultados correspondientes a dos experimentos realizados en forma independiente. El nivel de internalización en células Calu-6 difiere significativamente respecto al nivel de internalización en células A549 (\*P<0,05).

Se evaluó también la capacidad de sobrevivencia de *B. pertussis* en este tipo celular. Células Calu-6 infectadas con *B. pertussis* durante 24 hs fueron lavadas e incubadas con Polimixina B. Luego de 24 hs se determinó el número de bacterias intracelulares viables mediante recuento de UFC y el porcentaje de colocalización con LAMP-1. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos, para facilitar la comparación con células A549 se han adicionado a la Tabla los datos obtenidos anteriormente para este tipo celular. Cabe señalar que otra vez la tasa de sobrevivencia coincide con el porcentaje de bacterias que no colocaliza con Lamp-1. Los resultados indican que *B. pertussis* posee una mayor capacidad de sobrevivencia en células Calu-6 sugiriendo que aunque *B. pertussis* puede sobrevivir en más de un tipo celular, el nivel de sobrevivencia es aparentemente dependiente del tipo celular de que se trate.

**Tabla 2.** Sobrevida de *B. pertussis* en células Calu-6 y A549

| Células | Bacterias intracelulares/célula <sup>a</sup> | % Colocalización <sup>b</sup> | Bacterias viables/célula <sup>c</sup> |
|---------|--|-------------------------------|---------------------------------------|
| Calu-6  | 5,6 ± 0,9                                    | 76 ± 4                        | 1,26 ± 0,20                           |
| A549    | 4,63 ± 1,2                                   | 92 ± 2                        | 0,34 ± 0,08                           |

<sup>a</sup> Número de bacterias por célula en localización intracelular luego de 24 hs post-tratamiento con Polimixina B obtenido mediante observación en microscopio confocal.

<sup>b</sup> Porcentaje de bacterias intracelulares que residen en compartimientos LAMP-positivos.

<sup>c</sup> Número de bacterias viables por célula obtenido mediante recuento de UFC luego de 24 hs post-tratamiento con Polimixina B.

### 3.4. Discusión

La división entre patógenos intracelulares y extracelulares, según su capacidad o incapacidad para invadir células del hospedador ha perdido vigencia en los últimos años debido a que numerosos patógenos históricamente considerados extracelulares hoy se sabe que presentan diversos tipos de vida intracelular. Tal es el caso de *Streptococcus* grupo A [22, 23], *Burkholderia cepacia* [24], *Helicobacter pylori* [25], *Haemophilus influenzae* [26] y *E. coli* uropatógena [27], entre otros. La existencia de reservorios intracelulares contribuye al establecimiento de infecciones crónicas y/o recurrentes dificultando la erradicación del agente infeccioso. Si bien *B. pertussis* pertenece al grupo de patógenos considerados “extracelulares” una serie de estudios sugieren que esta bacteria es capaz de invadir células eucariotas [2-4, 28], constituyendo tal vez un mecanismo de persistencia. La confirmación de la existencia de un estadio intracelular en la patogénesis de *B. pertussis* tendría implicancias directas en el desarrollo de estrategias inmunopreventivas y en el tratamiento de la enfermedad, sin embargo, los estudios en el tema son escasos y se desconocen los mecanismos que determinan que *B. pertussis* ingrese a la célula como así también si este patógeno es capaz de sobrevivir en localización intracelular.

Los resultados presentados en este Capítulo sugieren que los rafts lipídicos están involucrados en la entrada de *B. pertussis* a la célula epitelial. La extracción del colesterol de membrana con M $\beta$ CD determinó una significativa disminución en el porcentaje de bacterias intracelulares viables independientemente del nivel de adhesión inicial, indicando que estos dominios no sólo funcionan como importantes sitios de adhesión de *B. pertussis* sino que intervienen en la activación de los mecanismos que conllevan a la internalización de este patógeno. Se ha postulado que a través de la interacción con dominios rafts se favorece el reclutamiento de moléculas involucradas en la iniciación de cascadas de señalización, aunque el rol y el repertorio de moléculas de señalización reclutadas en estos dominios ha sido caracterizado sólo en un número limitado de patógenos [11, 29]. La fosforilación a nivel de tirosinas parece ser un evento crucial en la endocitosis mediada por rafts [21]; el tratamiento con genisteína, un inhibidor de proteínas tirosin-quinasa que inhibe selectivamente la endocitosis dependiente de rafts lipídicos, disminuyó significativamente la internalización de *B. pertussis* confirmando la participación de estos dominios en el ingreso de esta bacteria.

Dado que muchos receptores autofosforilados así como proteínas tirosin-quinasas y sus sustratos fosforilados en tirosina se asocian y activan fosfatidilinositol-3-quinasas (PI3K), se investigó si estas enzimas participan en el proceso de entrada de *B. pertussis*. Las PI3K catalizan la fosforilación de inositol fosfolípidos formando productos lipídicos que están involucrados en funciones celulares como crecimiento celular, rearrreglos de actina y tráfico vesicular. La inhibición de esta vía con wortmanina, un inhibidor de estas enzimas, no afectó el nivel de internalización de *B. pertussis* sugiriendo que la entrada de este patógeno es independiente de la activación de PI3K. *B. pertussis* presenta una alta afinidad por heparan sulfatos, proteoglicanos involucrados en el ingreso de bacterias como *Neisseria gonorrhoeae* mediante mecanismos dependientes de la activación de fosfolipasas C [30]. En este estudio se empleó U73122, un inhibidor específico de esta enzima, para evaluar su participación en la entrada de *B. pertussis*. No se observó que este inhibidor tuviera efecto alguno en el grado de internalización de *B. pertussis* lo que sugiere que eventos de fosforilación a nivel de serina o treonina tampoco mediaron el ingreso de *B. pertussis*. La inhibición de Serina/treonina quinazas mediante el potente inhibidor staurosporina, así como la inhibición específica de la proteína quinasa C no modificó la entrada de *B. pertussis* a la célula epitelial.

Se ha descrito que en la endocitosis a través de dominios rafts pueden intervenir tanto intermediarios tubulares como filamentos de actina [21]. Los resultados de este Capítulo sugieren que si bien existe un reclutamiento de actina en los sitios de adhesión de *B. pertussis* a la superficie epitelial, la internalización es independiente de la movilización de estos filamentos. Por el contrario, el tratamiento de las células con nocodazol determina una disminución en la entrada de *B. pertussis* indicando que los microtúbulos son los principales componentes del citoesqueleto implicados en este proceso. Sólo unos pocos patógenos bacterianos, entre los que se incluyen *Chlamydia trachomatis* [31], *Campylobacter jejuni* [32] y *E. coli* Afa/Dr positiva (DAEC) [33], ingresan a la célula a través de un mecanismo dependiente de microtúbulos e independiente de microfilamentos. Tal como se observó en *B. pertussis*, los rafts lipídicos parecen estar involucrados en la internalización de estos patógenos [11, 34, 35]. Trabajos previos sugieren que FHA promueve la invasión de *B. pertussis* a células epiteliales a través de su interacción con la integrina  $\alpha_5\beta_1$  [3]. Esta integrina participa en la internalización de numerosos patógenos entre los que se incluyen bacterias como *Yersinia* [36] y *E. coli* Afa/Dr positiva (DAEC) [33] que ingresan a la célula huésped a

través de un mecanismo tipo zipper. La presencia de extensiones que emanan de la superficie epitelial y que rodean las bacterias adheridas (Fig. 2) sugieren que *B. pertussis* podría ser internalizada por un mecanismo similar. Estudios realizados en DAEC indican que el reclutamiento de la integrina  $\alpha_5\beta_1$  en dominios rafts es un evento crítico para la iniciación de cascadas de señalización que determinan la internalización de este microorganismo [11]. Si bien no se ha investigado si el ingreso de *B. pertussis* a la célula epitelial requiere la asociación de la integrina  $\alpha_5\beta_1$  con dominios rafts, el hecho de que tanto *B. pertussis* como *E. coli* Afa/Dr positiva sean internalizados en un proceso dependiente de microtúbulos e independiente de la activación de PKC y PLC [11] sugiere que ambos microorganismos podrían utilizar mecanismos de entrada similares.

El ingreso a las células epiteliales es una estrategia comúnmente utilizada por los patógenos para evadir el sistema inmune y persistir en el hospedador [37-39]. Los estudios realizados para evaluar la sobrevivencia de *B. pertussis* en células epiteliales A549 sugieren que una subpoblación de las bacterias internalizadas evade la fusión con lisosomas permaneciendo viable en compartimientos LAMP negativos durante al menos 24 hs. La capacidad de sobrevivencia parece depender, en parte, del tipo celular involucrado, estudios realizados en células epiteliales bronquiales Calu-6 sugieren que *B. pertussis* es capaz de ingresar y sobrevivir de forma más eficiente en este tipo celular. Recientemente se ha encontrado que la invasión de *Brucella* también se encuentra aumentada en células Calu-6 respecto a células A549 [40]. Los mecanismos que determinan estas diferencias no han sido dilucidados, sin embargo se ha sugerido que pueden deberse a una alteración en el patrón o el nivel de expresión de moléculas relevantes en la interacción de la bacteria con la célula epitelial. Si bien la extrapolación entre líneas celulares y sus contrapartes primarias no es lineal y debe ser realizada con prudencia, estos resultados podrían sugerir que las células de origen bronquial podrían constituir sitios temporales de residencia más favorables para *B. pertussis*. El hallazgo de bacterias intracelulares en células epiteliales bronquiales en muestras de pulmón obtenidas de infantes que padecieron pertussis parece apoyar esta hipótesis [41].

A modo de resumen, los resultados presentados en este Capítulo aportan nuevas evidencias que apoyan la hipótesis de que *B. pertussis* es capaz de invadir células epiteliales respiratorias. La internalización involucra dominios rafts y la activación de tirosin-quinazas que probablemente inician cascadas de señalización que conllevan a la internalización de este patógeno a través de la movilización de microtúbulos. Una vez

internalizada, un pequeño porcentaje de bacterias es capaz de sobrevivir intracelularmente evadiendo el tráfico a lisosomas. La existencia de un estadio intracelular durante el periodo infeccioso de *B. pertussis* podría favorecer la evasión de la respuesta inmune y la posterior infección de otras células, contribuyendo a la persistencia de *B. pertussis* en el tracto respiratorio.

### 3.5. Conclusiones

Los resultados descritos en este Capítulo indican que *B. pertussis*, históricamente considerada un patógeno extracelular, es capaz de ingresar a células epiteliales de origen respiratorio a través de un mecanismo dependiente de dominios rafts lipídicos.

La internalización ocurre a través de un mecanismo tipo zipper que involucra el contacto estrecho con microvelocidades que emergen de la superficie celular. Los microtúbulos son los principales componentes del citoesqueleto involucrados en este proceso.

La entrada de *B. pertussis* puede ser específicamente inhibida por genisteína, indicando que eventos de fosforilación a nivel de tirosina juegan un rol importante en la transducción de señales que determinan la internalización.

La mayor parte de las bacterias intracelulares se encuentran en compartimientos LAMP-1 positivos, sin embargo, un porcentaje de bacterias evade la fusión con lisosomas y permanece viable en localización intracelular.

Las células epiteliales Calu-6 de origen bronquial internalizan a *B. pertussis* en mayor medida que las células A549 de origen alveolar sugiriendo que el ingreso es dependiente del tipo celular involucrado.

La sobrevivencia intracelular se encuentra aumentada en células Calu-6 sugiriendo que las células bronquiales constituyen sitios de residencia intracelular más favorables.





## Referencias

1. de Melker HE, Schellekens JF, Neppelenbroek SE, Mooi FR, Rumke HC, Conyn-van Spaendonck MA. **Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of the Netherlands: observations on surveillance data.** *Emerg Infect Dis.* 2000,6:348-357.
2. 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.* 2000,68:1934-1941.
3. 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.* 2001,30:279-288.
4. Gueirard P, Bassinet L, Bonne I, Prevost M-C, Guiso N. **Ultrastructural analysis of the interactions between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* and human tracheal epithelial cells.** *Microbial Pathogenesis* 2005,38:41-46.
5. Osugi Y, Vuckovic S, Hart DNJ. **Myeloid blood CD11c+ dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes.** *Blood* 2002,100:2858-2866.
6. Finlay BB, Cossart P. **Exploitation of Mammalian Host Cell Functions by Bacterial Pathogens.** *Science* 1997,276:718-725.
7. Meyer TF. **Pathogenic *Neisseria*--interplay between pro- and eukaryotic worlds.** *Folia Microbiol (Praha).* 1998,43:311-319.
8. Kwok T, Backert S, Schwarz H, Berger J, Meyer TF. **Specific Entry of *Helicobacter pylori* into Cultured Gastric Epithelial Cells via a Zipper-Like Mechanism.** *Infect. Immun.* 2002,70:2108-2120.
9. Rosenshine I, Finlay BB. **Exploitation of host signal transduction pathways and cytoskeletal functions by invasive bacteria.** *Bioessays.* 1993,15:17-24.
10. Andrade JRC, Daveiga VF, De santa rosa MR, Suassuna I. **An endocytic process in HEp-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*.** *J Med Microbiol* 1989,28:49-57.
11. Kansau I, Berger C, Hospital M, Amsellem R, Nicolas V, Servin AL, Bernet-Camard MF. **Zipper-Like Internalization of Dr-Positive *Escherichia coli* by Epithelial Cells Is Preceded by an Adhesin-Induced Mobilization of Raft-Associated Molecules in the Initial Step of Adhesion.** *Infect Immun.* 2004,72:3733-3742.
12. Francis CL, Ryan TA, Jones BD, Smith SJ, Falkow S. **Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria.** *Nature.* 1993,364:639-642.
13. Ohya K, Handa Y, Ogawa M, Suzuki M, Sasakawa C. **IpgB1 Is a Novel *Shigella* Effector Protein Involved in Bacterial Invasion of Host Cells.** *Journal of Biological Chemistry* 2005,280:24022-24034.
14. Rosenshine I, Duronio V, Finlay BB. **Tyrosine protein kinase inhibitors block invasin-promoted bacterial uptake by epithelial cells.** *Infect. Immun.* 1992,60:2211-2217.
15. Finlay B, Falkow S. **Common themes in microbial pathogenicity revisited.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997,61:136-169.

16. Bernardini ML, Mounier J, d'Hauteville H, Coquis-Rondon M, Sansonetti PJ. **Identification of icsA, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989,86:3867-3871.
17. Ireton K, Payrastre B, Chap H, Ogawa W, Sakaue H, Kasuga M, Cossart P. **A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion.** *Science.* 1996,274:780-782.
18. Lafont F, van der Goot FG. **Bacterial invasion via lipid rafts.** *Cell Microbiol.* 2005,7:613-620.
19. Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. **A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells.** *Int J Cancer.* 1976,17:62-70.
20. 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.* 1990,58:2516-2522.
21. Lajoie P, Nabi IR. **Regulation of raft-dependent endocytosis.** *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2007,11:644-653.
22. LaPenta D, Rubens C, Chi E, Cleary PP. **Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994,91:12115-12119.
23. Osterlund A, Engstrand L. **Intracellular penetration and survival of *Streptococcus pyogenes* in respiratory epithelial cells in vitro.** *Acta Otolaryngol.* 1995,115:685-688.
24. Burns J, Jonas M, Chi E, Clark D, Berger A, Griffith A. **Invasion of respiratory epithelial cells by *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*.** *Infect. Immun.* 1996,64:4054-4059.
25. Petersen AM, Krogfelt KA. ***Helicobacter pylori*: an invading microorganism? A review.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2003,36:117-126.
26. St Geme JW, 3rd. **Molecular and cellular determinants of non-typeable *Haemophilus influenzae* adherence and invasion.** *Cell Microbiol.* 2002,4:191-200.
27. Mulvey MA, Lopez-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, Heuser J, Hultgren SJ. **Induction and Evasion of Host Defenses by Type 1-Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*.** *Science* 1998,282:1494-1497.
28. Ewanowich CA, Melton AR, Weiss AA, Sherburne RK, Peppler MS. **Invasion of HeLa 229 cells by virulent *Bordetella pertussis*.** *Infect Immun.* 1989,57:2698-2704.
29. Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, Pinkner JS, Hultgren SJ. **Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells.** 2000,19:2803-2812.
30. Grassme H, Gulbins E, Brenner B, Ferlinz K, Sandhoff K, Harzer K, Lang F, Meyer TF. **Acidic sphingomyelinase mediates entry of *N. gonorrhoeae* into nonphagocytic cells.** *Cell.* 1997,91:605-615.
31. Clausen JD, Christiansen G, Holst HU, Birkelund S. ***Chlamydia trachomatis* utilizes the host cell microtubule network during early events of infection.** *Mol Microbiol.* 1997,25:441-449.
32. Oelschlaeger TA, Guerry P, Kopecko DJ. **Unusual microtubule-dependent endocytosis mechanisms triggered by *Campylobacter jejuni* and *Citrobacter freundii*.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993,90:6884-6888.
33. Guignot J, Bernet-Camard M-F, Pous C, Plancon L, Le Bouguenec C, Servin AL. **Polarized Entry of Uropathogenic Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli* Strain IH11128 into Human Epithelial Cells: Evidence for  $\alpha 5 \beta 1$  Integrin**

- Recognition and Subsequent Internalization through a Pathway Involving Caveolae and Dynamic Unstable Microtubules.** *Infect Immun.* 2001,69:1856-1868.
34. Jutras I, Abrami L, Dautry-Varsat A. **Entry of the *Lymphogranuloma Venereum* Strain of *Chlamydia trachomatis* Into Host Cells Involves Cholesterol-Rich Membrane Domains.** *Infect Immun.* 2003,71:260-266.
35. Watson RO, Galan JE. ***Campylobacter jejuni* survives within epithelial cells by avoiding delivery to lysosomes.** *PLoS Pathog.* 2008,4:e14.
36. Isberg R, Barnes P. **Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*.** *J Cell Sci* 2001,114:21-28.
37. Pelkmans L, Helenius A. **Endocytosis via caveolae.** *Traffic.* 2002,3:311-320.
38. Watarai M. **Interaction between *Brucella abortus* and cellular prion protein in lipid raft microdomains.** *Microbes and Infection* 2004,6:93-100.
39. Shin JS, Abraham SN. **Co-option of endocytic functions of cellular caveolae by pathogens.** *Immunology.* 2001,102:2-7.
40. Ferrero MC, Fossati CA, Baldi PC. **Smooth *Brucella* strains invade and replicate in human lung epithelial cells without inducing cell death.** *Microbes and Infection* 2009,11:476-483.
41. 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.* 2008,47:328-338.



## CAPÍTULO 4

**La sobrevivencia de *B. pertussis* a la acción bactericida de neutrófilos humanos depende de su interacción con dominios rafts.**



## CAPÍTULO 4

4. La sobrevivencia de *B. pertussis* a la acción bactericida de neutrófilos humanos depende de su interacción con dominios rafts.

### 4.1. Introducción

Una vez que *B. pertussis* ha accedido al organismo huésped, la inmunidad innata o adquirida (según el estado inmune del hospedador) pone en juego un conjunto de componentes celulares y humorales a efectos de controlar el proceso infeccioso. Los neutrófilos constituyen una de las principales barreras contra las infecciones bacterianas. En el sitio de infección los neutrófilos reconocen al microorganismo invasor, se adhieren a él, lo fagocitan y lo inactivan. Al menos dos tipos de gránulos secretorios median la actividad bactericida de los neutrófilos, los gránulos azurófilos y los específicos [1]. Los primeros constituyen una clase especial de lisosomas que, junto con las típicas enzimas lisosomales, almacenan proteínas bactericidas y proteasas neutras. Los gránulos específicos también contienen proteínas implicadas en actividades bactericidas y son reservorios de receptores de la membrana plasmática y del citocromo b558, un componente del complejo NADPH oxidasa implicado en la generación de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) [1]. Tanto la eficiencia del proceso de fagocitosis como los eventos activados tras el ingreso del microorganismo dependen en parte del tipo de receptores involucrados en el reconocimiento del patógeno.

La fagocitosis de *B. pertussis* mediada por anticuerpos IgG e IgA ha sido estudiada en detalle por nuestro grupo y ha demostrado ser sumamente eficiente. Una vez fagocitada a través de los receptores Fc la bacteria es dirigida hacia compartimientos lisosomales donde la acción de sistemas citotóxicos median la destrucción de este patógeno [2]. Tanto los mecanismos dependientes de la producción de especies oxidantes derivadas del oxígeno (intermediarios reactivos de oxígeno, IRO) como los mecanismos oxígeno-independientes mediados a través de la acción de diversas enzimas hidrolíticas se activan bajo condiciones opsonizantes [2]. En ausencia

de anticuerpos la adhesión de *B. pertussis* con el neutrófilo es significativamente menos eficiente y en general *B. pertussis* sobrevive al encuentro con estas células fagocíticas eliminando una de las principales líneas de defensa [2]. Aparte, debido a la baja concentración de opsoninas del suero presentes en el tracto respiratorio [3] y al bajo título de anticuerpos que presentan adolescentes y adultos luego de 3-4 años post-vacunación, es posible asumir que el encuentro de *B. pertussis* con neutrófilos del huésped se produce principalmente en condiciones no opsonizantes.

La interacción de *B. pertussis* con las células fagocíticas en ausencia de opsoninas se produce fundamentalmente a través de la unión de FHA con el receptor de complemento 3 (CR3, CD11b/CD18)[4, 5]. CR3 es un miembro de la familia de las  $\beta_2$ -integrinas que contiene múltiples sitios de unión que le permiten interactuar con diferentes ligandos. Poco se conoce respecto a las consecuencias biológicas de la unión de *B. pertussis* a las células fagocíticas a través de CR3, sin embargo, se ha sugerido que el ingreso a través de este receptor podría resultar beneficioso para el patógeno [6, 7]. Estudios previos de nuestro grupo realizados en neutrófilos humanos indican que la fagocitosis de *B. pertussis* bajo condiciones no opsonizantes no activa la producción de IRO lo cual está de acuerdo con la reportada ausencia de activación de la NADPH oxidasa por la ligación independiente de CR3 [8, 9] y la ausencia de actividad celular bactericida bajo estas circunstancias [2]. Se ha encontrado que FHA, PT y Fim aumentan la expresión de CR3 [10] sugiriendo que *B. pertussis* propicia su propio ingreso a través de este receptor favoreciendo posiblemente su supervivencia.

Trabajos recientes indican que la fagocitosis de zimosano, un  $\beta$ -glucano que se une a la porción CD11b de CR3, está funcionalmente ligada a dominios rafts lipídicos. Esto ha llevado a especular que las moléculas CD11b/CD18 se encuentran localizadas en regiones próximas a dominios rafts lipídicos de neutrófilos no activados, y son movilizadas a compartimientos rafts durante la fagocitosis [11]. Conforme con esta hipótesis, se ha encontrado que el ingreso de ciertos microorganismos, como *Leishmania* [12] y *Mycobacterium* [13] a las células fagocíticas se realiza a través de la interacción de CR3 con dominios lipídicos. El ingreso a través de estos dominios determina que estos patógenos evadan la fusión con compartimientos lisosomales y sobrevivan a la acción bactericida de las células inmunes.

Los resultados del Capítulo 2 y 3 demuestran que *B. pertussis* interacciona con células del epitelio respiratorio a través de rafts lipídicos. Teniendo en cuenta que la



fagocitosis vía rafts favorece la sobrevivencia de un gran número de patógenos en células inmunes, en este Capítulo se investigó si la sobrevivencia de *B. pertussis* al encuentro con neutrófilos humanos está relacionada con su interacción con dominios rafts lipídicos.



## 4.2. Materiales y métodos

### 4.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Para la realización de este estudio se utilizó la cepa salvaje *B. pertussis* Tohama I transformada con el plásmido pCW505 (proporcionado por Dr. Weiss, Cincinnati, Ohio) que induce la expresión citoplasmática de la proteína fluorescente verde GFP (Green Fluorescent Protein) sin modificar el crecimiento o la expresión de antígenos [14]. La bacteria fue cultivada en placas de Agar Bordet Gengou (DIFCO Laboratories, USA) suplementada con 15 % v/v de sangre desfibrinada de carnero (ABGs) durante 72 hs a 37 °C, al cabo de lo cual se repicó en una nueva placa ABGs y se cultivó a 37 °C durante 24 hs.

En determinados experimentos se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5a transformada con el plásmido PML2 que induce la expresión citoplasmática de GFP (cedida gentilmente por el Dr. Antonio Lagares del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, La Plata, Argentina). La bacteria fue crecida en medio Luria Bertani (LB) a 37 °C durante toda la noche y posteriormente utilizada en ensayos de fagocitosis.

### 4.2.2. Anticuerpos y sueros

Los siguientes anticuerpos fueron utilizados: anticuerpo monoclonal (mAc) de ratón anti-hFcγRI (CD64) mAc 22 (mIgG1), anti-hFcγRII (CD32) mAc AT10 (mIgG1), anti-FcγRIII (CD16) mAc 3G8 (mIgG1) (todos provistos por Medarex, Annandale, NJ, USA), mAc anti-CD11b (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). mAc anti-proteína lisosomal asociada a membrana, LAMP-1 (Pharmingen, San Diego, CA, USA), y anticuerpo policlonal (pAc) producido en conejo anti-flotilina-1 humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

En este estudio se emplearon además fracciones de IgG obtenidas a partir de un pool de sueros de pacientes con elevado título contra *B. pertussis*, según se determinó por ELISA [15], obtenidas según se describe en Rodríguez *et al.* [2] y suero de conejo anti-*B. pertussis* obtenido según se describe en Hellwig *et al.* [6].

### 4.2.3. Expresión de receptores

El nivel de expresión de los receptores FcγR y CR3 fue determinado mediante inmunofluorescencia indirecta usando un panel de sueros monoclonales seguido por la adición de fracciones F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra que reconocen inmunoglobulina de ratón conjugados con fluoresceína (FITC) (Tago, Burlingame, CA, USA). El nivel de fluorescencia fue determinado utilizando citometría de flujo ((Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA). 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. En forma paralela se realizaron controles de isotipo.

### 4.2.4. Células

Neutrófilos de sangre periférica fueron aislados de sangre humana heparinizada utilizando gradientes de centrifugación Ficoll-Histopaque (Sigma, St. Louis, MO, USA). Los glóbulos rojos remanentes en la suspensión de polimorfonucleares (PMN) fueron removidos por lisis hipotónica logrando una pureza mayor al 95 %. La viabilidad celular se determinó por tinción vital con Trypan blue obteniéndose un nivel de viabilidad superior al 99 %. Previo a la realización de los ensayos funcionales, los neutrófilos fueron lavados dos veces con DMEM suplementado con 0.2 % p/v de BSA (Sigma), resuspendidos y utilizados inmediatamente. Todos los experimentos descritos en este Capítulo fueron llevados a cabo utilizando neutrófilos purificados en el momento. El nivel de expresión del receptor FcγRI (CD64) fue monitoreado mediante citometría de flujo utilizando el mAc anti FcγRI 22 [16]. Solo fueron utilizados aquellos neutrófilos que no presentaban niveles detectables de expresión de CD64.

### 4.2.5. Tratamiento de neutrófilos con drogas que afectan el colesterol de membrana

El colesterol de membrana de los PMN fue extraído mediante la incubación con 10 mg/ml de MβCD (Sigma) durante 15 min a 37 °C en medio DMEM suplementado con BSA (0,2 % p/v) y lovastatina (5 µg/ml) (Sigma) (DMEM-BSA-L). En algunos experimentos las células fueron incubadas con 35 mg/ml de nistatina (Sigma) o con 5 µg/ml de filipina (Sigma), drogas que unen colesterol sin extraerlo, durante 30 min a 37

°C en DMEM-BSA-L. Las células fueron luego lavadas y suspendidas en DMEM-BSA-L. La viabilidad celular fue monitoreada mediante tinción vital con Trypan blue no detectándose una disminución en la misma luego de los tratamientos. En experimentos control, el colesterol de membrana fue restituido por incubación de las células previamente tratadas con M $\beta$ CD, con 8 mg/ml de colesterol soluble en agua (Sigma) disuelto en DMEM-BSA 0,2 % p/v, durante 30 min a 37 °C; o mediante la incubación con SFB (20 % v/v) en DMEM durante 3 hs a 37 °C.

#### 4.2.6. Cuantificación de la adhesión

GFP-*B. pertussis* fueron incubadas con neutrófilos humanos durante 20 min a 37 °C en una relación inicial bacteria/célula ( $R_i/b/c$ ) de 50 o 500. Luego de tres lavados para remover bacterias no adheridas, las células se fijaron por incubación con paraformaldehído y se analizaron por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio DMLB acoplado a una cámara DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Switzerland). En determinados experimentos, GFP-*B. pertussis* fue opsonizada con IgG humana (200  $\mu$ g/ml) durante 30 min a 37 °C previo a la incubación con neutrófilos en una  $R_i/b/c$  de 50. En algunos ensayos se evaluó la asociación de GFP-*E. coli* DH5 $\alpha$  a neutrófilos humanos utilizando una  $R_i/b/c$  de 500.

Ocasionalmente los PMN se incubaron con tripsina al 0,5 % en DMEM-BSA (0,2%) durante 30 min a 37 °C previo a la incubación con bacterias.

#### 4.2.7. Cuantificación de la fagocitosis

La fagocitosis de *B. pertussis* fue evaluada según se ha sido descrito en Rodríguez *et al.* [17] con algunas modificaciones. Brevemente, bacterias incubadas con PMN durante 20 min a 37 °C fueron extensivamente lavadas a 4 °C para remover las bacterias no adheridas y divididas en dos alícuotas. Una alícuota fue mantenida en hielo para determinar el número inicial de bacterias adheridas al neutrófilo mientras que la otra alícuota fue incubada durante una hora más para permitir que la fagocitosis transcurra. La fagocitosis se detuvo sumergiendo en hielo las muestras. Posteriormente se determinó el número de bacterias asociadas a la superficie celular de los neutrófilos de ambas alícuotas mediante marcación fluorescente. Para ello, los PMN fueron incubados con suero policlonal anti-*B. pertussis* de conejo (30 min a 4 °C) seguido de

fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con PE (Molecular Probes, OR, USA) durante 30 min a 4 °C. Con el fin de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos todas las incubaciones fueron realizadas en presencia de 25 % v/v de suero humano inactivado por calor. Las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo. Las intensidades de fluorescencia en el rojo y en el verde de los neutrófilos mantenidos durante 20 min a 37 °C fue utilizada como control de adhesión. El decaimiento en la fluorescencia roja luego de una hora de incubación a 37 °C reflejó el nivel de fagocitosis de las bacterias asociadas a la superficie. El porcentaje de fagocitosis fue calculado de la siguiente manera:  $100 \times (1 - PE2/PE1)$ , donde PE1 representa la media de la fluorescencia roja de aquellas células FITC-positivas mantenidas a 37 °C durante 20 min y PE2 representa la media de la fluorescencia roja de aquellas células FITC-positivas mantenidas durante 1 h más a 37 °C.

En determinados experimentos, *B. pertussis* fue opsonizada con IgG humana (200 µg/ml) antes de ser incubada con los PMN en una R<sub>i</sub>b/c de 50. Los ensayos de fagocitosis fueron realizados como ha sido detallado anteriormente, con la diferencia que la marcación de las bacterias adheridas a la superficie fue realizada mediante la incubación con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con PE (Southern Biotechnology, Birmingham, UK).

#### 4.2.8. Exocitosis de la enzima lisosomal β-glucuronidasa

Neutrófilos en suspensión ( $5 \times 10^6$  células/ml) fueron incubados con *B. pertussis* opsonizada con IgG o no opsonizada, durante 1 h a 37 °C, y luego centrifugados a 800 x g. Posteriormente los sobrenadantes fueron centrifugados a 10000 x g durante 10 min para eliminar bacterias y posteriormente se determinó la actividad enzimática de la β-glucuronidasa tanto en el pellet celular de PMN lisados con 0.2 % v/v de Triton X-100 como en el sobrenadante según ha sido descrito en Gregoire *et al.* [18].

#### 4.2.9. Determinación de la sobrevida intracelular

Neutrófilos humanos incubados con *B. pertussis* opsonizada con IgG o no opsonizada durante 20 min a 37 °C fueron lavados a 4 °C para eliminar aquellas bacterias no adheridas e incubados durante 1 h más para permitir que la fagocitosis ocurra. Posteriormente fueron incubados con DMEM suplementado con 10 % v/v de

SFB y 400 µg/ml de Polimixina B sulfato (Sigma), para inactivar aquellas bacterias que aún permanecieran adheridas a la superficie celular. En los tiempos utilizados en este ensayo, este antibiótico no penetra la membrana de las células eucariotas [19] y por lo tanto solo mata las bacterias extracelulares adheridas pero no aquellas internalizadas. Luego de la incubación, la Polimixina B fue removida por lavado con PBS y se agregó DMEM + SFB 10 % v/v. Para la determinación de la invasión y/o sobrevida intracelular de *B. pertussis* una porción de la suspensión celular fue utilizada para determinar el número de bacterias viables por recuento en placas ABGs mientras que otra porción fue utilizada para realizar el recuento de PMN viables por exclusión con Trypan blue en Cámara de Neubauer. Los resultados se expresaron como: número de bacterias/ número de células en el mismo volumen. El porcentaje de sobrevida fue calculado teniendo en cuenta el número de bacterias adheridas y el índice de fagocitosis según se detalla a continuación:

- N: número de bacterias viables por célula luego de la incubación con Polimixina B.
- A: número de bacterias asociadas a los neutrófilos luego de 20 min de incubación a 37 °C (determinado mediante microscopía de fluorescencia).
- B: índice de fagocitosis (determinado en paralelo mediante citometría de flujo según ha sido detallado anteriormente),  $1-PE2/PE1$ .
- % de sobrevida bacteriana:  $N \times 100/A \times B$ .

Los controles realizados en este ensayo fueron: (a) control de viabilidad celular: neutrófilos a los cuales no se les agregó bacterias pero que fueron sometidos a todos los tratamientos del ensayo fueron monitoreados por observación y recuento de células viables durante todo el experimento, (b) control de muerte bacteriana por Polimixina B:  $5 \times 10^8$  bacterias suspendidas en 1 ml de medio DMEM suplementado con SFB fueron incubadas con Polimixina B (400 µg/ml) durante 1 h a 37 °C. Finalizado este tiempo, las bacterias se lavaron con PBS y se sembraron en ABGs para recuento de UFC. El tratamiento con Polimixina B resultó en una disminución de 99.999 % de las UFC obtenidas, indicando que éste antibiótico mata eficientemente a las bacterias en las condiciones de trabajo utilizadas.

#### 4.2.10. Microscopía confocal

Los estudios de colocalización fueron realizados según ha sido descrito en Rodríguez *et al.* [2]. Brevemente, alícuotas de neutrófilos incubados con GFP-*B. pertussis* durante 20 min a 37 °C fueron lavados a 4 °C para eliminar las bacterias no adheridas y posteriormente fueron incubados durante 20 min o 1 hora a 37 °C para estudios de colocalización bacteriana con LAMP-1 o flotilina, respectivamente. Luego de ser fijados con paraformaldehído al 3 % p/v, los neutrófilos fueron lavados dos veces con PBS e incubados durante 10 min a temperatura ambiente con PBS conteniendo 50 mM de NH<sub>4</sub>Cl. Luego de una serie de lavados, los PMN fueron incubados durante 30 min con PBS conteniendo 0.1 % p/v de saponina (Sigma) y 0.5 % p/v de BSA y posteriormente incubados durante 1 hora a 4 °C con anticuerpos monoclonales de ratón anti-LAMP-1 humana o con anticuerpos policlonales de conejo anti flotilina-1 en presencia de 0.1 % p/v de saponina y 0.5 % p/v de BSA. Luego de una serie de lavados fueron incubados con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra que reconocen IgG de ratón conjugados con CY3 o con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra que reconocen IgG de conejo conjugados con CY3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) durante 30 min a 4 °C. Con el fin de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos todas las incubaciones fueron realizadas en presencia de 25 % v/v de suero humano inactivado por calor y se realizaron controles de isotipo en paralelo. Finalmente las células fueron analizadas utilizando un microscopio confocal Olympus FV 300. El porcentaje de fagosomas conteniendo bacterias que colocalizan con LAMP-1 o flotilina fue calculado mediante el análisis de al menos 50 fagosomas por donante.

#### 4.2.11. Estudios de adquisición de transferrina humana

Neutrófilos humanos incubados durante 20 min a 37 °C con *B. pertussis* opsonizada con IgG o no opsonizada, fueron lavados e incubados nuevamente durante 20 min o 1 h a 37 °C para permitir que la fagocitosis transcurra. Posteriormente los PMN fueron depleccionados de transferrina mediante la incubación en medio DMEM conteniendo 1 % p/v de BSA durante 1 h a 37 °C. Transcurrido ese tiempo fueron incubados con 10 µg/ml de transferrina marcada con Alexa-594 (Moléculas Probes) durante 10 min a 4 °C en medio DMEM con BSA 1 % p/v para permitir la adhesión de la transferrina. Luego fueron incubados a 37 °C durante 5 min para que el ligando sea



internalizado y posteriormente lavados con DMEM-BSA 1 % p/v. Finalmente fueron incubados durante 45 min a 37 °C y fijados para ser observados por microscopía confocal. La colocalización de *B. pertussis* marcada GFP, con la transferrina (roja) fue analizada observando al menos 50 fagosomas conteniendo bacterias por cada experimento.

#### 4.2.12. Análisis estadístico

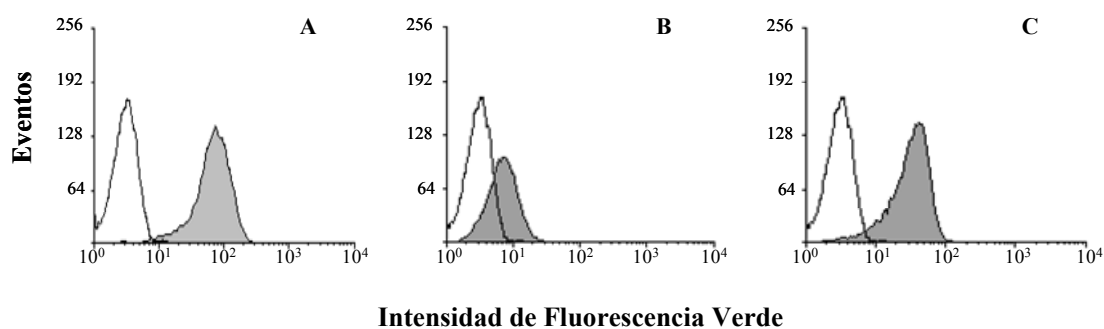
Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación de los valores obtenidos (medias) se utilizó el test de Menor Diferencia Significativa (LSD) con un grado de significación (P) de 0.05.



### 4.3. Resultados

#### 4.3.1. En ausencia de anticuerpos opsonizantes los dominios ricos en colesterol presentes en la membrana del neutrófilo intervienen en la captura y fagocitosis de *B. pertussis*

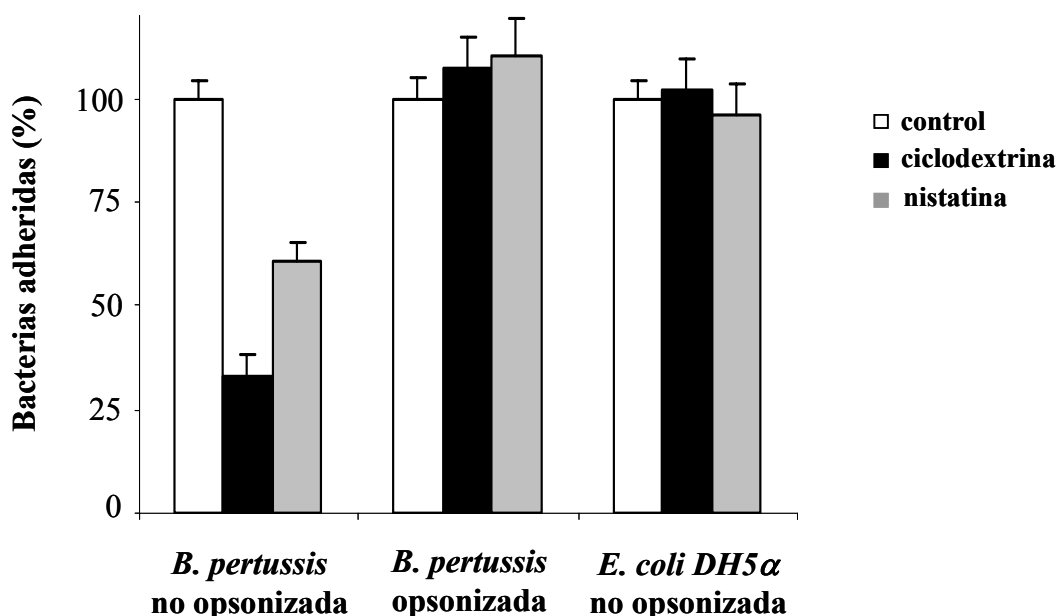
La presencia de anticuerpos opsonizantes determina que *B. pertussis* se adhiera y sea fagocitada eficientemente por los neutrófilos a través de la interacción con los receptores Fc [2]. En ausencia de anticuerpos la asociación de *B. pertussis* con el neutrófilo es mucho menos eficiente observándose una significativa disminución en el número de bacterias adheridas (Fig. 1). Con el fin de normalizar los niveles de adhesión y poder estudiar comparativamente ambas condiciones, los experimentos descritos en este Capítulo se llevaron a cabo utilizando una relación bacteria:célula de 50:1 en el caso de bacterias opsonizadas y de 500:1 en ausencia de anticuerpos, que según puede observarse en la Fig. 1 permite obtener niveles de adhesión similares (Fig. 1, paneles A y C).



**Figura 1. En ausencia de anticuerpos la interacción de *B. pertussis* con el neutrófilo es significativamente menor.** Neutrófilos humanos fueron incubados durante 20 min a 37 °C con *B. pertussis*-IgG opsonizada (panel A) o *B. pertussis* no opsonizada (paneles B y C) en una relación inicial de bacterias por célula de 500 (panel C) o 50 (paneles A y B). Luego de una serie de lavados para eliminar las bacterias no adheridas, los neutrófilos fueron analizados mediante citometría de flujo. Neutrófilos no infectados fueron analizados en paralelo (curvas blancas). Se muestran histogramas representativos de tres experimentos independientes.

Para evaluar el rol de los rafts lipídicos en la interacción de *B. pertussis* con los neutrófilos humanos, los PMN fueron tratados con M $\beta$ CD previo al agregado de GFP-*B. pertussis* [20]. La síntesis *de novo* de colesterol fue inhibida mediante lovastatina. La

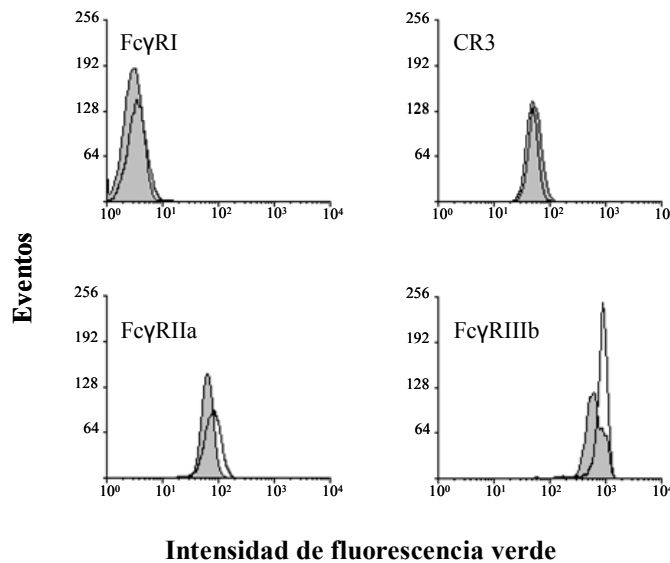
Figura 2 muestra que la remoción del colesterol de membrana provoca una reducción significativa del número de bacterias no opsonizadas asociadas al neutrófilo. Resultados similares fueron obtenidos luego de la incubación de los PMN con nistatina, una droga que desorganiza los rafts lipídicos a través de su unión a colesterol (Fig. 2). Estos resultados sugieren que los dominios rafts también están involucrados en la asociación de *B. pertussis* no opsonizada con las células fagocíticas. Por otro lado, el nivel de asociación de *B. pertussis* opsonizada con IgG no se vio alterado por el tratamiento de los neutrófilos con ninguna de estas drogas sugiriendo que el colesterol no es crítico en la interacción de *B. pertussis* con los neutrófilos a través de los FcγR. En estudios previos se demostró que la adhesión de *Escherichia coli* DH5α a células inmunes no depende de la presencia de dominios ricos en colesterol [12, 21], debido a ello esta bacteria fue incluida en los ensayos como control negativo. La Figura 2 demuestra que, de acuerdo con lo esperado, ni la MβCD ni la nistatina afectaron la interacción de esta bacteria con los neutrófilos indicando que los resultados observados con *B. pertussis* son específicos de esta bacteria y que la integridad general de la membrana del neutrófilo no se encuentra afectada por los tratamientos.



**Figura 2.** La remoción del colesterol de membrana afecta específicamente la interacción de *B. pertussis* no opsonizada con neutrófilos humanos. Los neutrófilos fueron tratados con MβCD (10 mg/ml), nistatina (35 mg/ml) o medio de cultivo (control) e incubados con GFP-*B. pertussis* no opsonizada (R<sub>i</sub>b/c 500), GFP-*B. pertussis* opsonizada (R<sub>i</sub>b/c 50), o GFP-*E. coli* DH5α no opsonizada (R<sub>i</sub>b/c 500) durante 20 min a 37 °C. Las células fueron posteriormente lavadas y fijadas. El número de bacterias asociadas al PMN fue evaluado por microscopía de fluorescencia (1000x). El nivel de adhesión de bacterias incubadas con neutrófilos no tratados (control) se fijó como 100 %. Los valores representan la media de tres experimentos independientes utilizando neutrófilos de diferentes donantes. El número de

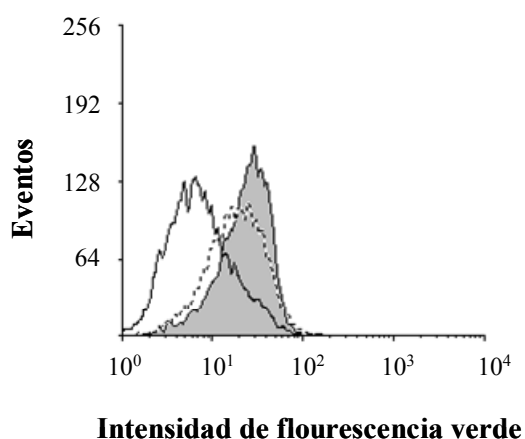
*B. pertussis* no opsonizada asociada a neutrófilos tratados con M $\beta$ CD o nistatina difiere significativamente del número de *B. pertussis* no opsonizada asociada a neutrófilos sin tratar ( $P < 0.05$ ).

CR3 es probablemente el principal receptor involucrado en la asociación de *B. pertussis* con las células inmunes bajo condiciones no opsonizantes, mientras que los receptores Fc $\gamma$  median la adhesión y fagocitosis de *B. pertussis* opsonizada con IgG. Estos receptores de IgG se encuentran agrupados en tres clases, Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) y Fc $\gamma$ RIII (CD16), cada una de las cuales presenta a su vez diferentes subclases. Los neutrófilos expresan constitutivamente Fc $\gamma$ RIIa y Fc $\gamma$ RIIIb, mientras que Fc $\gamma$ RI se expresa únicamente bajo condiciones de activación. Dado que una alteración en la expresión de estos receptores o de CR3 podría afectar el nivel de asociación de *B. pertussis*, se estudió si la expresión de estos receptores se encuentra alterada por el tratamiento de los neutrófilos con M $\beta$ CD. En la Figura 3 se observa que este tratamiento no afecta la expresión de ninguno de estos receptores.



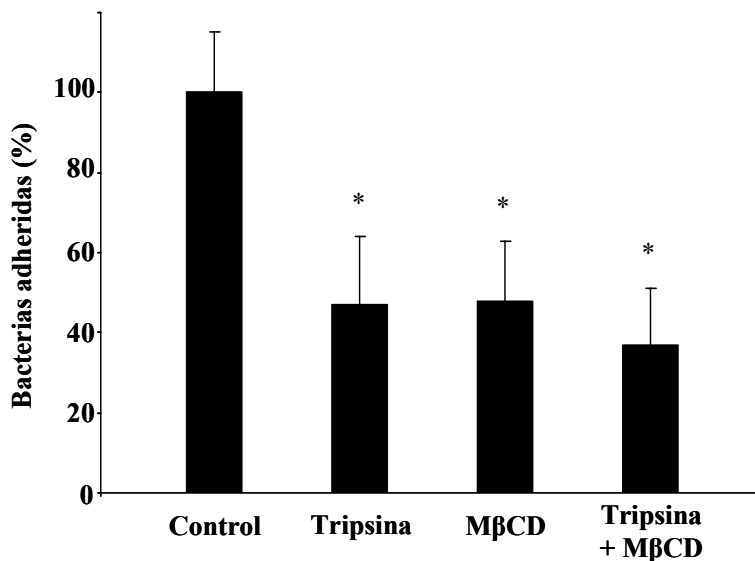
**Figura 3. El nivel de expresión de los receptores CR3 y Fc $\gamma$ R no se ve afectado por el tratamiento con M $\beta$ CD.** La expresión de CR3 y Fc $\gamma$ R fue evaluada antes (área gris) y después (área blanca) del tratamiento con M $\beta$ CD. La marcación de los receptores se realizó utilizando como anticuerpos primarios los siguientes monoclonales: anti-CD64 (Fc $\gamma$ RIa), anti-CD32 (Fc $\gamma$ RIIa), anti-CD16 (Fc $\gamma$ RIIIb), y anti-CD11b (CR3), y como anticuerpo secundario fragmentos F(ab) $_2$  de anticuerpos de cabra que reconocen inmunoglobulina de ratón conjugados con FITC. Se muestran histogramas representativos de tres experimentos independientes.

Más aun, en experimentos en donde el colesterol de membrana de neutrófilos tratados con M $\beta$ CD fue reconstituido mediante el agregado externo de colesterol se observó que la asociación de *B. pertussis* no opsonizada recuperó los valores observados en neutrófilos control (no incubados con M $\beta$ CD) (Fig. 4), indicando que la reducción en la interacción de *B. pertussis* con neutrófilos tratados con M $\beta$ CD se debe específicamente a la remoción del colesterol y no a efectos secundarios de esta droga. En conjunto, estos resultados indican que los rafts lipídicos cumplen un papel importante en la interacción de *B. pertussis* con los neutrófilos humanos en ausencia de anticuerpos.



**Figura 4. La restitución del colesterol de membrana normaliza el nivel de asociación de *B. pertussis* con los neutrófilos.** GFP-*B. pertussis* no opsonizada fue incubada (R<sub>i</sub>b/c 500) durante 20 min a 37 °C con neutrófilos sin tratar (área gris) o tratados con M $\beta$ CD y posteriormente incubados con DMEM-BSA (línea continua) o con 8 mg/ml de colesterol soluble en DMEM-BSA (línea de puntos). Las células fueron lavadas, fijadas y analizadas mediante citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de 2 experimentos independientes.

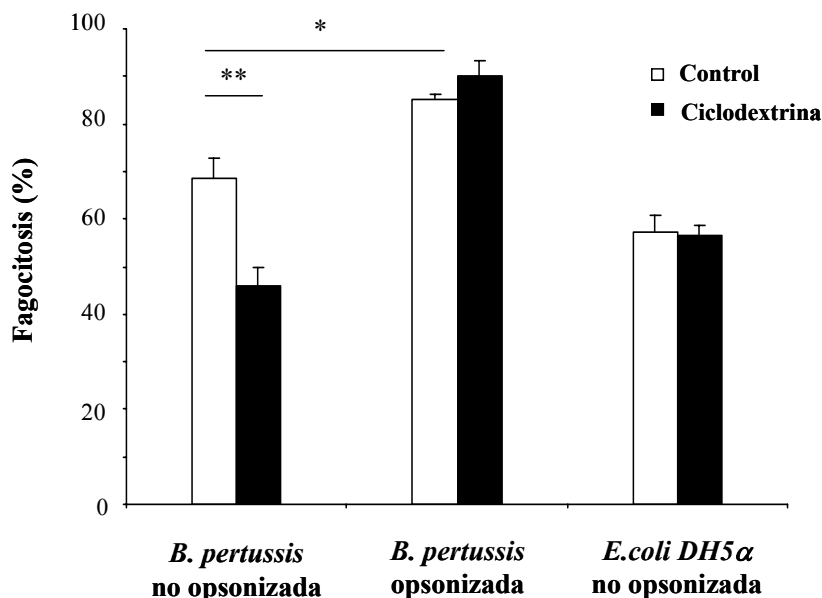
Los rafts lipídicos se encuentran enriquecidos en proteínas ancladas a GPI que interaccionan temporalmente con otros receptores proteicos mediando una serie de funciones celulares [22]. Trabajos previos indican que miembros de la familia de las  $\beta_2$ -integrinas, entre los que se encuentra CR3, participan activamente en esta interacción [23-25]. Debido a ello se investigó si componentes proteicos están involucrados en la asociación de *B. pertussis* con dominios rafts. Para ello se evaluó la adhesión de *B. pertussis* con neutrófilos pretratados con tripsina. El tratamiento con esta proteasa redujo significativamente la interacción de *B. pertussis* con los neutrófilos, sin embargo no se observó un efecto aditivo cuando los PMN fueron tratados tanto con M $\beta$ CD como con tripsina. Estos resultados sugieren que la interacción de *B. pertussis* con los neutrófilos involucra componentes proteicos que se encuentran física o funcionalmente asociados a dominios rafts lipídicos (Fig. 5).



**Figura 5. Componentes proteicos están involucrados en la interacción de *B. pertussis* con dominios rafts lipídicos.** Neutrófilos tratados con MβCD (10 mg/ml), con tripsina (0,5 %) o con tripsina + MβCD fueron incubados con GFP- *B. pertussis* no opsonizada (R<sub>i</sub>b/c 500) durante 20 min a 37°C y analizados mediante citometría de flujo. El nivel de asociación de bacterias incubadas con neutrófilos sin tratar (control) se fijó como 100 %. Los valores representan la media ± DE de seis experimentos independientes utilizando neutrófilos de diferentes donantes. La interacción de *B. pertussis* con neutrófilos tratados con MβCD o tripsina no difiere significativamente de la interacción de la bacteria con neutrófilos tratados con tripsina + MβCD (\*P<0.05).

Si bien en la Figura 2 se observa que los rafts lipídicos están involucrados en la adhesión de *B. pertussis* a neutrófilos únicamente cuando la bacteria no se encuentra opsonizada por anticuerpos, esto no significa necesariamente que los dominios lipídicos están involucrados en la fagocitosis en una u otra condición. En estudios anteriores se observó que en ausencia de anticuerpos la fagocitosis de *B. pertussis* por este tipo celular es prácticamente inexistente [2]. Sin embargo en ese estudio no se normalizó el nivel de adhesión y por lo tanto la ausencia de fagocitosis puede haberse debido fundamentalmente a la baja adhesión. En este estudio, habiendo logrado un nivel de adhesión bacteriana comparable a bacterias opsonizadas se investigó nuevamente la fagocitosis de *B. pertussis* en ausencia de anticuerpos. Como puede verse en la Figura 6, aunque en un nivel menor que en presencia de anticuerpos, *B. pertussis* no opsonizada es fagocitada por los neutrófilos humanos. Con el fin de evaluar si los rafts lipídicos están involucrados en la fagocitosis de *B. pertussis* se trataron neutrófilos humanos con o sin MβCD y luego se los incubó con *B. pertussis* opsonizada con IgG o no opsonizada. La fagocitosis se determinó por citometría de flujo. La internalización se

expresó en función del número de bacterias adheridas lo cual permitió evaluar la fagocitosis de forma independiente de la adhesión inicial obtenida bajo las diferentes condiciones. El tratamiento con M $\beta$ CD redujo significativamente el nivel de fagocitosis de *B. pertussis* no opsonizada. Por el contrario, en presencia de anticuerpos opsonizantes la internalización no se vio afectada por este tratamiento, lo cual indica que la fagocitosis mediada por el Fc $\gamma$ R no se encuentra sensiblemente afectada por la extracción del colesterol (Fig. 6). Paralelamente se evaluó la fagocitosis de *E. coli* DH5 $\alpha$  como control negativo, ya que se sabe que en la fagocitosis de esta bacteria no están involucrados dominios rafts [12, 21]. En la figura 6 se observa que la fagocitosis de *E. coli* DH5 $\alpha$  no se vio afectada por el tratamiento con M $\beta$ CD (Fig. 6).



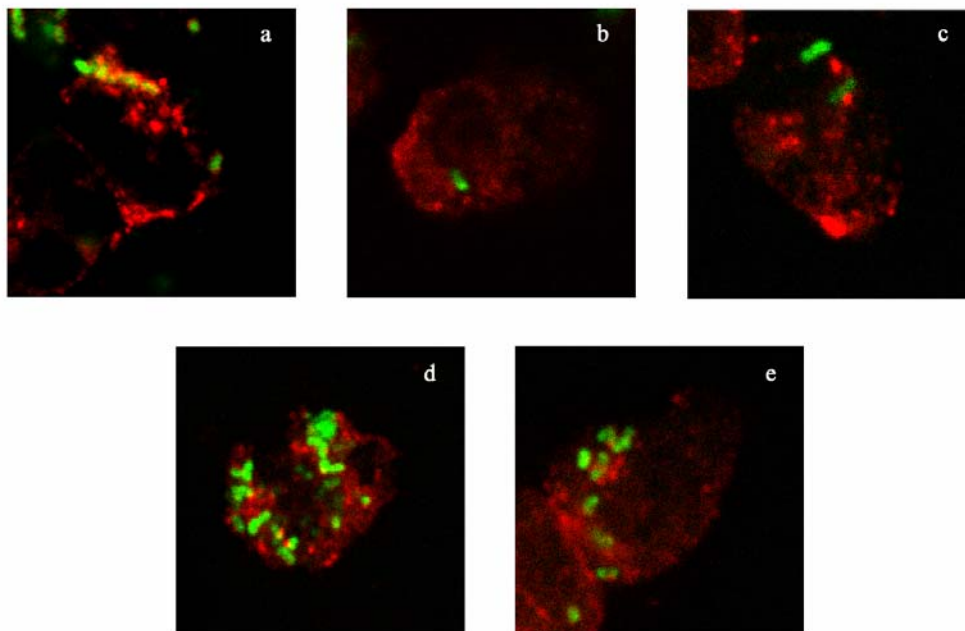
**Figura 6. La extracción de colesterol reduce la fagocitosis de *B. pertussis* no opsonizada.** Los neutrófilos fueron incubados con medio DMEM-BSA (control) o con medio conteniendo 10 mg/ml de M $\beta$ CD (ciclodextrina). Posteriormente, *B. pertussis* no opsonizada (R<sub>i</sub>b/c 500), *B. pertussis* opsonizada con IgG (R<sub>i</sub>b/c 50) o *E. coli* DH5 $\alpha$  (R<sub>i</sub>b/c 500) expresando GFP fueron incubadas con los PMN durante 20 min a 37 °C. Los neutrófilos fueron luego lavados y divididos en dos alícuotas. Una alícuota fue mantenida en hielo (nivel inicial de adhesión) mientras que la otra alícuota fue incubada durante 1h a 37 °C para permitir que la internalización transcurra. *B. pertussis*-IgG opsonizada unida a la superficie fue detectada en ambas alícuotas mediante la adición de fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos anti-IgG humana conjugados con PE. *B. pertussis* no opsonizada unida a la superficie fue detectada por incubación con anticuerpo policlonal anti-*B. pertussis* de conejo seguido por fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con PE. De forma similar, *E. coli* DH5 $\alpha$  unida a la superficie de membrana fue detectada mediante la incubación con suero anti-*E. coli* de conejo seguido por la incubación con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con PE. La fagocitosis se expresó como el porcentaje de bacterias adheridas que fueron fagocitadas. Los datos presentados representan la media  $\pm$  DE de cuatro experimentos independientes utilizando neutrófilos de diferentes donantes. La fagocitosis de *B. pertussis* no opsonizada difiere significativamente de la fagocitosis de *B. pertussis* opsonizada con IgG



(\* $P < 0.05$ ). La fagocitosis de *B. pertussis* no opsonizada por neutrófilos tratados con M $\beta$ CD difiere significativamente de la fagocitosis de *B. pertussis* no opsonizada por neutrófilos sin tratar (\*\* $P < 0.05$ ).

#### 4.3.2. En ausencia de anticuerpos *B. pertussis* inhibe su tráfico a lisosomas en un proceso dependiente de colesterol

Se utilizó microscopía confocal para estudiar el tráfico intracelular de *B. pertussis* en ausencia y en presencia de anticuerpos opsonizantes. Los estudios indican que bajo condiciones no opsonizantes aproximadamente el 70 % de las bacterias colocaliza con flotilina, un marcador de rafts lipídicos, luego de 20 min de incubación con los neutrófilos (Fig. 7, panel a y Tabla 1) En contraste, el porcentaje de colocalización con flotilina fue mínimo en el caso de *B. pertussis* opsonizada con IgG o *E. coli* DH5 $\alpha$  (Fig. 7, paneles d y c respectivamente) confirmando resultados anteriores que indican que estos dominios participan específicamente en la interacción de *B. pertussis* con los neutrófilos bajo condiciones no opsonizantes. La extracción del colesterol de membrana con M $\beta$ CD causó una significativa desorganización de los



**Figura 7. En ausencia de anticuerpos opsonizantes *B. pertussis* colocaliza con el marcador de dominios lipídicos flotilina.** Neutrófilos humanos tratados con o sin M $\beta$ CD fueron incubados durante 20 min a 37 °C con GFP-*B. pertussis* no opsonizada (R<sub>i</sub>b/c 500), GFP-*B. pertussis* IgG opsonizada (R<sub>i</sub>b/c 50) o GFP-*E. coli* DH5 $\alpha$  no opsonizada (R<sub>i</sub>b/c 500). Posteriormente fueron lavados, fijados y permeabilizados previo al agregado de anticuerpos anti-flotilina. El panel (a) muestra a *B. pertussis* no opsonizada (verde) colocalizando con flotilina marcada con CY3 (rojo). Los paneles (c) y (d) muestran la ausencia de

colocalización de *E. coli* DH5a y de *B. pertussis* IgG-opsonizada con flotilina, respectivamente. Los paneles (b) y (e) muestran la ausencia de colocalización de *B. pertussis* no opsonizada y *B. pertussis* opsonizada con IgG con flotilina luego del tratamiento de los neutrófilos con M $\beta$ CD. Se muestran paneles representativos de 2 experimentos independientes.

dominios rafts acompañado por una disminución en el porcentaje de colocalización de *B. pertussis* con flotilina (Fig. 7, panel b y Tabla 1). Por lo contrario, el porcentaje de colocalización con flotilina de *B. pertussis* opsonizada con IgG no se vio afectado por este tratamiento (Fig. 7, panel e y Tabla 1). Estos resultados confirman la intervención de los dominios rafts en la interacción de *B. pertussis* no opsonizada con neutrófilos humanos.

**Tabla 1.** Dominios lipídicos en el tráfico intracelular de *B. pertussis* en neutrófilos humanos.

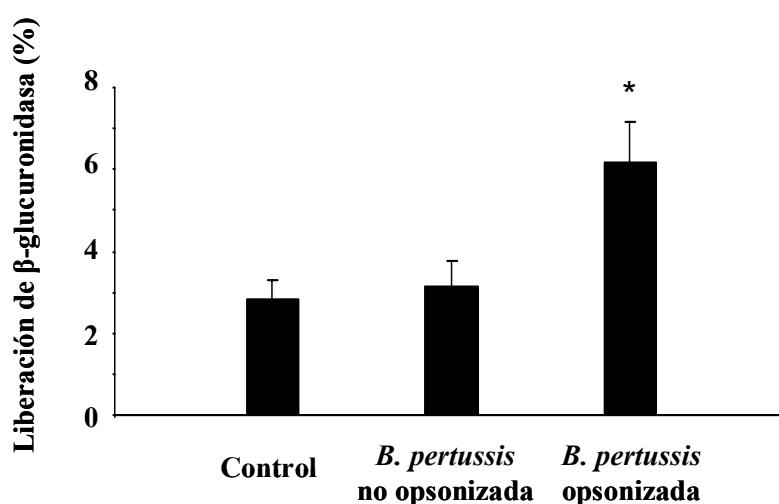
| Tratamiento bacteriano | Tratamiento del neutrófilo | R <sub>i</sub> b/c | Flotilina <sup>a</sup> |       | LAMP <sup>a</sup> |       | Transferrina <sup>b</sup> |       |
|------------------------|----------------------------|--------------------|------------------------|-------|-------------------|-------|---------------------------|-------|
|                        |                            |                    | 20 min                 | 1 h   | 20 min            | 1 h   | 20 min                    | 1 h   |
| No opsonizada          | control                    | 500                | 70±10                  | 60±15 | 4±1               | 5±3   | 70±15                     | 60±12 |
|                        | M $\beta$ CD               | 500                | 10±3                   | 8±3   | 40±15             | 74±10 | 5±2                       | 3±2   |
| Opsonizada             | control                    | 50                 | 8±3                    | 6±3   | 82±8              | 85±12 | 6±3                       | 4±2   |
|                        | M $\beta$ CD               | 50                 | 5±2                    | 6±4   | 75±5              | 80±9  | 4±1                       | 2±1   |

<sup>a</sup> Porcentaje de bacterias colocalizando con flotilina o LAMP luego de 20 min o 1 h de incubación con neutrófilos a 37 °C. Los resultados mostrados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes realizados con diferentes donantes.

<sup>b</sup> Porcentaje de colocalización con transferrina. PMN incubados durante 20 min o 1 h con GFP-*B. pertussis* fueron lavados e incubados con Alexa transferrina-495 durante otros 45 min. Los resultados mostrados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes realizados con diferentes donantes.

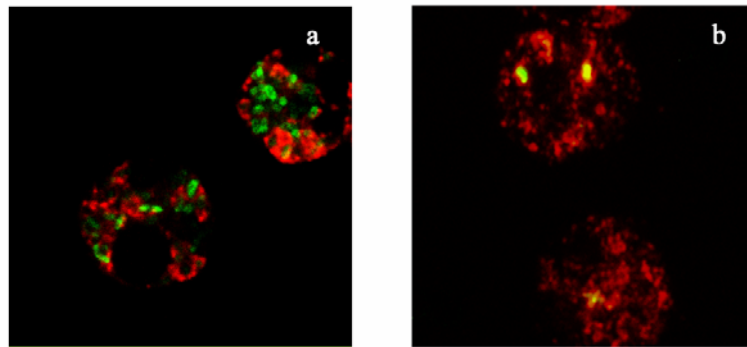
Como ya se mencionó, la utilización de rafts lipídicos como receptores de ingreso a la célula inmune determina que ciertos patógenos sean dirigidos hacia compartimientos no lisosomales favoreciendo su sobrevivencia [12, 26-28]. En trabajos previos de nuestro grupo se ha demostrado que la fagocitosis de *B. pertussis* no opsonizada con anticuerpos no dispara el estallido respiratorio [2], sin embargo, la capacidad del neutrófilo de mediar una respuesta bactericida a través de la liberación del contenido de sus gránulos en respuesta a la interacción con *B. pertussis* no ha sido aun investigada. La fusión de los gránulos azurófilos (lisosomas secretorios especializados) con fagosomas nacientes ocurre rápidamente en los neutrófilos determinando que parte

del contenido sea liberado al medio extracelular [1]. Debido a ello, es posible seguir la biogénesis del fagolisosoma midiendo la liberación de enzimas en el sobrenadante celular [29]. El nivel de fusión de *B. pertussis* no opsonizada y opsonizada con IgG con los gránulos azurófilos fue evaluado midiendo la actividad de la enzima lisosomal  $\beta$ -glucuronidasa [1]. En la Figura 8 se muestra que la enzima es eficientemente liberada solo cuando la bacteria se encuentra opsonizada con anticuerpos, bajo condiciones no opsonizantes la liberación no es significativa sugiriendo que en ausencia de anticuerpos la fusión de *B. pertussis* con los gránulos azurófilos no se produce.



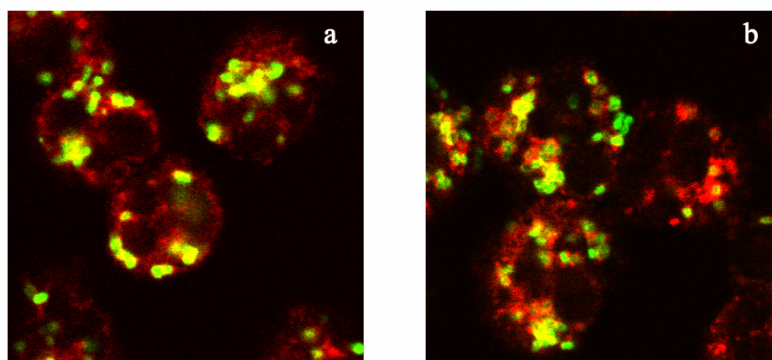
**Figura 8. Bajo condiciones no opsonizantes *B. pertussis* no induce la liberación de la enzima lisosomal  $\beta$ -glucuronidasa.** Los neutrófilos fueron incubados con DMEM-BSA (control), *B. pertussis* no opsonizada ( $R_i$ :b/c 500) o *B. pertussis* IgG opsonizada ( $R_i$ :b/c 50) durante 1 h a 37 °C. El porcentaje de  $\beta$ -glucuronidasa liberado al medio extracelular fue expresado en función del contenido total de  $\beta$ -glucuronidasa en la célula. Los datos presentados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes utilizando neutrófilos de diferentes donantes. La liberación de  $\beta$ -glucuronidasa inducida por *B. pertussis* opsonizada con IgG difiere significativamente de la liberación inducida por *B. pertussis* no opsonizada (\* $P < 0,05$ ).

Se empleó microscopía confocal para evaluar el tráfico intracelular en cada condición. Según se pudo observar, bajo condiciones no opsonizantes un alto porcentaje de bacterias no colocaliza con el marcador de membrana lisosomal LAMP-1 confirmando que *B. pertussis* evade la fusión con lisosomas. Llamativamente, el tratamiento de los neutrófilos con M $\beta$ CD determinó que la mayor parte de las bacterias no opsonizadas fagocitadas sean dirigidas a compartimientos lisosomales (Fig. 9, Tabla 1) sugiriendo que la entrada de *B. pertussis* a través de dominios ricos en colesterol facilita el tránsito de la bacteria a compartimientos no lisosomales.



**Figura 9. La interacción con rafts lipídicos permite a *B. pertussis* no opsonizada evadir la fusión con lisosomas.** Neutrófilos humanos tratados con medio DMEM-BSA (panel a) o medio DMEM-BSA-M $\beta$ CD (panel b) fueron incubados durante 20 min a 37 °C con GFP-*B. pertussis* no opsonizada ( $R_{i,b/c}$  500), lavados y posteriormente incubados durante 1 h para permitir que la fagocitosis transcurra. La tinción de los compartimientos lisosomales se realizó utilizando como primer anticuerpo anti-LAMP1 humana y como segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con CY3. El panel a muestra la ausencia de colocalización de *B. pertussis* con el marcador LAMP-1. El panel b muestra a *B. pertussis* colocalizando con LAMP-1, reflejado por la presencia de áreas amarillas. Se muestran paneles representativos de 2 experimentos independientes.

En trabajos previos se demostró que cuando *B. pertussis* se encuentra opsonizada con anticuerpos, es transportada eficientemente a compartimientos lisosomales [2]. Nuestros ensayos muestran resultados similares. Las bacterias opsonizadas presentaron un alto porcentaje de colocalización con LAMP-1. Este porcentaje no cambió en neutrófilos tratados con M $\beta$ CD indicando que este tratamiento no altera significativamente el tráfico intracelular de *B. pertussis* fagocitada a través de los Fc $\gamma$ R. (Fig. 10 y Tabla 1).

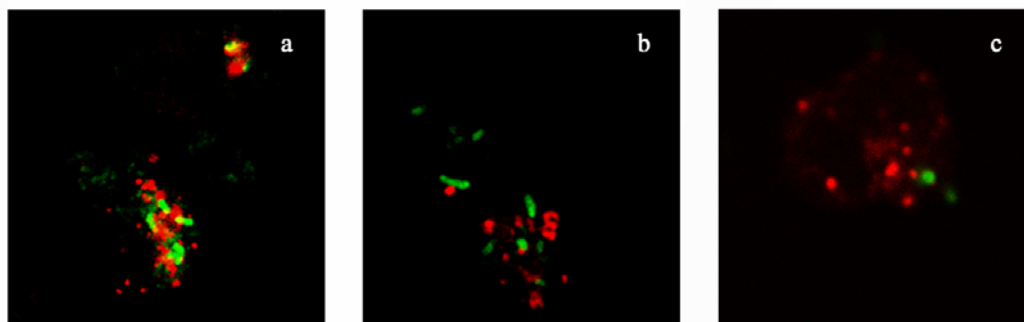


**Figura 10. Bajo condiciones opsonizantes *B. pertussis* es dirigida a compartimientos lisosomales en un mecanismo independiente de los dominios lipídicos.** Neutrófilos humanos tratados con medio DMEM-BSA (panel a) o medio DMEM-BSA-M $\beta$ CD (panel b) fueron incubados durante 20 min a 37 °C con GFP-*B. pertussis* IgG opsonizada ( $R_{i,b/c}$  50), lavados y posteriormente incubados durante 1 h para permitir la fagocitosis. La tinción de los compartimientos lisosomales se realizó según a sido detallado en

la Fig. 9. Los paneles a y b muestran a *B. pertussis* IgG opsonizada colocalizando con LAMP-1, reflejado por la presencia de áreas amarillas. Se muestran paneles representativos de al menos 2 experimentos independientes.

#### 4.3.3. *B. pertussis* permanece en compartimientos que tienen acceso a endosomas tempranos

Los resultados anteriores indican que *B. pertussis* bajo condiciones no opsonizantes reside en compartimientos que no poseen el marcador lisosomal LAMP-1, con el fin de elucidar si la bacteria permanece en compartimientos con características de endosomas tempranos y tiene acceso a nutrientes estudiamos la colocalización de *B. pertussis* con transferrina. En la Figura 11 puede observarse que únicamente *B. pertussis* no opsonizada colocaliza con esta molécula, lo cual indica que luego de ser fagocitada a través de dominios ricos en colesterol, *B. pertussis* se localiza en vacuolas endosomales que tienen acceso a endosomas de reciclaje. La extracción de colesterol mediante M $\beta$ CD determinó una disminución en el porcentaje de colocalización confirmando el rol de los dominios rafts en el tráfico intracelular de *B. pertussis*.



**Figura 11. Bajo condiciones no opsonizantes *B. pertussis* permanece en endosomas tempranos.** Neutrófilos tratados con medio DMEM-BSA (panel a y c) o medio DMEM-BSA-M $\beta$ CD (panel b) fueron incubados durante 20 min a 37 °C con GFP-*B. pertussis* no opsonizada (R<sub>i</sub>b/c 500) (paneles a y b) o GFP-*B. pertussis* opsonizada con IgG (R<sub>i</sub>b/c 50) (panel c), lavados y posteriormente incubados durante 1 hora a 37 °C para permitir la fagocitosis. Los neutrófilos fueron analizados mediante microscopía confocal luego de ser incubados durante 45 min con Alexa-trasferrina-594 (10  $\mu$ g/ml). El panel **a** muestra a *B. pertussis* colocalizando con transferina reflejado por la presencia de áreas amarillas. Los paneles **b** y **c** muestran la ausencia de colocalización con este marcador. Se muestran paneles representativos de 2 experimentos independientes.

#### 4.3.4. La entrada a través de dominios ricos en colesterol determina que *B. pertussis* sobreviva a la interacción con los neutrófilos

En estudios de sobrevivencia se observó que en ausencia de anticuerpos opsonizantes *B. pertussis* tiene una sobrevivencia mayor que bajo condiciones opsonizantes (Tabla 2). Sin embargo, cuando los neutrófilos fueron previamente tratados con M $\beta$ CD se observó una significativa reducción en el número de bacterias viables bajo condiciones no opsonizantes sugiriendo que la entrada de *B. pertussis* a través de dominios ricos en colesterol protege a la bacteria de la actividad bactericida de los neutrófilos. Ni la sobrevivencia de *B. pertussis* opsonizada con IgG, ni la de *E. coli* DH5 $\alpha$  se vio afectada por este tratamiento. Estos resultados demuestran que en ausencia de anticuerpos *B. pertussis* es capaz de evadir la acción bactericida de los neutrófilos a través de un mecanismo dependiente de dominios rafts.

**Tabla 2.** Los dominios ricos en colesterol están involucrados en la sobrevivencia de *B. pertussis* no opsonizada.

| Bacteria      | Tratamiento PMN | R <sub>i</sub> b/c | Adhesión (bacterias por célula) | Porcentaje de fagocitosis <sup>a</sup> | Sobrevivencia bacteriana (% respecto a bacterias internalizadas) <sup>b</sup> |
|---------------|-----------------|--------------------|---------------------------------|--|---|
| No opsonizada | control         | 500                | 25 $\pm$ 3                      | 77 $\pm$ 4 (19 $\pm$ 1)                | 4.8   |
|               | M $\beta$ CD    | 500                | 7.3 $\pm$ 0.5                   | 57 $\pm$ 4 (4,1 $\pm$ 0.3)             | 1.3   |
| Opsonizada    | control         | 50                 | 35 $\pm$ 4                      | 86 $\pm$ 2 (30,0 $\pm$ 0.7)            | 0.05  |
|               | M $\beta$ CD    | 50                 | 37 $\pm$ 5                      | 87 $\pm$ 5 (32 $\pm$ 2)                | 0.05  |

<sup>a</sup> El número de bacterias internalizadas está expresado en paréntesis. Los datos presentados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

<sup>b</sup> Porcentaje de bacterias vivas luego del tratamiento con polimixina B.

#### 4.4. Discusión

La interacción de *B. pertussis* con los neutrófilos en ausencia de anticuerpos puede tener un rol importante en el control del proceso infeccioso dada la baja concentración de anticuerpos opsonizantes presentes en el tracto respiratorio. Sin embargo, se han realizado pocos estudios tendientes a evaluar la respuesta bactericida de los neutrófilos tras el contacto con *B. pertussis*. En este estudio, se han encontrado evidencias que indican que la fagocitosis de *B. pertussis* a través de dominios ricos en colesterol determina que la bacteria sobreviva a la interacción con una de las células más agresivas del sistema inmune. Este mecanismo de inmunoevasión podría contribuir a la persistencia de *B. pertussis* en el tracto respiratorio de huéspedes no inmunes o con inmunidad reducida y favorecer la colonización.

Los neutrófilos median la destrucción de los patógenos a través de tres mecanismos: la fagocitosis del microorganismo infeccioso, la generación de derivados tóxicos del oxígeno y la liberación de moléculas microbicidas presentes en sus gránulos [30]. Bajo condiciones fisiopatológicas, mientras la exocitosis de los gránulos específicos es iniciada por estímulos solubles o partículas, los gránulos azurófilos, un tipo especializado de lisosomas secretorios, son movilizados en respuesta a la fagocitosis de partículas [31]. La movilización de estos gránulos ocurre rápidamente fusionándose con fagosomas nacientes que aun no se encuentran completamente cerrados [32, 33]. Debido a ello, la presencia de enzimas características de estos gránulos en el medio extracelular refleja el nivel de fusión con la partícula fagocitada [31, 33]. En el presente Capítulo se investigó la movilización de los gránulos azurófilos en respuesta a *B. pertussis* no opsonizada y opsonizada con IgG a través de la determinación de la liberación de la enzima lisosomal  $\beta$ - glucuronidasa. Los resultados indican que sólo en presencia de anticuerpos opsonizantes existe una liberación significativa de esta enzima sugiriendo que en ausencia de anticuerpos la fusión de *B. pertussis* con los lisosomas no se produce. Estos resultados confirman estudios previos de nuestro grupo que indican que la interacción de *B. pertussis* con neutrófilos humanos bajo condiciones no opsonizantes, a diferencia de la mediada por anticuerpos, no induce la generación del estallido respiratorio [2] e indican que este patógeno es capaz de evadir dos de los principales mecanismos bactericidas que presenta esta célula inmune.

El tipo de receptores involucrados en el proceso de fagocitosis determina en muchos casos el destino final de la partícula fagocitada. La microagregación de los FcR en respuesta a la interacción con *B. pertussis* opsonizada con IgG o IgA pone en marcha la transducción de señales conducente a la activación celular y el transporte de la partícula fagocitada a compartimientos lisosomales [2]. En ausencia de anticuerpos, CR3 es probablemente el principal receptor involucrado en la adhesión de *B. pertussis* a la célula inmune. La transducción de señales desencadenada en respuesta a su interacción aun no ha sido del todo esclarecida, sin embargo, se ha demostrado que determinados factores de virulencia, entre los cuales se incluyen fimbria, toxina pertussis y FHA incrementan la capacidad de unión de CR3 a *B. pertussis* sugiriendo que *B. pertussis* estimula su propia adhesión a través de este receptor [4, 10, 34, 35] favoreciendo posiblemente su sobrevida [6]. Los resultados que se muestran en este Capítulo demuestran por primera vez que, además de CR3, la presencia de dominios rafts asegura que *B. pertussis* sea transportada a estructuras subcelulares que no se fusionan con los lisosomas. El tratamiento de los PMN con drogas que sequestran colesterol y desorganizan los dominios lipídicos conlleva a una reducción tanto en la adhesión como en la fagocitosis de *B. pertussis* no opsonizada. La sobrevida intracelular también se ve disminuida sugiriendo que la entrada a través de estos dominios posibilita la captura y la fagocitosis de *B. pertussis* pero la protege de la acción celular bactericida de la célula inmune traduciendo la fagocitosis en un mecanismo de persistencia para la bacteria. Por el contrario, el tratamiento de los neutrófilos con M $\beta$ CD no altera la fagocitosis ni sobrevida de *B. pertussis* opsonizada con IgG la cual es eficientemente capturada y destruida por el neutrófilo, indicando que la extracción de colesterol no afecta sensiblemente la internalización mediada por receptores Fc $\gamma$ . Un aspecto importante es que el nivel de expresión de ninguno de estos receptores (CR3 o Fc $\gamma$ R) se altera significativamente por el tratamiento con M $\beta$ CD y no se observó expresión de Fc $\gamma$ RI indicando que el neutrófilo no se activa en respuesta al tratamiento con M $\beta$ CD en ninguno de los estudios. Por otro lado, la adhesión y fagocitosis de *E.coli* DH5 $\alpha$  no se vio afectada en neutrófilos tratados con M $\beta$ CD, indicando que la depleción del colesterol de membrana no modifica la funcionalidad del neutrófilo. Por otro lado, el agregado externo de colesterol a neutrófilos tratados con M $\beta$ CD permite restaurar el nivel de adhesión de *B. pertussis* confirmando el requerimiento específico de esta



molécula en la interacción de *B. pertussis* con la célula inmune bajo condiciones no opsonizantes.

Se ha sugerido que los rafts participan en procesos de transducción de señales acercando a los receptores a sus moléculas de señalización y excluyendo de forma temporal a otras (ej: moléculas de regulación negativa). En neutrófilos se ha encontrado que CR3 se asocia a varias proteínas ancladas por GPI entre las que se incluyen CD14 [36], Fc $\gamma$ RIIIb [37], uPAR [38] y GPI-80 [39] para regular distintas funciones celulares. Debido a que estas proteínas no tienen dominios transmembrana o citoplasmáticos, la interacción con esta integrina facilitaría la iniciación de cascadas de señalización [24]. Es probable entonces que el efecto sobre la adhesión y la fagocitosis que tiene el tratamiento de los neutrófilos con M $\beta$ CD se deba en parte a la disrupción de plataformas lipídicas impidiendo la micro agregación de moléculas involucradas en la interacción de *B. pertussis* con la célula inmune como CR3. Mediante el tratamiento de los neutrófilos con tripsina se pudo comprobar que componentes de naturaleza proteica participan en la interacción de *B. pertussis* con dominios ricos en colesterol, lo cual avala la hipótesis de que los rafts lipídicos, actuando como plataformas de agregación, podrían facilitar la interacción de *B. pertussis* con sus receptores y la iniciación de eventos de señalización celular que conllevan a la fagocitosis de la bacteria y su eventual sobrevida.

Mediante microscopía confocal se comprobó que en ausencia de anticuerpos *B. pertussis* interacciona con flotilina, un marcador de raft lipídicos, y que el ingreso a través de estos dominios determina que *B. pertussis* sea transportada hacia compartimientos no lisosomales (LAMP negativos) que tienen acceso a endosomas de reciclaje y por lo tanto a nutrientes. La incorporación de componentes rafts a la membrana del fagosoma determina que una gran variedad de microorganismos sean transportados a compartimientos no lisosomales [12, 13, 26, 40-42]. Bajo condiciones no opsonizantes, *B. pertussis* es transportada a lisosomas solo cuando los neutrófilos son previamente tratados con M $\beta$ CD lo cual indica que este patógeno utiliza, de forma similar a otros patógenos, la entrada a través de dominios rafts para asegurar su sobrevida.

A modo de resumen, los resultados presentados en este Capítulo muestran por primera vez que en ausencia de anticuerpos la fagocitosis de *B. pertussis* se produce a través de dominios rafts lipídicos que determinan que la bacteria no sea transportada

hacia compartimientos lisosomales favoreciendo su acceso a nutrientes en localización intracelular y su supervivencia.

## 4.5. Conclusiones

Los resultados descritos en este Capítulo demuestran que bajo condiciones no opsonizantes *B. pertussis* es capaz de sobrevivir a la interacción con los neutrófilos y ponen énfasis en la importancia de la presencia de anticuerpos opsonizantes en el sitio de infección para combatir la infección. La fagocitosis de *B. pertussis* bajo condiciones no opsonizantes no sólo no dispara el estallido respiratorio, lo cual fue probado en trabajos previos [2], sino que no induce la fusión de los fagosomas nacientes con los gránulos azurófilos (lisosomas secretorios especializados) determinando que un alto porcentaje de bacterias sobreviva. Por el contrario *B. pertussis* opsonizada con IgG no sólo es capturada y fagocitada de forma más eficiente que bajo condiciones no opsonizantes sino que es transportada a compartimientos lisosomales donde es inactivada.

Los rafts lipídicos están involucrados en la adhesión, fagocitosis y sobrevivencia de *B. pertussis* bajo condiciones no opsonizantes. El ingreso a través de estos dominios determina que la bacteria sea transportada hacia compartimientos no lisosomales con acceso a endosomas de reciclaje donde sobrevive.

La sobrevivencia de *B. pertussis* a la interacción con neutrófilos humanos podría ser crítica en huéspedes no inmunes o con inmunidad disminuida, como lo son los adolescentes y adultos, y contribuir significativamente a la persistencia de esta bacteria en el tracto respiratorio.



## Referencias

1. Borregaard N, Cowland JB. **Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte.** *Blood.* 1997,89:3503-3521.
2. Rodriguez ME, Hellwig SMM, Hozbor DF, Leusen J, van der Pol W-L, van de Winkel JGJ. **Fc Receptor-Mediated Immunity Against *Bordetella pertussis*.** *J Immunol* 2001,167:6545-6551.
3. Le Cabec V, Carreno S, Moisand A, Bordier C, Maridonneau-Parini I. **Complement Receptor 3 (CD11b/CD18) Mediates Type I and Type II Phagocytosis During Nonopsonic and Opsonic Phagocytosis, Respectively.** *J Immunol* 2002,169:2003-2009.
4. Hazenbos W, van den Berg B, van Furth R. **Very late antigen-5 and complement receptor type 3 cooperatively mediate the interaction between *Bordetella pertussis* and human monocytes.** *J Immunol* 1993,151:6274-6282.
5. Mobberley-Schuman PS, Weiss AA. **Influence of CR3 (CD11b/CD18) Expression on Phagocytosis of *Bordetella pertussis* by Human Neutrophils.** *Infect. Immun.* 2005,73:7317-7323.
6. Hellwig SM, van Oirschot HF, Hazenbos WL, van Spriel 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.* 2001,183:871-879.
7. 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.* 1991,173:1143-1149.
8. Aderem A, Underhill DM. **Mechanisms of phagocytosis in macrophages.** *Annu Rev Immunol.* 1999,17:593-623.
9. Chimini G, Chavrier P. **Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment.** *Nat Cell Biol.* 2000,2:E191-196.
10. Ishibashi Y, Claus S, Relman D. ***Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18).** *J. Exp. Med.* 1994,180:1225-1233.
11. Nakayama H, Yoshizaki F, Prinetti A, Sonnino S, Mauri L, Takamori K, Ogawa H, Iwabuchi K. **Lyn-coupled LacCer-enriched lipid rafts are required for CD11b/CD18-mediated neutrophil phagocytosis of nonopsonized microorganisms.** *J Leukoc Biol* 2008,83:728-741.
12. Rodriguez NE, Gaur U, Wilson ME. **Role of caveolae in *Leishmania chagasi* phagocytosis and intracellular survival in macrophages.** *Cellular Microbiology* 2006,8:1106-1120.
13. Peyron P, Bordier C, N'Diaye E-N, Maridonneau-Parini I. **Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins.** *J Immunol* 2000,165:5186-5191.
14. Weingart CL, Broitman-Maduro G, Dean G, Newman S, Peppler M, Weiss AA. **Fluorescent Labels Influence Phagocytosis of *Bordetella pertussis* by Human Neutrophils.** *Infect Immun.* 1999,67:4264-4267.

15. Nagel J, de Graaf S, Schijf-Evers D. **Improved serodiagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis* by determination of IgG anti-LPF antibody levels.** *Dev Biol Stand.* 1985,61:325-330.
16. Repp R, Valerius T, Sandler A, Gramatzki M, Iro H, Kalden JR, Platzer E. **Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony- stimulating factor.** *Blood* 1991,78:885-889.
17. Rodriguez ME, Van der Pol W-L, Van de Winkel JGJ. **Flow cytometry-based phagocytosis assay for sensitive detection of opsonic activity of pneumococcal capsular polysaccharide antibodies in human sera.** *Journal of Immunological Methods* 2001,252:33-44.
18. Gregoire C, Welch H, Astarie-Dequeker C, Maridonneau-Parini I. **Expression of azurophil and specific granule proteins during differentiation of NB4 cells in neutrophils.** *J Cell Physiol.* 1998,175:203-210.
19. 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.* 1990,58:2516-2522.
20. Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K. **Extraction of Cholesterol with Methyl-beta -Cyclodextrin Perturbs Formation of Clathrin-coated Endocytic Vesicles.** *Mol. Biol. Cell* 1999,10:961-974.
21. Pucadyil TJ, Tewary P, Madhubala R, Chattopadhyay A. **Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: implications in leishmaniasis.** *Molecular and Biochemical Parasitology* 2004,133:145-152.
22. Petty HR, Todd I, Robert F. **Integrins as promiscuous signal transduction devices.** *Immunology Today* 1996,17:209-212.
23. Zhou M, Brown E. **CR3 (Mac-1, alpha M beta 2, CD11b/CD18) and Fc gamma RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc gamma RIII and tyrosine phosphorylation.** *J. Cell Biol.* 1994,125:1407-1416.
24. Stockinger H. **Interaction of GPI-anchored cell surface proteins and complement receptor type 3.** *Exp Clin Immunogenet.* 1997,14:5-10.
25. Todd RF, 3rd, Petty HR. **Beta 2 (CD11/CD18) integrins can serve as signaling partners for other leukocyte receptors.** *J Lab Clin Med.* 1997,129:492-498.
26. Naroeni A, Porte F. **Role of Cholesterol and the Ganglioside GM1 in Entry and Short-Term Survival of *Brucella suis* in Murine Macrophages.** *Infect Immun.* 2002,70:1640-1644.
27. Shin JS, Abraham SN. **Caveolae as portals of entry for microbes.** *Microbes Infect.* 2001,3:755-761.
28. Shin JS, Abraham SN. **Co-option of endocytic functions of cellular caveolae by pathogens.** *Immunology.* 2001,102:2-7.
29. N'Diaye E-N, Darzacq X, Astarie-Dequeker C, Daffe M, Calafat J, Maridonneau-Parini I. **Fusion of azurophil granules with phagosomes and activation of the tyrosine kinase Hck are specifically inhibited during phagocytosis of *Mycobacteria* by human neutrophils.** *J Immunol* 1998,161:4983-4991.
30. Galli JI, Goldstein IM, Snyderman R. **Inflammation: Basic principles and clinical correlates.** 2nd Ed Raven Press, New York 1992.
31. Tapper H. **The secretion of preformed granules by macrophages and neutrophils.** *J Leukoc Biol* 1996,59:613-622.

32. Tapper H, Grinstein S. **Fc receptor-triggered insertion of secretory granules into the plasma membrane of human neutrophils: selective retrieval during phagocytosis.** *J Immunol.* 1997,159:409-418.
33. Suzaki E, Kobayashi H, Kodama Y, Masujima T, Terakawa S. **Video-rate dynamics of exocytotic events associated with phagocytosis in neutrophils.** *Cell Motil Cytoskeleton.* 1997,38:215-228.
34. 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.* 1992,60:3303-3308.
35. 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.* 1990,61:1375-1382.
36. Zarewych D, Kindzelskii A, Todd R, 3rd, Petty H. **LPS induces CD14 association with complement receptor type 3, which is reversed by neutrophil adhesion.** *J Immunol* 1996,156:430-433.
37. Zhou M, Todd R, 3d, van de Winkel J, Petty H. **Cocapping of the leukoadhesin molecules complement receptor type 3 and lymphocyte function-associated antigen-1 with Fc gamma receptor III on human neutrophils. Possible role of lectin-like interactions.** *J Immunol* 1993,150:3030-3041.
38. Sitrin RG, Johnson DR, Pan PM, Harsh DM, Huang J, Petty HR, Blackwood RA. **Lipid Raft Compartmentalization of Urokinase Receptor Signaling in Human Neutrophils.** *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2004,30:233-241.
39. Huang JB, Takeda Y, Araki Y, Sendo F, Petty HR. **Molecular proximity of complement receptor type 3 (CR3) and the glycosylphosphatidylinositol-linked protein GPI-80 on neutrophils: effects of cell adherence, exogenous saccharides, and lipid raft disrupting agents.** *Mol Immunol.* 2004,40:1249-1256.
40. Min Wang GH. **Lipid raft-dependent uptake, signalling and intracellular fate of *Porphyromonas gingivalis* in mouse macrophages.** *Cellular Microbiology* 2008,10:2029-2042.
41. de Chastellier C, Thilo L. **Cholesterol depletion in *Mycobacterium avium*-infected macrophages overcomes the block in phagosome maturation and leads to the reversible sequestration of viable mycobacteria in phagolysosome-derived autophagic vacuoles.** *Cell Microbiol* 2006,8:242-256.
42. Norkin LC, Wolfrom SA, Stuart ES. **Association of Caveolin with *Chlamydia trachomatis* Inclusions at Early and Late Stages of Infection.** *Experimental Cell Research* 2001,266:229-238.





## CAPÍTULO 5

***B. pertussis* es capaz de duplicarse en macrófagos humanos lo que la convierte en un patógeno intracelular facultativo y a éste tipo celular en un posible nicho de persistencia**



## CAPÍTULO 5

5. *B. pertussis* es capaz de duplicarse en macrófagos humanos lo que la convierte en un patógeno intracelular facultativo y a éste tipo celular en un posible nicho de persistencia.

### 5.1. Introducción

Durante el curso normal de una infección respiratoria, tanto neutrófilos como macrófagos son reclutados de la sangre al sitio de infección. Estas células fagocitan y degradan los microorganismos invasores constituyendo un elemento importante de la inmunidad innata. Mediante el procesamiento de microorganismos dentro de sus compartimientos intracelulares, los macrófagos presentan a su vez antígenos a los linfocitos T promoviendo la inmunidad adaptativa. Estudios realizados *in vitro* y utilizando ratones knockout sugieren que la inmunidad celular juega un rol importante en la eliminación de *B. pertussis* [1-5] y que el INF- $\gamma$  participa activamente en este proceso [6-9]. Aunque esta respuesta es típicamente desarrollada para combatir patógenos intracelulares [10], *B. pertussis* no es considerada un patógeno invasivo y no ha podido ser demostrado hasta el momento que *B. pertussis* presente un estadio intracelular durante el período infeccioso. Los resultados mostrados en el Capítulo 3 indican, sin embargo, que *B. pertussis* es capaz de ingresar a las células epiteliales y sobrevivir durante períodos relativamente prolongados en este tipo celular, evadiendo la respuesta inmune y permitiendo, probablemente, la infección de otras células. A su vez, se ha demostrado que, en ausencia de anticuerpos, *B. pertussis* es capaz de evadir la acción bactericida de los neutrófilos (Capítulo 4) facilitando su permanencia en el tracto respiratorio. Una serie de evidencias parecen indicar que la infección con *B. pertussis* conlleva también a una alteración de la función efectora del macrófago. En un estudio realizado *in vitro* se ha encontrado que, en ausencia de anticuerpos, *B. pertussis* es capaz de sobrevivir por varios días dentro de estas células inmunes [11] lo cual ha sido parcialmente confirmado *in vivo*. En estudios llevado a cabo utilizando modelos de infección animal 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 [12, 13]. Por otro lado, *B. pertussis* ha sido hallada en macrófagos alveolares de niños coinfectados con el virus de inmunodeficiencia humana [14] y en infantes en los cuales se ha confirmado neumonía provocada por *B. pertussis* [15]. Estos hallazgos podrían indicar que los macrófagos constituyen en sí mismos nichos de persistencia intracelular lo que podría explicar datos clínicos y epidemiológicos bien documentados pero escasamente comprendidos así como la necesidad de una respuesta celular para combatir la infección.

Los estudios de interacción de *B. pertussis* con macrófagos han estado principalmente enfocados en la caracterización de las adhesinas y los receptores involucrados en la adhesión de esta bacteria a estas células inmunes [16-19]. Sin embargo, poco se conoce respecto al destino final de la bacteria una vez fagocitada. En el Capítulo anterior hemos mostrado que *B. pertussis* es capaz de sobrevivir a la acción bactericida de los neutrófilos evadiendo su fusión con lisosomas cuando es internalizada en ausencia de anticuerpos opsonizantes. Estos hallazgos sugieren que *B. pertussis* ha desarrollado mecanismos que le permiten evadir la biogénesis del fagolisosoma. Sin embargo, dada su corta vida media, es muy poco probable que estas células puedan constituir reservorios prolongados de esta bacteria. Los fagocitos mononucleares, en cambio, en virtud de su alta capacidad fagocítica y su larga vida media (meses) funcionan como nicho de persistencia de una gran variedad de patógenos intracelulares.

En este capítulo se describen estudios que intentan caracterizar la interacción de *B. pertussis* con macrófagos humanos, en particular, el tráfico intracelular de la misma una vez fagocitada y la capacidad de *B. pertussis* de persistir en este tipo celular.

## 5.2. Materiales y métodos

### 5.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Para la realización de este estudio se utilizaron la cepa salvaje *B. pertussis* Tohama I y la cepa BPM3183, una mutante defectiva en la expresión de ACT derivada de Tohama I [20], transformadas con el plásmido pCW505 (provisto gentilmente por Dr. Weiss, Cincinnati, Ohio) que induce la expresión citoplasmática de la proteína fluorescente verde GFP (Green Fluorescent Protein) sin alterar el crecimiento o la expresión de antígenos [21]. Las bacterias fueron cultivadas en placas de Agar Bordet Gengou (DIFCO Laboratories, USA), suplementada con 15 % v/v de sangre desfibrinada de carnero (ABGs), durante 72 hs a 37 °C. Al cabo de este tiempo se repicó en una nueva placa ABGs y se cultivó a 37 °C durante 24 hs.

### 5.2.2. Anticuerpos y sueros

Los siguientes anticuerpos fueron utilizados en este ensayo: mAc de ratón anti-proteína lisosomal asociada a membrana (LAMP-1) (Pharmingen, San Diego, CA, USA), mAc de ratón anti-Rab5 humana (Pharmingen, San Diego, CA, USA). Fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con CY3 (Molecular Probes, OR, USA), fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con CY3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) y fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA).

También fueron utilizadas fracciones de IgG obtenidas a partir de un pool de sueros de pacientes con elevado título contra *B. pertussis*, según se determinó por ELISA [22], obtenida como se describe en Rodríguez *et al.* [23] y suero de conejo anti-*B. pertussis* obtenido según se describe en Hellwig *et al.* [13].

### 5.2.3. Citometría de flujo

Los anticuerpos monoclonales anti-CD14, anti-CD206 y anti-HLA-DR conjugados con FITC; anti-CD11c conjugado con APC, anti-CD11b conjugado con PE

y anti CD1a conjugado con PE Cy5 y sus respectivos controles de isotipo fueron obtenidos de BD Biosciences. GFP-*B. pertussis* o *B. pertussis* marcada con suero de conejo anti-*B. pertussis* seguido de la incubación con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con CY3, fue utilizada en experimentos diseñados para evaluar el fenotipo de las células infectadas. Luego de la tinción las células fueron lavadas y fijadas con paraformaldehído 3 % p/v. El nivel de fluorescencia fue determinado utilizando citometría de flujo (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA) 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 CellQuest (BD Biosciences).

#### 5.2.4. Aislamiento de macrófagos

Las células mononucleares humanas de sangre periférica (PBMC) fueron obtenidas a partir de donantes voluntarios mediante gradiente de centrifugación en Ficoll-Paque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) según ha sido previamente descrito [24]. Las células mononucleares fueron lavadas y resuspendidas en DMEM conteniendo 10 % v/v de suero humano inactivado por calor (SH). Esta capa se encuentra enriquecida en monocitos y linfocitos, para eliminar estos últimos, las células fueron colocadas en placas de 6 pocillos de 2 cm de diámetro cada uno ( $1 \times 10^7$  células/pocillo) en los cuales se colocó, previo al agregado de las células, un cubreobjeto cuadrado de vidrio de 20 mm. Las células se incubaron durante 2 hs a 37 °C en 5 % CO<sub>2</sub>. Las células no adheridas (linfocitos) fueron removidas mediante tres lavados en DMEM-SH 10 % v/v y finalmente los macrófagos adheridos fueron cultivados durante 6 días en DMEM-SH 10 % v/v previo al agregado de *B. pertussis*.

En determinados experimentos los monocitos humanos fueron aislados a partir de PBMCs mediante centrifugación en gradiente de Percoll.

#### 5.2.5. Ensayos de infección

Los macrófagos se lavaron con DMEM-BSA 0.2 % p/v (DMEM-BSA) previo a la infección con GFP-*B. pertussis* suspendida en DMEM-BSA (R<sub>b</sub>/c 20 ó 50). El inóculo bacteriano fue cuantificado mediante recuento en placas ABGs. Para facilitar la interacción entre las bacterias y los macrófagos, las células fueron centrifugadas durante

5 min a 640 x g. Posteriormente los macrófagos fueron incubados durante 20 min a 37 °C con 5 % CO<sub>2</sub>, y lavados para eliminar las bacterias no adheridas. A menos que se especifique lo contrario, luego de estos lavados las células fueron incubadas durante 1 h a 37 °C con sulfato de polimixina B (100 µg/ml) (Sigma), un antibiótico que no puede penetrar en las células eucariotas [25], para eliminar aquellas bacterias que no fueron removidas durante los lavados. Posteriormente la concentración de antibiótico fue reducida a 5 µg/ml. A determinados tiempos (2, 24, y 48 hs post-infección) los macrófagos se lavaron y la sobrevivencia bacteriana se determinó según se detalla a continuación. Macrófagos infectados fueron levantados mecánicamente y la muestra se dividió en dos alícuotas, una de ellas se utilizó para determinar el número de células inmunes viables mediante tinción con Trypan blue; la otra alícuota fue centrifugada a 800 x g y lisada con saponina 0,1 % p/v en agua destilada durante 30 min a 4 °C. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en agua destilada las cuales fueron plaqueadas en placas ABGs para determinar el número de UFC.

En experimentos control se evaluó la actividad bactericida del antibiótico. Brevemente, muestras de  $5 \times 10^7$  bacterias fueron incubadas con 1 ml de polimixina B (100 µg/ml) durante 1 h a 37 °C, lavadas y plaqueadas en placas ABGs. El tratamiento determinó una disminución del 99,999 % de UFC. Paralelamente se determinó el número de UFC en los sobrenadantes de los cultivos celulares a diferentes tiempos post-infección (2 hs, 24 hs y 48 hs postinfección) no detectándose bacterias viables en ninguno de estos tiempos.

En determinados experimentos, GFP-*B. pertussis* fue opsonizada con IgG humana (200 µg/mL) durante 30 min a 37 °C previo a la incubación con los macrófagos (R<sub>i</sub>b/c de 20).

#### 5.2.6. Cuantificación de la fagocitosis

GFP-*B. pertussis* opsonizada con IgG o no opsonizada fueron suspendidas en DMEM-BSA e incubadas con macrófagos (R<sub>i</sub>b/c de 20), según fue detallado anteriormente. Luego de 20 min de incubación a 37 °C las bacterias no adheridas fueron removidas mediante la realización de tres lavados previos a la fijación con paraformaldehído al 3 % p/v. El número de bacterias adheridas y fagocitadas fue estimado mediante microcopia de fluorescencia. Para ello, las bacterias adheridas a la

superficie celular fueron detectadas mediante anticuerpos policlonales de conejo anti-*B. pertussis* (30 min a 4 °C) a los que se detectó por incubación con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con CY3 (30 min a 4 °C). En experimentos realizados con *B. pertussis* opsonizada con IgG las bacterias unidas a la superficie fueron detectadas por incubación con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con CY3 (30 min a 4 °C). Para evitar el pegado inespecífico de los anticuerpos a los receptores FcγR, todas las incubaciones fueron realizadas en presencia de 25 % v/v de suero normal humano inactivado por calor. Las muestras fueron analizadas mediante microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio DMLB acoplado a una cámara DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Switzerland). El número de bacterias extracelulares (rojas y verdes) e intracelulares (verdes) fue evaluado mediante el recuento de al menos 100 macrófagos por preparado. Todos los experimentos fueron realizados al menos tres veces por triplicado utilizando macrófagos de diferentes donantes.

### 5.2.7. Microscopía confocal

Los estudios de colocalización fueron realizados como ha sido descrito anteriormente [23], con algunas modificaciones. En forma breve, macrófagos incubados con GFP-*B. pertussis* durante 20 min a 37 °C fueron lavados para remover bacterias no adheridas y posteriormente incubados con LysoTracker DND-99 (Molecular Probes) (5 min a 37 °C) previo a ser fijados con paraformaldehído, o con 100 µg/ml de polimixina B durante 1 h a 37 °C para estudios de colocalización a tiempos mayores. A las 2, 24 o 48 hs postinfección algunos macrófagos fueron incubados con LysoTracker previo a su fijación y otros fueron directamente fijados. Aquellas muestras que no fueron teñidas con LysoTracker fueron lavadas, incubadas durante 10 min con NH<sub>4</sub>Cl 50 mM y tratadas con saponina 0,1 % p/v (Sigma) y BSA 0,5 % p/v en PBS durante 30 min. Posteriormente se realizó la incubación con anticuerpos monoclonales anti-LAMP-1 (1:500) o anti-Rab5 (1:20) en presencia de saponina-BSA. Luego de tres lavados, los macrófagos fueron incubados con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con CY3. Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos todas las incubaciones fueron realizadas en presencia de 25 % v/v de suero humano inactivado por calor. En determinadas ocasiones, debido a un decaimiento en la



fluorescencia de la proteína GFP, las bacterias fueron teñidas con anticuerpo policlonal de conejo anti-*B. pertussis* seguido por incubación con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC.

Las muestras fueron analizadas en un microscopio láser confocal marca Olympus FV 300. El porcentaje de bacterias contenidas en fagosomas que colocalizan con una marca determinada fue calculado mediante la observación de la menos 50 fagosomas por donante.

#### 5.2.8. Estudios de adquisición de transferrina humana

Los estudios fueron realizados según se ha descrito anteriormente [26] con modificaciones menores. Brevemente, los macrófagos infectados fueron deplecionados de transferrina mediante la incubación con DMEM-BSA 1 % p/v durante 1 h a 37 °C. Transcurrido ese tiempo fueron incubados con 10 µg/ml de transferrina marcada con Alexa-594 (Moléculas Probes) durante 10 min a 4 °C en medio DMEM con BSA 1 % p/v para permitir la adhesión de la transferrina. Luego fueron incubados a 37 °C durante 5 min para que el ligando sea internalizado y posteriormente lavados con DMEM-BSA 1 % p/v. Finalmente fueron incubados durante 45 min a 37 °C y fijados para ser observados por microscopía confocal (Olympus FV 300, Japan). El porcentaje de bacterias que colocalizan con transferrina fue calculado mediante la observación de la menos 50 fagosomas conteniendo bacterias en cada experimento.

#### 5.2.9. Microscopía electrónica de transmisión

Macrófagos infectados con *B. pertussis* (R<sub>i</sub>b/c 20) durante 20 min a 37 °C fueron lavados, tratados con polimixina B e incubados durante 48 hs a 37 °C. Posteriormente las células fueron tratadas con glutaraldehído al 2 % v/v en PBS durante 2 hs a 4 °C. Las muestras fueron postfijadas con 1% de tetróxido de osmio, deshidratadas con concentraciones crecientes de etanol y embebidas en parafina. Las secciones se obtuvieron utilizando un micrótopo de 5 µm de espesor, se colorearon con hematoxilina-eosina y se observaron en un microscopio de transmisión electrónica marca Philips EM 301.

#### 5.2.10. Análisis estadístico

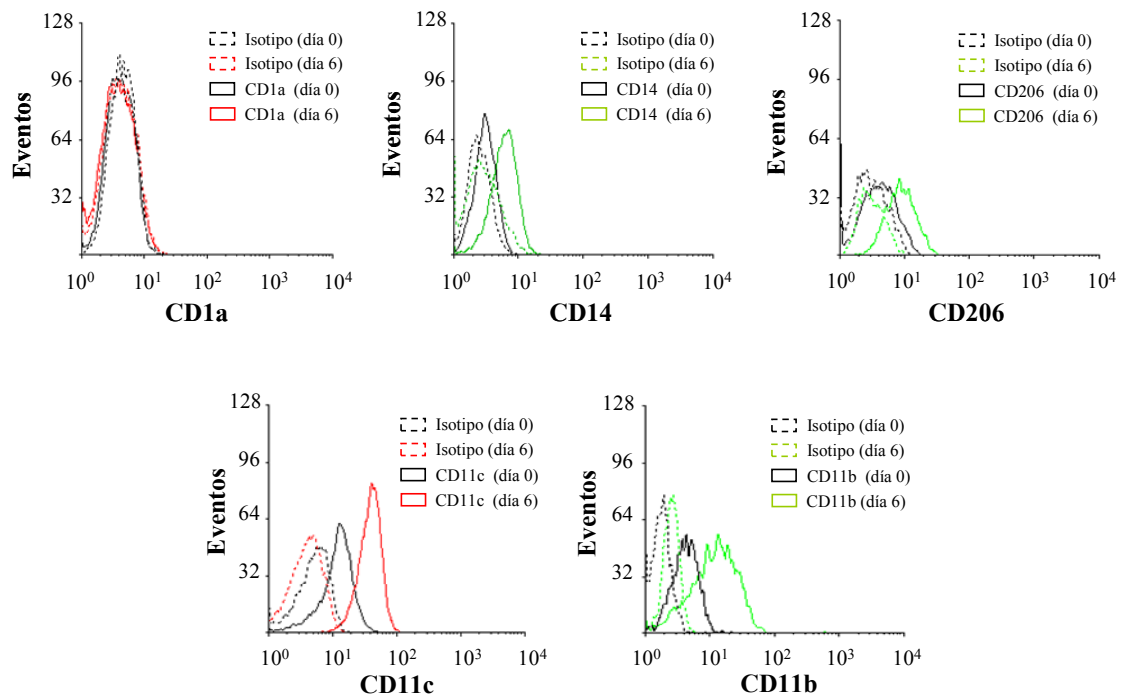
Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación de los valores obtenidos (medias) se utilizó el test de Menor Diferencia Significativa (LSD) con un grado de significación (P) de 0.05.

### 5.3. Resultados

#### 5.3.1. Estudio de la sobrevivencia de *B. pertussis* en macrófagos humanos

En el capítulo anterior se demostró que en ausencia de anticuerpos opsonizantes *B. pertussis* sobrevive a la acción bactericida de los neutrófilos. Sin embargo, la corta vida media de estas células las hace poco propicias para el establecimiento de un reservorio intracelular. Debido a ello, se estudió la interacción de *B. pertussis* con macrófagos humanos, los cuales, debido a su larga vida media, constituyen el hábitat de muchas bacterias intracelulares facultativas y constitutivas.

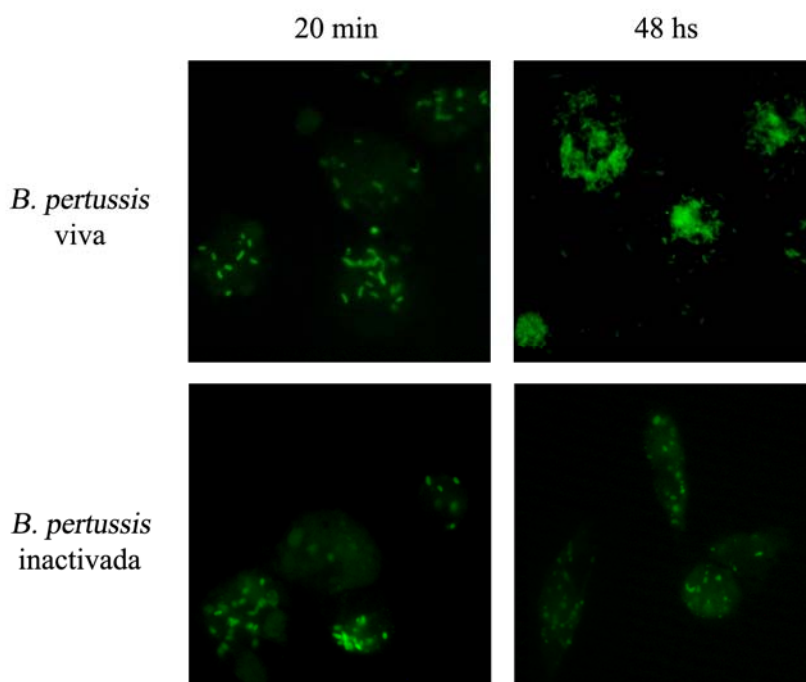
En una primera etapa se evaluó el estado de diferenciación de los monocitos aislados de sangre periférica humana luego de 6 días de incubación en DMEM-10 % v/v SH. Comparados con los monocitos recientemente aislados (día 0) se observa un incremento en la expresión de CD14, CD11c, CD11b y CD206, manteniéndose CD1a negativos, indicando que los mismos han adquirido características de macrófagos.



**Figura 1. Expresión de receptores en monocitos y monocitos diferenciados a macrófagos.** PBMC obtenidos de sangre periférica fueron fijados con PFA (día 0) o incubados durante 6 días en medio DMEM + SH 10 % v/v en placas de polipropileno (día 6). Estos últimos fueron levantados y tratados con

PFA. La expresión de CD1a, CD14, CD206, CD11c y CD11b fue evaluada en ambas muestras mediante citometría de flujo.

Como primer paso para estudiar la interacción de *B. pertussis* con los macrófagos, se realizó un experimento que permitió evaluar la evolución de la infección en los macrófagos a lo largo del tiempo. Para ello, los macrófagos fueron incubados con *B. pertussis* ( $R_{i,b/c}$  50) durante 20 min, lavados extensivamente para eliminar la mayor parte de las bacterias no adheridas, y posteriormente incubados durante 48 hs más a 37 °C. En la Figura 2 puede observarse que se produce un aumento considerable en la carga bacteriana luego de 48 hs post-infección lo cual podría significar entre otras cosas, que hay duplicación intracelular de las bacterias, o que a pesar de los lavados hay bacterias en el entorno de la célula que siguen siendo fagocitadas durante las 48 horas de incubación, etc. Para poder interpretar mejor estos resultados se diseñaron una serie de

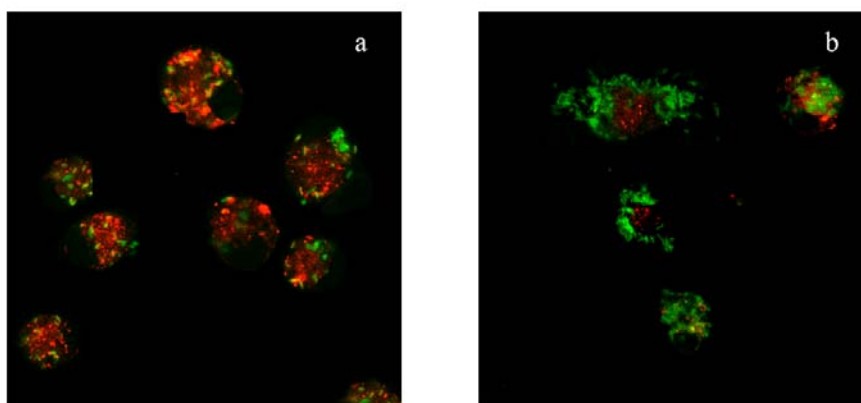


**Figura 2. Interacción de *B. pertussis* con macrófagos humanos a lo largo del tiempo.** Macrófagos infectados con GFP-*B. pertussis* vivas (paneles superiores) o GFP-*B. pertussis* inactivadas con formaldehído (paneles inferiores) durante 20 min a 37 °C fueron extensivamente lavados e incubados durante 2 hs o 48 hs a 37 °C. Posteriormente se fijaron y se observaron en microscopio de fluorescencia. Se muestran imágenes representativas de dos experimentos independientes.

experimentos que se detallan a continuación. En primer lugar, para estudiar si este efecto depende de la viabilidad de la bacteria, se investigó la interacción de *B. pertussis*

previamente inactivada con formalina con los macrófagos. La infección con bacterias inactivadas no alteró el nivel de adhesión inicial de *B. pertussis*. Sin embargo luego de 48 hs no se observó un incremento en el número de bacterias asociadas a la célula sugiriendo que el aumento en la carga bacteriana luego de 48 hs post-infección es un fenómeno dependiente de la viabilidad de *B. pertussis*.

En estudios de colocalización con LysoTracker, un colorante ácido trófico que se concentra en compartimientos de elevada acidez como los lisosomas, se observó que a medida que el tiempo progresaba el número de bacterias colocalizando con este marcador disminuía significativamente (Fig. 3).



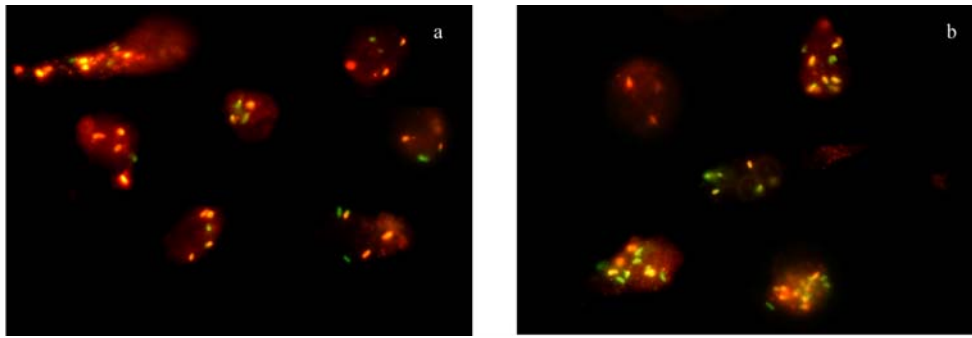
**Figura 3. Estudios de colocalización con LysoTracker de macrófagos infectados con GFP-*B. pertussis* durante 2 o 48 hs.** GFP-*B. pertussis* fue incubada con macrófagos humanos (R<sub>i</sub>b/c 50) durante 20 min a 37 °C. Luego de una serie de lavados los macrófagos fueron incubados durante 2 hs (panel a) o 48 hs (panel b) en DMEM-SH 10% y posteriormente teñidos con la marca ácido trófica LysoTracker. Se muestran imágenes representativas de dos experimentos independientes.

Con el fin de determinar si el aumento en el número de bacterias a las 48 hs post-infección puede deberse en parte a la replicación de las bacterias en el medio extracelular y su posterior fagocitosis se evaluó si *B. pertussis* es capaz de crecer en medio DMEM-SH 10 % v/v. Los resultados indican que *B. pertussis* no solo es incapaz de replicar en medio DMEM-SH 10 % v/v sino que el número de bacterias viables se reduce al 0,9 % del inóculo inicial luego de 48 hs de incubación a 37 °C, por lo tanto, el incremento en el número de bacterias por macrófago a lo largo del tiempo puede deberse a una replicación intracelular o bien, aunque menos probable, a la fagocitosis de

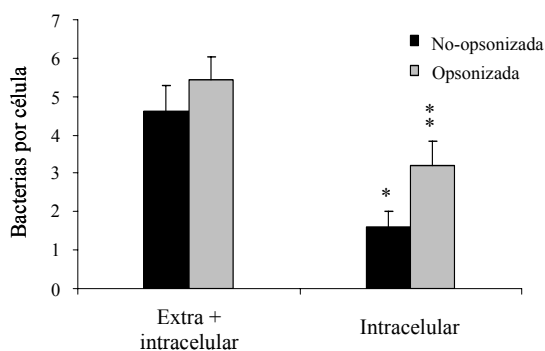
bacterias que quedan retenidas en las proximidades de las células a pesar de los extensivos lavados.

Para evaluar la posibilidad de que realmente se trate de duplicación intracelular, algo que determinaría un cambio muy significativo en la forma de entender la patogénesis de esta bacteria, los ensayos de interacción bacteria-macrófago fueron realizados utilizando un protocolo diferente que involucra la determinación de bacterias intracelulares viables a diferentes tiempos entre otras modificaciones. Para ello, en primer lugar, se redujo la multiplicidad de infección a 20 lo cual permitió examinar fagosomas conteniendo una única bacteria. Por otro lado, se sincronizó el contacto bacteria-célula mediante la centrifugación a bajas velocidades. Los macrófagos infectados fueron luego incubados durante 20 min a 37 °C para permitir que las bacterias sean fagocitadas, lavados varias veces para eliminar bacterias no adheridas e incubados con polimixina B para inactivar bacterias extracelulares y promover en gran medida su remoción. De esta forma, el número de bacterias viables determinado a diferentes tiempos post-infección permitió evaluar la evolución del número de bacterias intracelulares viables a lo largo del tiempo. En forma paralela se determinó el porcentaje de bacterias fagocitadas previo al agregado de polimixina B (Fig. 4A y B), lo cual nos permitió determinar el número de bacterias sobrevivientes respecto al número de bacterias fagocitadas. Los resultados muestran que aproximadamente el 35 % de las bacterias asociadas al macrófago son fagocitadas luego de 20 min de incubación (Fig. 4A y B), y que el  $70 \pm 15$  % de las bacterias fagocitadas son eliminadas luego de dos horas de infección, según pudo ser determinado mediante recuento de UFC (Fig. 4B y C) post-tratamiento con polimixina B. A las 24 hs post-infección no se observó un incremento en el número de bacterias intracelulares viables. Sin embargo, luego de 48 hs se observó un drástico aumento en el número de UFC (7 veces mayor) (Fig. 4C) sugiriendo que *B. pertussis* es capaz de replicar dentro del macrófago luego de un período aparente de latencia de aproximadamente 24-30 hs. En experimentos control se evaluó el nivel de expresión de CD14, CD11c, CD11b, CD206, y CD1a de células infectadas con *B. pertussis* a las 48 hs post-infección, los resultados indican que estas células conservaron el fenotipo característico de los macrófagos, esto es CD14+, CD1a-, CD11c+, CD11b+, y CD206+.

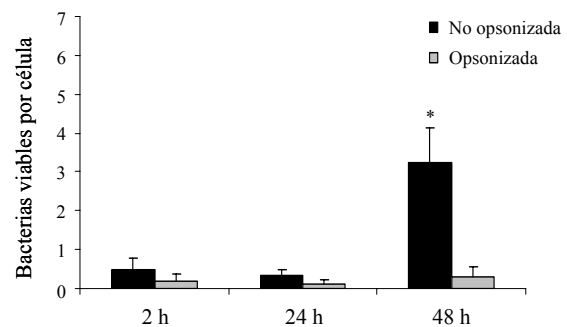
A



B



C



**Figura 4. Fagocitosis y sobrevivencia de *B. pertussis* en macrófagos humanos.** A y B) GFP-*B. pertussis* no opsonizada u opsonizada con IgG fueron incubadas con macrófagos humanos (R<sub>i</sub>b/c 20) durante 20 min a 37 °C, posteriormente 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. En el panel A se muestran imágenes representativas de *B. pertussis* no opsonizada (a) y *B. pertussis* opsonizada con IgG (b). En el panel B están representados los valores medios  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. El número de bacterias no opsonizadas intracelulares difiere significativamente del número de bacterias opsonizadas con IgG intracelulares (\* $P < 0.05$ ). Por otro lado, el número de bacterias intracelulares opsonizadas con IgG difiere significativamente del número de bacterias extra+intracelulares de *B. pertussis* opsonizada y no opsonizada (\*\* $P < 0.05$ ). C) Macrófagos incubados con GFP-*B. pertussis* (R<sub>i</sub>b/c 20) durante 20 min a 37 °C fueron lavados y tratados con polimixina B. El número de UFC fue determinado a diferentes 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  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. El número de bacterias no opsonizadas viables a las 48 hs difiere significativamente del número de bacterias opsonizadas y no opsonizadas viables a las 2 hs y 24 hs post-infección y del número de bacterias opsonizadas viables a las 48 hs post-infección (\* $P < 0.05$ ).

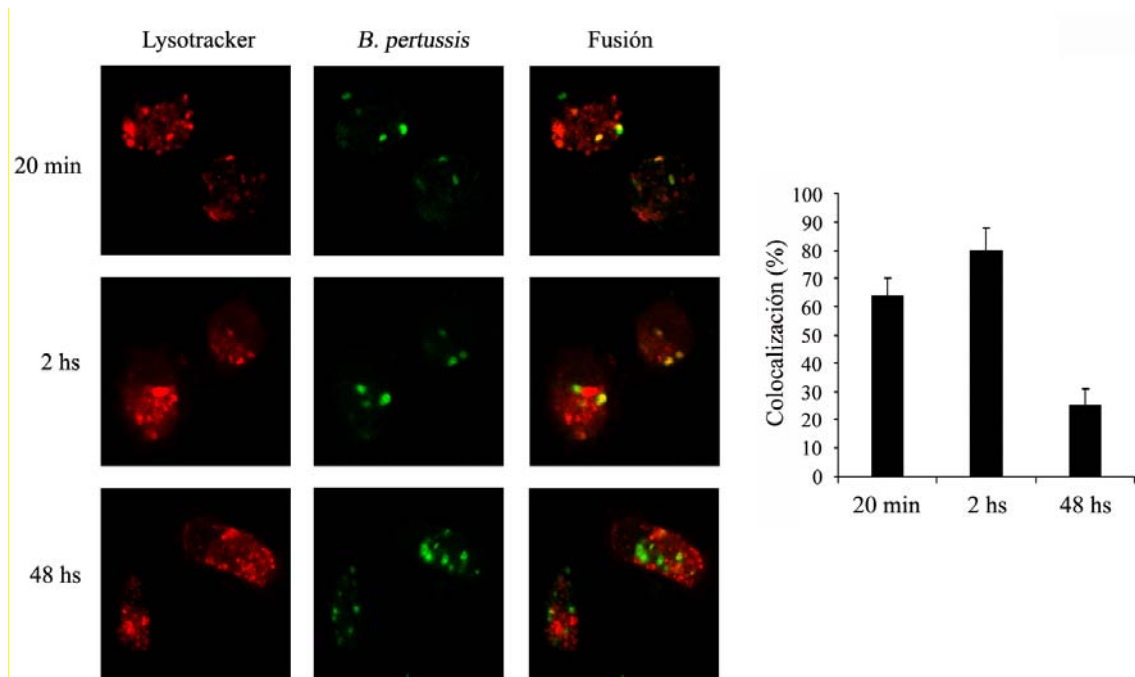
En el Capítulo anterior se ha demostrado que la opsonización de *B. pertussis* con IgG humana determina un aumento en la fagocitosis y la inactivación de la bacteria en compartimientos lisosomales. Efectos similares han sido observados en este estudio utilizando macrófagos. En la Figura 4B se puede observar que la presencia de anticuerpos específicos determina un aumento en el número de bacterias fagocitadas,

que son posteriormente eliminadas a las 2 hs post-infección (alrededor del  $94 \pm 5$  % de las bacterias fagocitadas son eliminadas) (Fig. 4B y C). Resulta importante destacar que, tal como se observa en la Figura 4C, bajo condiciones opsonizantes el número de bacterias viables dentro del macrófago no varió durante las 48 hs de infección.

### 5.3.2. Tráfico intracelular de *B. pertussis*

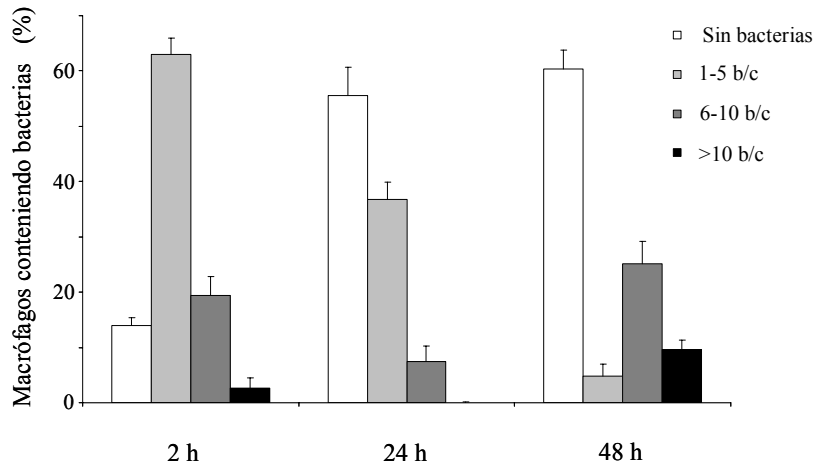
Para comprender los eventos involucrados en la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* y su eventual replicación se estudió el tráfico intracelular de *B. pertussis* y la localización de la misma a diferentes tiempos post-infección mediante microscopía confocal usando diferentes marcadores de la vía endocítica. En primer lugar se evaluó la colocalización de *B. pertussis* con LysoTracker (marcador de compartimientos lisosomales). Los resultados muestran que en ausencia de anticuerpos opsonizantes el  $64 \pm 6$  % de las bacterias que interaccionan con macrófagos se encuentra colocalizando con LysoTracker luego de 20 min de infección (Fig. 5). A las 2 hs el número de bacterias colocalizando con este marcador alcanza el  $80 \pm 8$  % demostrando que la fusión de los fagosomas bacterianos con los lisosomas ocurre durante los primeros estadios de la infección (Fig. 5). Estos resultados están de acuerdo con el bajo número de bacterias internalizadas que permanecen viables luego de 2 hs de infección observado en la Figura 4, indicando que aquellas bacterias cuyos fagosomas maduran a fagolisosomas son destruidas. Sin embargo, al analizar lo que ocurre a las 48 hs post-infección se observa que la mayoría de las vacuolas que contienen *B. pertussis* son LysoTracker negativas (solo el  $25 \pm 6$  % de las bacterias colocalizan con LysoTracker) (Fig. 5). Esta disminución en la colocalización con estructuras lisosomales coincide con el aumento en el número de bacterias intracelulares viables a las 48 hs (Fig. 4C) sugiriendo que aquellas bacterias que inicialmente escaparon de la fusión con lisosomas y sobrevivieron probablemente se hayan replicado permaneciendo en compartimientos no ácidos. Para evaluar esta posibilidad se determinó el nivel global de infección de los





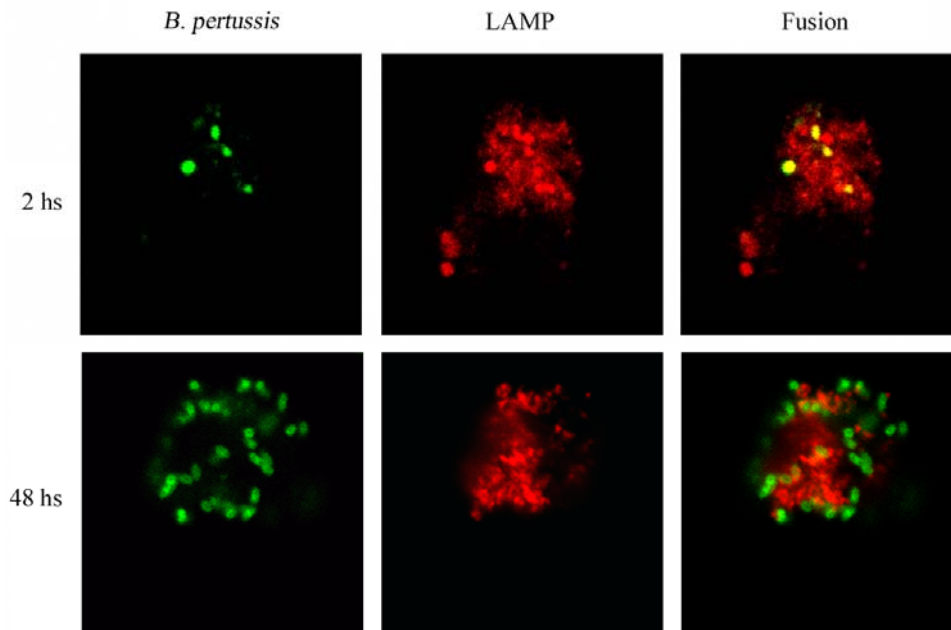
**Figura 5. Colocalización de *B. pertussis* con Lysotracker.** *B. pertussis* expresando GFP fue incubada con macrófagos humanos (R<sub>1</sub>b/c 20) durante 20 min a 37 °C. Luego de una serie de lavados los macrófagos fueron incubados con Lysotracker (panel a) o tratados con polimixina B (100 µg/ml) durante 1 h, lavados y posteriormente incubados durante 2 o 48 hs en DMEM-SFB 10%-polimixina B (5 µg/ml). A las 2 o 48 hs los macrófagos fueron incubados con Lysotracker durante 5 min, fijados y observados en microscopio confocal. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes.

macrófagos a distintos tiempos. En la Figura 6 se observa que luego de 2 hs de infección la mayoría de los macrófagos contienen entre 1 y 5 bacterias. A las 24 hs se observa un incremento en el número de macrófagos no infectados sugiriendo que algunos macrófagos lograron eliminar la bacteria una vez infectados. Sin embargo, luego de 48 hs de infección el porcentaje de macrófagos conteniendo más de 10 bacterias aumenta significativamente, mientras que el número de macrófagos conteniendo 1 a 5 bacterias disminuye. Estos resultados avalan la hipótesis de que aunque la mayoría de las bacterias fagocitadas son destruidas por los macrófagos en las primeras horas de infección, una fracción de estas bacterias son capaces de sobrevivir a la acción bactericida de los mismos evadiendo su fusión con lisosomas y permaneciendo en compartimientos no ácidos. Luego de un período de latencia, estas bacterias serían capaces de replicar en estos compartimientos.



**Figura 6. Cuantificación de la carga bacteriana de macrófagos a diferentes tiempos post-infección.** Macrófagos incubados con GFP-*B. pertussis* durante 20 min a 37 °C fueron lavados e incubados con polimixina B para inactivar bacterias extracelulares. A determinados tiempos post-infección las células fueron fijadas y el número de bacterias por célula (b/c) fue evaluado mediante microscopía de fluorescencia. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Al menos 100 macrófagos fueron analizados en cada tiempo determinado.

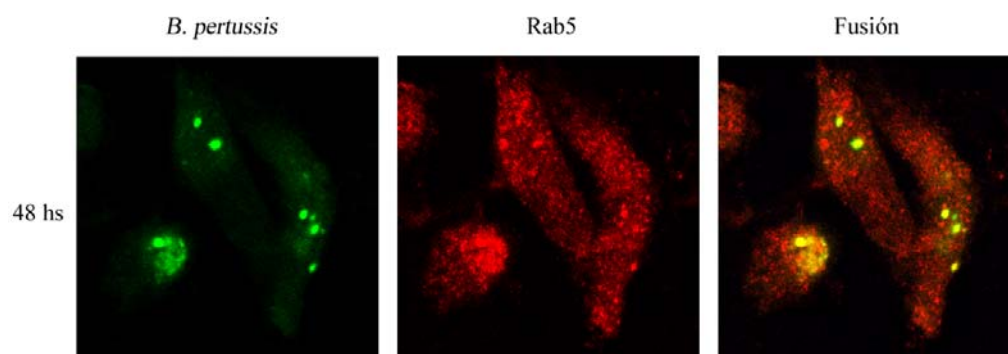
Se investigaron entonces las características de los compartimientos en los cuales *B. pertussis* reside a lo largo del tiempo. En la Figura 7 se observa que mientras a las 2 hs post-infección un alto porcentaje de los fagosomas que contienen *B. pertussis* presentan marcadores de endosomas tardíos y lisosomales (LAMP-1), a las 48 hs sólo el  $13 \pm 5\%$  de los fagosomas colocalizan con LAMP, lo cual está de acuerdo con los porcentajes de bacterias colocalizando con LysoTracker a estos tiempos.



**Figura 7. Colocalización de *B. pertussis* con LAMP-1.** Macrófagos incubados con GFP-*B. pertussis* durante 20 min a 37 °C fueron lavados e incubados con polimixina B para inactivar bacterias

extracelulares. A las 2 y las 48 hs postinfección los macrófagos fueron fijados, permeabilizados e incubados con anticuerpo de ratón anti-LAMP-1 humana seguido de fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos anti IgG de ratón conjugados con CY3. A las 2 hs post-infección el 58 ± 7 % de las bacterias colocalizan con LAMP. A las 48 hs postinfección el porcentaje de colocalización es del 13 ± 5 %. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes.

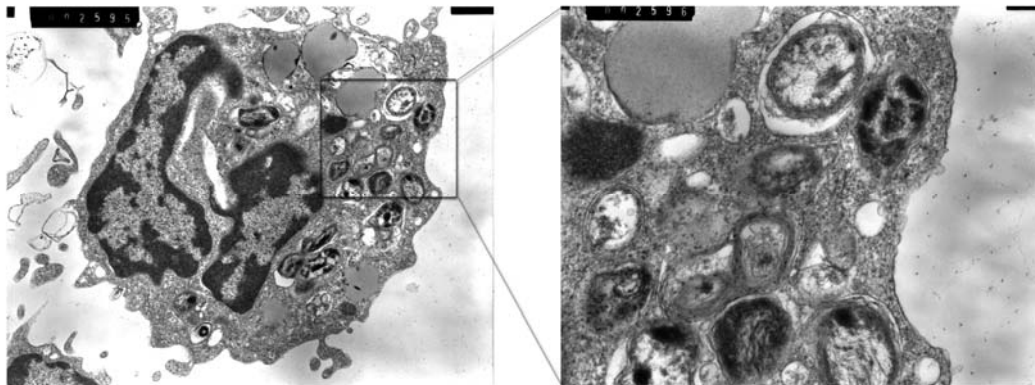
Los resultados anteriores indican que la bacteria sobrevive en compartimientos en los cuales tanto el marcador LAMP-1 como LysoTracker están ausentes, ambos marcadores de endosomas tardíos y lisosomas. Debido a ello, en experimentos posteriores se evaluó el nivel de colocalización con Rab5, un marcador de endosomas tempranos. Los resultados mostrados en la Figura 8 indican que la mayor parte de las bacterias reside en compartimientos Rab5 positivos (71 ± 4 % de colocalización) luego de 48 hs de infección sugiriendo que *B. pertussis* es capaz de sobrevivir y replicar en compartimientos con características de endosomas tempranos.



**Figura 8. Colocalización de *B. pertussis* con Rab5.** Macrófagos incubados con *B. pertussis* expresando GFP durante 20 min a 37 °C fueron lavados e incubados con polimixina B para inactivar bacterias extracelulares. A las 48 hs post-infección los macrófagos fueron fijados e incubados con anticuerpo de ratón anti-Rab5 seguido de fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados con CY3. El 71 ± 4 % de las bacterias colocalizan con Rab5. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes.

Se empleó microscopía electrónica para observar los compartimientos en los cuales se encuentra *B. pertussis* a las 48 post-infección. En la Figura 9 puede observarse que luego de 48 hs de infección la mayor parte de las bacterias se encuentra en fagosomas estrechos, con delgados espacios intrafagosomales y que presentan escasos signos de fusión con otras vesículas intracelulares. En trabajos previos se ha demostrado que fagosomas con estas características tienen una menor capacidad fusogénica y son

comúnmente habitados por patógenos intracelulares obligados o facultativos como *Mycobacterium* y *Brucella* [27, 28].

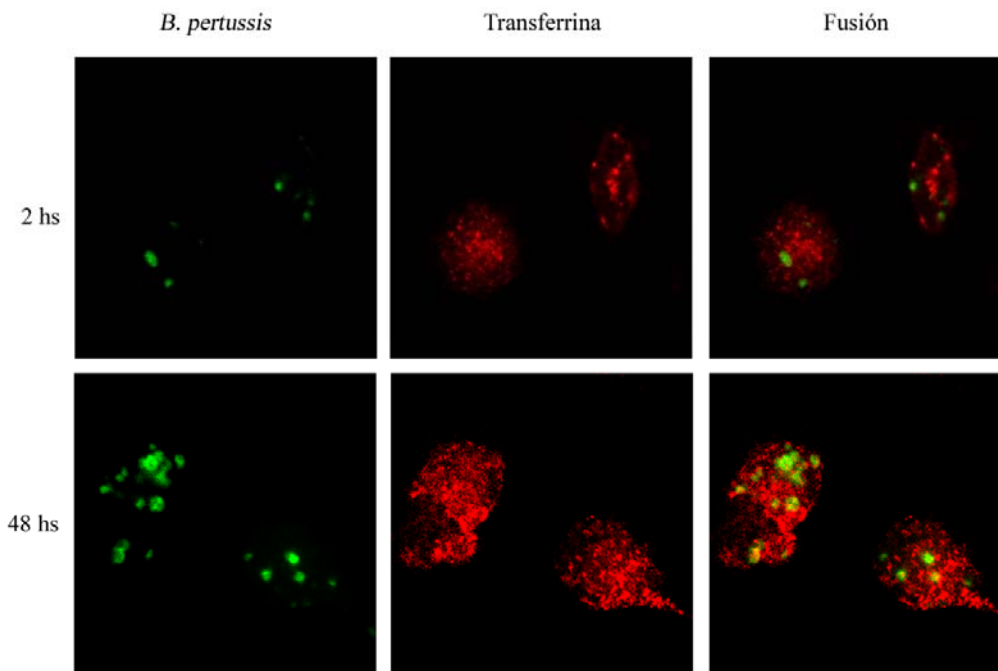


**Figura 9. Microscopía electrónica de macrófagos infectados con *B. pertussis*.** Macrófagos infectados con *B. pertussis* (R<sub>i</sub>b/c 20) durante 20 min a 37 °C fueron lavados, tratados con polimixina B e incubados durante 48 hs a 37 °C. Posteriormente fueron fijados y preparados para ser analizados mediante microscopía electrónica de transmisión. Se observa la presencia de bacterias intracelulares rodeadas de vacuolas estrechas. En algunos casos la vacuola no es visible sugiriendo la existencia de un número limitado de bacterias en el citoplasma. Se muestra una imagen representativa de dos experimentos independientes.

### 5.3.3. Acceso de *B. pertussis* a endosomas de reciclaje

Los resultados anteriores sugieren que *B. pertussis* sobrevive en compartimientos con características de endosomas tempranos, sin embargo, el establecimiento de un nicho intracelular de persistencia requiere no solo que la bacteria sea capaz de resistir la acción bactericida de los macrófagos sino también que sea capaz de acceder a nutrientes esenciales para su sobrevivencia. En este contexto, se investigó si *B. pertussis* tiene acceso a endosomas de reciclaje. Con este fin, macrófagos infectados durante 2 o 48 hs fueron tratados con un pulso de transferrina marcada. Esta molécula ingresa al macrófago saturada de hierro (holotransferrina) a través de la unión con receptores de transferrina localizados en la membrana plasmática, y luego de ser endocitada se fusiona con endosomas tempranos donde la relativamente baja acidez (pH 6,5-6,0) libera al hierro. La transferrina sin hierro (apotransferrina) es reciclada junto con su receptor nuevamente a la membrana plasmática no estando nunca en contacto con compartimientos lisosomales [29]. Los estudios de colocalización con transferrina, por lo tanto, no solo determinan si la bacteria tiene acceso a nutrientes a través de

endosomas de reciclaje sino que también aportan evidencias respecto a la naturaleza temprana de los endosomas en los cuales habita. En la Figura 10 se muestra que mientras a las 2 hs post-infección solo el  $5 \pm 1$  % de las bacterias fagocitadas colocalizan con transferrina, luego de 48 hs el porcentaje de colocalización se incrementa significativamente ( $34 \pm 5$  %) sugiriendo que *B. pertussis* tiene acceso a nutrientes vía endosomas de reciclaje.

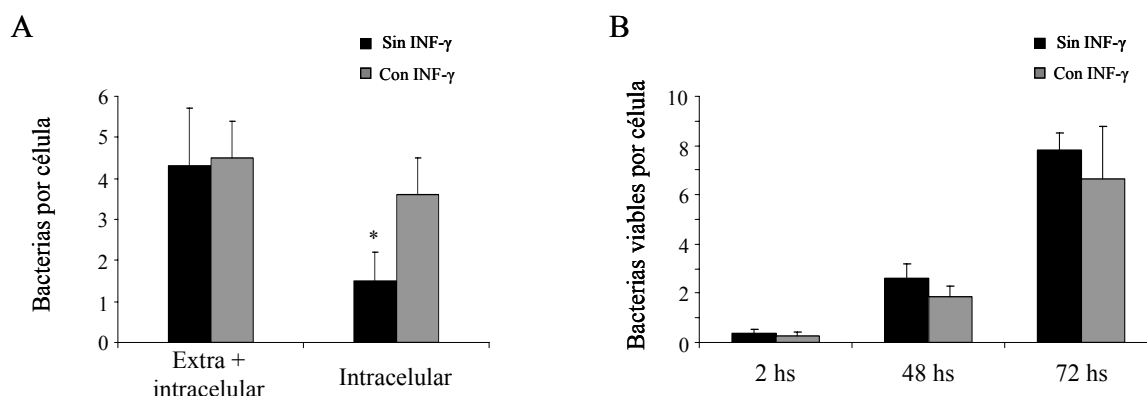


**Figura 10. Colocalización de *B. pertussis* con transferrina.** Macrófagos infectados con GFP-*B. pertussis* durante 20 min a 37 °C fueron lavados e incubados con polimixina B. A las 2 y a las 48 hs post-infección los macrófagos fueron incubados con Alexa-transferrina-594. Luego de 2 hs de infección el  $5 \pm 1$  % de las bacterias colocalizan con Transferrina. A las 48 hs post-infección el porcentaje de colocalización es del  $34 \pm 5$  %. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes.

#### 5.3.4. Efecto del INF- $\gamma$ en la sobrevivencia de *B. pertussis* en el macrófago

Estudios previos sugieren que el INF- $\gamma$  tiene un rol crítico en la inmunidad contra *B. pertussis* [6, 30]. Esta citoquina aumenta tanto la actividad microbicida como la capacidad de presentar antígenos de los macrófagos [31, 32]. En este ensayo intentamos acercarnos a las condiciones *in vivo* investigando si el INF- $\gamma$ , que no está presente en las condiciones de ensayo anteriormente mencionadas, tiene una influencia crítica en el resultado de la interacción de *B. pertussis* con los macrófagos humanos.

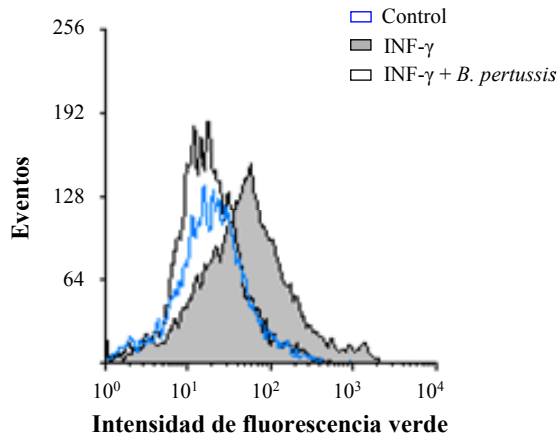
Estudios de adhesión, fagocitosis y sobrevivencia de *B. pertussis* en macrófagos previamente activados con INF- $\gamma$  indican que el tratamiento con esta citoquina produce un aumento significativo en el número de bacterias fagocitadas y que son eliminadas a las 2 hs post-infección (Fig. 12A y B). Sin embargo la presencia de INF- $\gamma$  no afectó significativamente la capacidad de *B. pertussis* de replicar en estas células inmunes (Fig. 12B).



**Figura 12. Fagocitosis y sobrevivencia de *B. pertussis* en macrófagos humanos en presencia de INF- $\gamma$ .** A) GFP-*B. pertussis* fue incubada con macrófagos humanos (R<sub>i</sub>b/c 20) previamente tratados durante 2 hs con o sin INF- $\gamma$  (150 U/ml). Luego de 20 min las células fueron lavadas y fijadas. El número de bacterias extracelulares (rojas y verdes) e intracelulares (verdes) fue cuantificado mediante microscopía de fluorescencia. Se muestran valores medios  $\pm$  DE de muestras realizadas por triplicado. El número de bacterias intracelulares en macrófagos no tratados con INF- $\gamma$  difiere significativamente del número de bacterias intracelulares en macrófagos tratados con INF- $\gamma$  (\*P<0.05). B) Macrófagos incubados con GFP-*B. pertussis* (R<sub>i</sub>b/c 20) durante 20 min a 37 °C fueron lavados y tratados con polimixina B. El número de UFC fue determinado a diferentes 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  $\pm$  DE de experimentos independientes realizados por triplicado.

Una característica de algunos patógenos que poseen nichos intracelulares de persistencia es su capacidad para regular negativamente la expresión de moléculas presentadoras de antígenos, críticas para el reconocimiento de las células infectadas. Se ha observado que *B. pertussis* podría tener mecanismos similares [33], lo cual en el marco de los resultados mostrados en este trabajo cobra una relevancia particularmente significativa. En este estudio se incluyó entonces la evaluación de la respuesta del monocito infectado con *B. pertussis* a la acción de INF- $\gamma$  en lo que se refiere a la expresión de moléculas presentadoras de antígenos. Para ello, monocitos humanos fueron infectados con *B. pertussis* en presencia de INF- $\gamma$  durante 2 hs, lavados e incubados durante 48 hs más a 37 °C en presencia de INF- $\gamma$ . La expresión de MHC-II (HLA-DR) fue evaluada mediante citometría de flujo. Los resultados de la Figura 13

indican que la infección con *B. pertussis* inhibe la expresión de HLA-DR en respuesta al INF- $\gamma$  sugiriendo que *B. pertussis* no solo es capaz de sobrevivir dentro de estas células inmunes sino que también es capaz de modificar su capacidad de presentar antígenos y por lo tanto de ser eficientemente reconocida por las células Th1.



**Figura 13. Efecto de *B. pertussis* en la expresión de HLA-DR en respuesta a INF- $\gamma$ .** Monocitos humanos tratados con INF- $\gamma$  (150 U/ml) fueron incubados con *B. pertussis* (INF- $\gamma$  + *B. pertussis*) o medio solo durante 2 hs en presencia de INF- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). Posteriormente fueron lavados e incubados durante 48 hs en presencia de INF- $\gamma$ . Algunos monocitos fueron incubados únicamente con medio DMEM + SH 10 % v/v durante todo el ensayo (control). La expresión de HLA-DR fue evaluada por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de dos experimentos independientes.

### 5.3.5. Rol de la toxina adenilato ciclasa en la sobrevivencia de *B. pertussis* en macrófagos humanos

Como ya se mencionara *B. pertussis* tiene una batería de toxinas, muchas de ellas con funciones inmunomodulatorias conocidas, que podrían estar involucradas en este mecanismo de sobrevivencia intracelular. De todas ellas y de su modulación temporal cuya influencia se prevé evaluar en estudios posteriores, resulta particularmente interesante la toxina adenilato ciclasa. En ensayos previos llevados a cabo a tiempos cortos de infección (5 horas) Masure *et al.* [34] encontró evidencia que sugiere que esta toxina es particularmente importante para la viabilidad de *B. pertussis* dentro del macrófago durante las primeras horas posteriores a su internalización, posiblemente debido al aumento que produce en los niveles de AMPc que interfiere en la señalización de la célula eucariota. En este contexto, se evaluó en este trabajo si la ausencia de esta enzima modifica la capacidad de *B. pertussis* de sobrevivir y replicar en macrófagos humanos a corto y a largo plazo. Para facilitar la comparación, los macrófagos fueron infectados en forma paralela con Bp Tohama I y BPM3183, una cepa mutante defectiva en la expresión de ACT. Se evaluó el nivel de adhesión, fagocitosis y sobrevivencia intracelular de ambas cepas. Los resultados presentados en la Tabla 1 indican que, si

bien no existen diferencias significativas entre los niveles de adhesión y fagocitosis de ambas cepas, el número de bacterias intracelulares viables luego de 2 hs de infección se encuentra significativamente disminuido en la cepa defectiva en ACT respecto a la cepa salvaje. Este resultado coincide con lo encontrado por Masure *et al.* [34] a tiempos cortos de infección. Sin embargo la capacidad de replicación no se encuentra afectada, observándose un aumento en el número de bacterias viables intracelulares luego de 48 hs de infección tanto en Bp Tohama I como en BPM3183. Estos resultados sugieren que ACT cumple un rol central en la evasión de la actividad bactericida del macrófago durante las primeras horas post-infección. Sin embargo, la acción de esta enzima no es necesaria en estadios posteriores de sobrevida y duplicación dentro del macrófago. Lo que no es posible discernir a partir de nuestros resultados es si en realidad esta toxina no resulta tóxica a tiempos largos de infección y su expresión esta reprimida en la cepa salvaje que sobrevive y duplica dentro del macrófago a través del sistema Bvg. Estudios actualmente en marcha intentan esclarecer esta y otras cuestiones relacionadas con la modulación antigénica y los factores de virulencia expresados en las bacterias intracelulares.

**Tabla 1.** Sobrevida de BPM3183 defectiva en la expresión de adenilato ciclasa en macrófagos humanos.

| Bacterias   | Bacterias /célula <sup>a</sup> | Baterias intracelulares/célula <sup>b</sup> | Sobrevida intracelular a diferentes tiempos <sup>c</sup> |           |
|-------------|--------------------------------|---|--|-----------|
|             |                                |   | 2 hs   | 48 hs     |
| Bp Tohama I | 4,5 ± 0,6                      | 1,5 ± 0,3                                   | 0,4 ± 0,2  | 2,6 ± 0,8 |
| BPM3183     | 3,9 ± 0,7                      | 1,2 ± 0,4                                   | 0,12 ± 0,08  | 1,1 ± 0,5 |

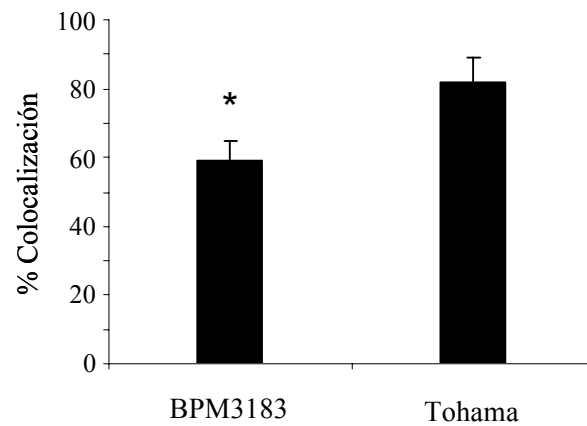
<sup>a,b</sup> GFP-BPM3183 y GFP *B. pertussis* Tohama I fueron incubadas con macrófagos humanos (R<sub>1</sub>b/c 20) durante 20 min, lavadas y fijadas. Posteriormente las bacterias extracelulares fueron teñidas con anticuerpo policlonal de conejo anti-*B. pertussis* seguido por fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con CY3. El número de bacterias totales (intra+extracelulares)<sup>a</sup> y el número de bacterias intracelulares<sup>b</sup> por célula fue obtenido mediante observación en microscopio de fluorescencia.

<sup>c</sup> Número de bacterias intracelulares viables por célula obtenido mediante recuento de UFC de células tratadas con Polimixina B.

Debido a que la sobrevida de *B. pertussis* en macrófagos parece depender de la evasión de la vía degradativa, se estudió si la ausencia de ACT afecta la capacidad de *B. pertussis* de alterar el tráfico a compartimientos lisosomales tras ser fagocitada. Los resultados indican que la ausencia de ACT determina un aumento significativo en el número de bacterias colocalizando con LysoTracker a los 20 min post-infección (Fig. 14) sugiriendo que esta toxina cumple un rol importante en la prevención de la fusión



del fagosoma con el lisosoma durante los primeros estadios posteriores a su internalización.



**Figura 14. Rol de la ACT en el tránsito de *B. pertussis* a compartimientos ácidos.** GFP-*B. pertussis* o GFP-BPM3183 fueron incubadas con macrófagos humanos (R;b/c 20) durante 20 min 37 °C. Posteriormente las células fueron lavadas, incubadas con LysoTracker, fijadas y observadas en microscopio confocal. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  DE de dos experimentos independientes.



## 5.4. Discusión

Muchos patógenos persistentes han desarrollado una serie de estrategias para evadir la normal maduración de los fagosomas y establecer nichos de persistencia intracelulares. Si bien siempre se ha creído que *B. pertussis* es un patógeno extracelular estricto, durante los últimos años se ha acumulado evidencia que sugiere que este microorganismo podría invadir diferentes tipos celulares. La existencia de un estadio intracelular facilitaría la persistencia de este patógeno en el huésped. En el presente capítulo se demuestra que *B. pertussis* no solo sobrevive por varios días dentro de macrófagos humanos, sino que este patógeno es capaz de replicar en compartimientos con características de endosomas tempranos.

La capacidad de los fagocitos profesionales para ingerir y eliminar microorganismos constituye un mecanismo central de la respuesta inmune. Los pocos patógenos microbianos que logran sobrevivir a la acción bactericida de los mismos han desarrollado diversos mecanismos para aumentar su sobrevivencia dentro de estas células [35]. Algunos de ellos, como *Listeria*, *Shigella*, y *Rickettsia*, escapan al citoplasma evitando así su digestión en lisosomas. Otros, como *Coxiella burnetii*, se han adaptado a sobrevivir en el microambiente hostil del lisosoma. Un gran número de bacterias intracelulares, en cambio, logran inhibir la maduración del fagosoma y habitan en vesículas que no se fusionan con lisosomas. Aunque una serie de estudios desarrollados tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren que *B. pertussis* podría sobrevivir a la interacción con macrófagos [11, 13, 36] no existían estudios que confirmasen esa posibilidad ni se había caracterizado el tráfico intracelular de esta bacteria.

En ausencia de anticuerpos opsonizantes, CR3 es probablemente el principal receptor involucrado en la unión de *B. pertussis* a células fagocíticas a través de FHA [16, 37]. En ausencia de anticuerpos específicos la interacción *B. pertussis* con fagocitos profesionales como los neutrófilos no induce actividad celular bactericida [23], lo cual es consistente con la conocida incapacidad de CR3 para activar la NADPH oxidasa. En el capítulo anterior hemos demostrado que bajo estas condiciones *B. pertussis* es transportada a estructuras subcelulares que no se fusionan con lisosomas determinando que la bacteria sobreviva a la interacción con el neutrófilo. Sin embargo, debido a su corta vida media, los neutrófilos no constituyen reservorios prolongados de sobrevivencia. Los macrófagos en cambio, por sus características y su larga vida media, son más

propicios para el establecimiento de nichos intracelulares que posibiliten infecciones crónicas o persistentes, y aumenten las posibilidades de diseminación a nuevos hospedadores. Los estudios que se muestran en este Capítulo han estado dirigidos al estudio de la fagocitosis y el tráfico intracelular de *B. pertussis* una vez dentro del macrófago. Los resultados demuestran que durante las primeras horas post-infección la mayoría de los fagosomas que contienen *B. pertussis* se fusionan con estructuras lisosomales, lo cual se ve reflejado en el alto porcentaje de colocación con LAMP-1 y LysoTracker luego de 2 hs de infección. *B. pertussis* parece ser incapaz de sobrevivir en estos compartimientos ácidos, según se deduce de la concomitante disminución en el número de bacterias intracelulares viables a estos tiempos, confirmando estudios previos que indican que *B. pertussis* no sobrevive a pH bajos [38]. Sin embargo, además de esta acción bactericida a tiempos cortos, nuestros resultados muestran también que un porcentaje significativo de bacterias evade este tráfico inicial hacia lisosomas permaneciendo en compartimientos no ácidos donde es capaz de replicarse en un período de 48 hs. Los análisis realizados mediante microscopía confocal indican que a las 48 hs de infección el porcentaje de bacterias que reside en compartimientos LysoTracker positivos disminuye significativamente, sugiriendo que aquellas bacterias que durante las primeras horas de infección evadieron la acción bactericida del macrófago son capaces de replicar en compartimientos no ácidos dentro de un período de 48 hs resultando en un significativo aumento en el número de bacterias localizadas en vesículas LysoTracker negativas.

En claro contraste, la opsonización de *B. pertussis* con anticuerpos IgG no sólo determina un aumento en la capacidad de fagocitosis y en la acción bactericida del macrófago sino que previene la replicación intracelular. Esto está de acuerdo con experimentos previos realizados tanto *in vitro* como *in vivo* en los cuales se demuestra que la entrada vía FcγR facilita la eliminación de *B. pertussis* mientras que la entrada a través de CR3 la dificulta [13, 23].

Mediante microscopía confocal se determinó que *B. pertussis* sobrevive en compartimientos que poseen marcador de endosomas tempranos Rab5. Esta pequeña GTPasa funciona como factor regulador de la vía endocítica temprana [39]. El hecho de que Rab5 quede retenida en los fagosomas conteniendo *B. pertussis* determina que la subsiguiente maduración de la vacuola fagocítica se encuentre inhibida, lo cual se condice con los bajos niveles de colocación con LAMP y LysoTracker a las 48 hs

post-infección, limitando las capacidades degradativas e incrementando las posibilidades de sobrevivencia bacteriana. Dado que la habilidad de un patógeno de sobrevivir dentro de la célula depende no solo de su capacidad para evitar la degradación en lisosomas, sino de su capacidad para obtener nutrientes, los resultados que indican que *B. pertussis* tiene acceso a transferrina no solo confirman nuestras observaciones previas respecto a la naturaleza temprana del fagosoma sino que sugieren la existencia de intercambio de material con endosomas de reciclaje garantizando eventualmente el acceso de *B. pertussis* a nutrientes vitales.

La sobrevivencia de *B. pertussis* en vacuolas que permanecen integradas a la vía endosomal determina, sin embargo, que la bacteria se encuentre continuamente expuesta al procesamiento y presentación de sus proteínas promoviendo la activación de células T, claves en la eliminación de células infectadas como podrían ser precisamente estos macrófagos [3, 40-42]. No obstante, *B. pertussis* parece haber desarrollado estrategias que comprometen la activación de estas células y la inducción de una respuesta local Th1 mediante la inducción de citoquinas inmunosupresivas como IL-10 [43-46] y la producción de células T regulatorias [47]. Por otro lado, en trabajos donde se evaluó la expresión génica de células mononucleares aisladas de sangre humana infectadas con *B. pertussis* se encontró que la expresión de los genes que codifican para las moléculas MHC-II, HLA-DM, catepsina B y la enzima lisosomal tiol reductasa IP-30 se encuentra disminuida [48]. Esto significa que la infección con *B. pertussis* altera en forma global el sistema de procesamiento y presentación de antígenos a través de este mecanismo que, a su vez, se suma al efecto inhibitorio que la infección por *B. pertussis* ejerce sobre el aumento de HLA-DR y moléculas coestimuladoras en respuesta a INF- $\gamma$ , según pudo ser comprobado en estos estudios, confirmando observaciones anteriores [33].

La sobrevivencia de una bacteria en un nicho particular requiere el desarrollo de una respuesta adaptativa generalmente mediada por la regulación positiva o negativa de aquellos genes requeridos para la adaptación fisiológica a las nuevas condiciones del entorno encontradas. Aunque poco se conoce respecto a la adaptación de *B. pertussis* al microambiente intracelular se ha sugerido que tanto el sistema BvgAS como el RisAS están involucrados en esta respuesta [49, 50]. Si bien los estudios desarrollados en este Capítulo no han estado fundamentalmente enfocados en los factores bacterianos que permiten la sobrevivencia de *B. pertussis* dentro de la célula, el hecho de que la replicación celular proceda sólo luego de 24-30 hs de infección sugiere que una adaptación al

microambiente encontrado en el macrófago debe ocurrir. En un trabajo previo se ha demostrado que durante los primeros minutos tras la fagocitosis de *B. pertussis* se produce un aumento importante en los niveles intracelulares de AMPc mediado por la actividad de la toxina adenilato ciclasa. Sin embargo, después de 2 hs de infección la concentración de AMPc decae drásticamente sugiriendo que una vez dentro de la célula inmune *B. pertussis* disminuye la expresión de ACT evitando la intoxicación del macrófago [49]. Los resultados mostrados en este Capítulo son acordes a la hipótesis que sugiere que la acción de esta toxina podría ser importante durante los primeros estadios de la infección favoreciendo la evasión de la fusión con compartimientos lisosomales aunque no sería necesaria en estadios posteriores y hasta es posible que su expresión se inhiba. Una posible explicación de esta dependencia inicial podría encontrarse en trabajos recientes que indican que el incremento en los niveles de AMPc inhibe el ensamble de filamentos de actina y previene los eventos de fusión con endosomas tardíos [51]. Es posible que la toxina adenilato ciclasa al producir un aumento de AMPc en la célula inmune favorezca la permanencia de *B. pertussis* en endosomas tempranos tras ser fagocitada.

Se ha descrito que el INF- $\gamma$ , una citoquina producida por células NK como parte de la respuesta innata y por células Th1 durante la respuesta adaptativa, cumple un rol importante en la respuesta inmune contra *B. pertussis* [3, 4, 8]. Trabajos previos sugieren que la activación de los macrófagos con INF- $\gamma$  reduce la sobrevivencia bacteriana a través de mecanismos dependientes e independientes de la producción de NO $^*$ , limitando la disponibilidad de Fe y nutrientes como triptofano [6]. Los resultados mostrados en este Capítulo indican que la estimulación previa de los macrófagos con INF- $\gamma$  reduce los niveles iniciales de sobrevivencia de *B. pertussis*, sin embargo, no impide la replicación intracelular sugiriendo que, a largo plazo, *B. pertussis* es capaz de adaptarse y/o reprimir los efectos antimicrobianos inducidos por esta citoquina. En este sentido, trabajos previos de nuestro grupo indican que *B. pertussis* es capaz de adaptarse a condiciones de limitación de Fe, como la que encuentra en compartimientos intracelulares, induciendo la producción de proteínas como SodA (superóxido dismutasa), Brfl (probable receptor de ferrosideróforos) y AfuA (probablemente involucrada en la captura de Fe), entre otras proteínas de estrés [52] que podrían inducirse en el microambiente hostil del fagosoma favoreciendo en última instancia la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis*.

En conjunto, los resultados presentados en este Capítulo indican que *B. pertussis* ha desarrollado diferentes estrategias para evadir la respuesta inmune y avalan la hipótesis de que *B. pertussis* es capaz de sobrevivir dentro de macrófagos contribuyendo a su persistencia. Estos estudios presentan la primera evidencia que *B. pertussis* no sería un patógeno extracelular estricto sino que podría ser considerada un patógeno intracelular facultativo, lo cual tiene un impacto directo en el tipo de inmunidad requerida para combatir esta bacteria. Estos estudios proveen nuevas herramientas para comprender mejor la patogénesis, la clínica de esta enfermedad y su epidemiología. Considerando el alarmante incremento de la circulación de *B. pertussis* a nivel mundial, esta información podría ser relevante para el desarrollo de nuevas estrategias inmunopreventivas.





## 5.5. Conclusiones

Los estudios realizados con monocitos diferenciados a macrófagos indican que bajo condiciones no opsonizantes un porcentaje de *B. pertussis* es capaz de evadir el tráfico a lisosomas permaneciendo viable en compartimientos con características de endosomas tempranos y con acceso a nutrientes, donde duplica.

La opsonización con anticuerpos no sólo determina que *B. pertussis* sea fagocitada e inactivada de forma más eficiente que bajo condiciones no opsonizantes sino que impide que la replicación ocurra.

La activación de los macrófagos con INF- $\gamma$  si bien incrementa la actividad bactericida de esta célula durante los primeros estadios post-infección no logra suprimir la capacidad de *B. pertussis* de replicar.

*B. pertussis* es capaz de alterar la respuesta del macrófago al estímulo con INF- $\gamma$  modulando la expresión de HLA-DR y por lo tanto la capacidad de presentar antígenos a la célula T.

La toxina adenilato ciclasa favorece la evasión de la vía degradativa durante los primeros estadios post-fagocitosis, aunque no parece ser relevante en estadios posteriores.



## Referencias

1. Ryan M, Murphy G, Gothefors L, Nilsson L, Storsaeter J, Mills KH. **Bordetella pertussis respiratory infection in children is associated with preferential activation of type 1 T helper cells.** *J Infect Dis.* 1997,175:1246-1250.
2. Mahon BP, Ryan MS, Griffin F, Mills KH. **Interleukin-12 is produced by macrophages in response to live or killed Bordetella pertussis and enhances the efficacy of an acellular pertussis vaccine by promoting induction of Th1 cells.** *Infect Immun.* 1996,64:5295-5301.
3. 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.* 1993,61:399-410.
4. Redhead K, Watkins J, Barnard A, Mills KH. **Effective immunization against Bordetella pertussis respiratory infection in mice is dependent on induction of cell-mediated immunity.** *Infect Immun.* 1993,61:3190-3198.
5. 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.* 2000,191:1841-1852.
6. Mahon BP, Mills KH. **Interferon-gamma mediated immune effector mechanisms against Bordetella pertussis.** *Immunol Lett.* 1999,68:213-217.
7. Barbic J, Leef M, Burns D, Shahin R. **Role of gamma interferon in natural clearance of Bordetella pertussis infection.** *Infect. Immun.* 1997,65:4904-4908.
8. Mills KHG, 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.* 1998,66:594-602.
9. Mahon BP, Sheahan BJ, Griffin F, Murphy G, Mills KHG. **Atypical Disease after Bordetella pertussis Respiratory Infection of Mice with Targeted Disruptions of Interferon- $\gamma$  Receptor or Immunoglobulin  $\mu$  Chain Genes.** *J. Exp. Med.* 1997,186:1843-1851.
10. Meylan E, Tschopp Jr, Karin M. **Intracellular pattern recognition receptors in the host response.** 2006,442:39-44.
11. Friedman RL, Nordensson K, Wilson L, Akporiaye ET, Yocum DE. **Uptake and Intracellular Survival of Bordetella pertussis in Human Macrophages.** *Infect Immun.* 1992,60:4578-4585.
12. Vandebriel RJ, Hellwig SMM, Vermeulen JP, Hoekman JH, Dormans JA, Roholl PJ, Mooi FR. **Association of Bordetella pertussis with host immune cells in the mouse lung.** *Microbial Pathogenesis* 2003,35:19-29.
13. Hellwig SM, van Oirschot HF, Hazenbos WL, van Spriel 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.* 2001,183:871-879.
14. Bromberg K, Tannis G, Steiner P. **Detection of Bordetella pertussis associated with the alveolar macrophages of children with human immunodeficiency virus infection.** *Infect Immun.* 1991,59:4715-4719.

15. 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.* 2008,47:328-338.
16. 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.* 1990,61:1375-1382.
17. Hazenbos W, van den Berg B, van Furth R. **Very late antigen-5 and complement receptor type 3 cooperatively mediate the interaction between *Bordetella pertussis* and human monocytes.** *J Immunol* 1993,151:6274-6282.
18. Ishibashi Y, Claus S, Relman D. ***Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18).** *J. Exp. Med.* 1994,180:1225-1233.
19. 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.* 1992,60:3303-3308.
20. Weiss AA, Melton AR, Walker KE, Andraos-Selim C, Meidl JJ. **Use of the promoter fusion transposon Tn5 lac to identify mutations in *Bordetella pertussis* vir-regulated genes.** *Infect. Immun.* 1989,57:2674-2682.
21. Weingart CL, Broitman-Maduro G, Dean G, Newman S, Peppler M, Weiss AA. **Fluorescent Labels Influence Phagocytosis of *Bordetella pertussis* by Human Neutrophils.** *Infect Immun.* 1999,67:4264-4267.
22. Nagel J, de Graaf S, Schijf-Evers D. **Improved serodiagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis* by determination of IgG anti-LPF antibody levels.** *Dev Biol Stand.* 1985,61:325-330.
23. Rodriguez ME, Hellwig SMM, Hozbor DF, Leusen J, van der Pol W-L, van de Winkel JGJ. **Fc Receptor-Mediated Immunity Against *Bordetella pertussis*.** *J Immunol* 2001,167:6545-6551.
24. Boyum A. **Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood.** *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968,97:77-89.
25. 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.* 1990,58:2516-2522.
26. Sturgill-Koszycki S, Schaible UE, Russell DG. ***Mycobacterium*-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis.** *Embo J.* 1996,15:6960-6968.
27. de Chastellier C, Forquet F, Gordon A, Thilo L. ***Mycobacterium* requires an all-around closely apposing phagosome membrane to maintain the maturation block and this apposition is re-established when it rescues itself from phagolysosomes.** *Cell Microbiol* 2009,11:1190-1207.
28. Rittig MG, Alvarez-Martinez M-T, Porte F, Liautard J-P, Rouot B. **Intracellular Survival of *Brucella* spp. in Human Monocytes Involves Conventional Uptake but Special Phagosomes.** *Infect. Immun.* 2001,69:3995-4006.
29. Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish H. **pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983,80:2258-2262.

30. Torre D, Ferrario G, Bonetta G, Perversi L, Tambini R, Speranza F. **Effects of recombinant human gamma interferon on intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human phagocytic cells.** *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1994,9:183-188.
31. Schneeberger EE, DeFerrari M, Skoskiewicz MJ, Russell PS, Colvin RB. **Induction of MHC-determined antigens in the lung by interferon-gamma.** *Lab Invest.* 1986,55:138-144.
32. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. **An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection.** *J Exp Med.* 1993,178:2249-2254.
33. Shumilla JA, Lacaille V, Hornell TM, Huang J, Narasimhan S, Relman DA, Mellins ED. ***Bordetella pertussis* infection of primary human monocytes alters HLA-DR expression.** *Infect Immun.* 2004,72:1450-1462.
34. Masure HR. **The adenylate cyclase toxin contributes to the survival of *Bordetella pertussis* within human macrophages.** *Microbial Pathogenesis* 1993,14:253-260.
35. Moulder JW. **Comparative biology of intracellular parasitism.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1985,49:298-337.
36. 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.* 1991,173:1143-1149.
37. Mobberley-Schuman PS, Weiss AA. **Influence of CR3 (CD11b/CD18) Expression on Phagocytosis of *Bordetella pertussis* by Human Neutrophils.** *Infect. Immun.* 2005,73:7317-7323.
38. Schneider B, Gross R, Haas A. **Phagosome Acidification Has Opposite Effects on Intracellular Survival of *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*.** *Infect Immun.* 2000,68:7039-7048.
39. Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M. **The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway.** *Cell* 1992,70:715-728.
40. Hafler JP, Pohl-Koppe A. **The cellular immune response to *Bordetella pertussis* in two children with whooping cough.** *Eur J Med Res.* 1998,3:523-526.
41. 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.
42. Barnard A, Mahon BP, Watkins J, Redhead K, Mills KH. **Th1/Th2 cell dichotomy in acquired immunity to *Bordetella pertussis*: variables in the in vivo priming and in vitro cytokine detection techniques affect the classification of T-cell subsets as Th1, Th2 or Th0.** *Immunology.* 1996,87:372-380.
43. McQuirk P, Mills K. **Direct anti-inflammatory effect of a bacterial virulence factor: IL-10-dependent suppression of IL-12 production by filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*.** *European Journal of Immunology* 2000,30:415-422.
44. Hickey FB, Brereton CF, Mills KHG. **Adenylate cyclase toxin from *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; jlb.0208113.
45. Ross PJ, Lavelle EC, Mills KHG, 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.* 2004,72:1568-1579.
46. Fedele G, Nasso M, Spensieri F, Palazzo R, Frasca L, Watanabe M, Ausiello CM. **Lipopolysaccharides from *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* differently modulate human dendritic cell functions resulting in divergent prevalence of Th17-polarized responses.** *J Immunol.* 2008,181:208-216.
  47. McGuirk P, McCann C, Mills KHG. **Pathogen-specific T Regulatory 1 Cells Induced in the Respiratory Tract by a Bacterial Molecule that Stimulates Interleukin 10 Production by Dendritic Cells: A Novel Strategy for Evasion of Protective T Helper Type 1 Responses by *Bordetella pertussis*.** *J. Exp. Med.* 2002,195:221-231.
  48. Boldrick JC, Alizadeh AA, Diehn M, Dudoit S, Liu CL, Belcher CE, Botstein D, Staudt LM, Brown PO, Relman DA. **Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002,99:972-977.
  49. Masure HR. **Modulation of adenylate cyclase toxin production as *Bordetella pertussis* enters human macrophages.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992,89:6521-6525.
  50. 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.* 2005,73:5995-6004.
  51. Kalamidas SA, Kuehnel MP, Peyron P, Rybin V, Rauch S, Kotoulas OB, Houslay M, Hemmings BA, Gutierrez MG, Anes E, Griffiths G. **cAMP synthesis and degradation by phagosomes regulate actin assembly and fusion events: consequences for mycobacteria.** *J Cell Sci* 2006,119:3686-3694.
  52. Perez Vidakovics ML, Paba J, Lamberti Y, Ricart CA, de Sousa MV, Rodriguez ME. **Profiling the *Bordetella pertussis* proteome during iron starvation.** *J Proteome Res.* 2007,6:2518-2528.

## **CAPÍTULO 6**

### **DISCUSIÓN GENERAL**





## CAPÍTULO 6

## 6. Discusión General

A pesar de las altas tasas de vacunación pertussis continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial. Las vacunas actualmente utilizadas si bien confieren cierto grado de protección contra los síntomas de la enfermedad, no previenen eficientemente su colonización, permitiendo el establecimiento de portadores asintomáticos e imposibilitando su erradicación. Los mecanismos que permiten a *B. pertussis* persistir en la población así como su localización durante períodos asintomáticos no han sido aun esclarecidos lo que dificulta el diseño de nuevas estrategias inmunopreventivas eficaces. A su vez, en los últimos años se ha detectado un cambio en el rango etario de casos, observándose un incremento en el número de casos reportados en adolescentes y adultos, los cuales cursan la enfermedad de forma atípica adquiriendo la misma el carácter de crónica y persistente [1]. Esta población constituye una de las principales fuentes de contagio a lactantes y niños parcialmente inmunizados. La vacunación de adultos ha sido propuesta como una estrategia para detener la circulación, sin embargo, resulta necesario esclarecer previamente los mecanismos que contribuyen a que este patógeno persista en el hospedador lo que permitirá detectar deficiencias en las estrategias preventivas actuales y la implementación de mejoras en la composición antigénica de la vacuna.

La infección por *B. pertussis* induce una respuesta inflamatoria celular caracterizada por un influjo de neutrófilos, monocitos y células Th1 [2]. Se ha encontrado que la inmunidad mediada por células, típicamente producida para combatir patógenos intracelulares, participa activamente en la resolución de la infección [3-5]. *B. pertussis* no es considerada, en general, una bacteria invasiva, sin embargo hoy se sabe que numerosos patógenos históricamente considerados extracelulares, presentan estilos de vida intracelulares alternativos cuya existencia contribuye al establecimiento de infecciones crónicas y/o recurrentes que dificultan la erradicación del agente infeccioso [6-8]. En el caso de *B. pertussis*, una serie de estudios realizados *in vitro* e *in vivo* utilizando modelos murinos indican que esta bacteria es capaz de ingresar a diferentes tipos celulares [9-12], sin embargo, la posibilidad de la existencia de un nicho intracelular de persistencia durante el período infeccioso no ha sido evaluada.

El descubrimiento relativamente reciente de que la membrana plasmática contiene microdominios especializados, denominados rafts lipídicos, y que estos son utilizados como receptores celulares por una gran variedad de patógenos y sus toxinas promoviendo la invasión o la intoxicación celular, ha acaparado el interés de diversos grupos de investigación que estudian infecciones de difícil erradicación. En particular, se ha encontrado que el ingreso a través de estos dominios resulta en muchos casos beneficioso para el patógeno invasor facilitando su sobrevivencia intracelular [13]. Si bien en el caso de *B. pertussis* no existía, previo a la realización de este trabajo de Tesis, ningún estudio que describiera la interacción de este patógeno con dominios rafts, ciertas evidencias, entre las cuales se encuentra la afinidad de *B. pertussis* por ciertos componentes como lactosilceramidas y gangliósidos [14, 15] asociados a rafts lipídicos, sugieren que estos dominios podrían tener un rol en el proceso infeccioso de este patógeno.

Debido a ello, los estudios realizados en esta Tesis Doctoral han tenido como objetivo evaluar la hipótesis de la sobrevivencia intracelular como mecanismo de persistencia de *B. pertussis*. En particular se investigó la interacción de *B. pertussis* con los principales tipos celulares con los cuales interacciona durante la infección, el rol de los rafts lipídicos en esta interacción, y la capacidad de *B. pertussis* de invadir y sobrevivir en las células del huésped.

Los resultados obtenidos permiten concluir que *B. pertussis* interacciona con las células epiteliales del hospedador principalmente a través de dominios rafts lipídicos. Estos dominios funcionan como plataformas de adhesión asegurando una alta concentración local de receptores e incrementando la eficiencia de interacción entre el microorganismo y la membrana celular. Se observó que FHA, una de las principales adhesinas de *B. pertussis*, está involucrada en esta interacción aunque otros factores parecen también contribuir en este proceso.

Los resultados obtenidos muestran, además, que *B. pertussis* tiene una gran afinidad por colesterol a través de FHA, sugiriendo que el colesterol, junto con otras moléculas con las cuales *B. pertussis* interacciona, como lactosilceramidas [14] y asialo-GM1 [15], contribuyen en la asociación de esta bacteria con los dominios rafts.

Según pudo ser comprobado en los estudios descritos en el Capítulo 3, los rafts lipídicos no sólo median la adhesión de *B. pertussis* a la célula epitelial sino que intervienen en la activación de los mecanismos que conllevan a la internalización de este patógeno. Eventos de fosforilación a nivel de tirosinas parecen estar involucrados

en este proceso, lo cual está de acuerdo con estudios recientes que indican que la endocitosis vía rafts es dependiente de la activación de tirosin-quinasa [16]. Si bien en estos estudios no se han caracterizado los factores bacterianos relevantes en la invasión de *B. pertussis* a la célula epitelial, el hecho de que la misma transcurra a través de dominios rafts sugiere que la presencia de FHA sería, al menos, necesaria. En apoyo de esta hipótesis, estudios previos indican que esta adhesina juega un rol importante en el ingreso de *B. pertussis* a las células epiteliales a través de la interacción con la integrina VLA-5 [10]. Esta integrina es reclutada en dominios rafts tras la adhesión de patógenos como *E. coli* Afa/Dr positiva [17], favoreciendo su ingreso en un proceso dependiente de la movilización de microtúbulos. Aunque nuestros estudios no demuestran la asociación de VLA-5 con rafts durante el ingreso de *B. pertussis*, el hecho de que los microtúbulos también estén involucrados en su internalización y que el ingreso de *B. pertussis*, al igual que el de *E. coli*, sea independiente de la activación de la proteína quinasa C y la fosfolipasa C sugieren que los mecanismos utilizados por ambos patógenos pueden ser similares. Otros ensayos serán necesarios para confirmar esta hipótesis.

Un aspecto a tener en cuenta es que los estudios realizados para evaluar la sobrevivencia de *B. pertussis* en localización intracelular indican una alta dependencia con el tipo celular utilizado, observándose una mayor capacidad de sobrevivencia en células de origen bronquial respecto a células derivadas de neumocitos humanos tipo II. Si bien estas diferencias podrían indicar que las células bronquiales constituyen sitios de permanencia más favorables para este patógeno, los resultados de estos estudios deben ser considerados preliminares debido a las diferencias existentes entre las líneas celulares y sus contrapartes primarias. Aun así, los resultados obtenidos en ambos tipos celulares demuestran que un porcentaje de las bacterias intracelulares evade la fusión con lisosomas y es capaz de sobrevivir en localización intracelular. La invasión de células epiteliales no fagocíticas podría ser un mecanismo utilizado por este patógeno para evitar la respuesta inmune del huésped o como una vía para alcanzar otros tipos celulares.

Los estudios de interacción de *B. pertussis* con células inmunes dan cuenta de la complejidad del proceso infeccioso y aportan nuevas herramientas que podrían ayudar a entender las causas de persistencia de *B. pertussis* en la población. Los resultados obtenidos utilizando neutrófilos humanos indican que bajo condiciones no opsonizantes *B. pertussis* también es fagocitada a través de dominios rafts. El ingreso a través de

estos dominios determina que la bacteria evada la fusión fagolisosomal. Uno de los principales receptores involucrados en la interacción de *B. pertussis* con las células del sistema inmune, en ausencia de anticuerpos, es el receptor de complemento CR3 [18, 19]. El ingreso a través de este receptor no induce la generación del estallido respiratorio facilitando la sobrevida bacteriana [20, 21]. Resulta particularmente interesante el hecho de que la interacción de este receptor con dominios rafts lipídicos ha demostrado ser crucial para asegurar la sobrevida intracelular de patógenos como *Mycobacterium* [22] y *Leishmania* [23]. Si bien en nuestros estudios la participación directa de CR3 en la interacción vía rafts no fue demostrada, se pudo comprobar que componentes de naturaleza proteica dentro de los dominios raft participan en esta interacción, lo cual avala la hipótesis de que los rafts lipídicos, actuando como plataformas de agregación, facilitan la interacción de *B. pertussis* con sus receptores en células inmunes. Por el contrario, el ingreso de *B. pertussis* opsonizada con anticuerpos específicos a través de receptores para Fc conlleva no solo a que la fagocitosis de *B. pertussis* sea más eficiente sino a que la bacteria sea direccionada hacia compartimientos lisosomales donde es inactivada. Estos resultados demuestran que *B. pertussis* es capaz de sobrevivir al encuentro con neutrófilos y ponen énfasis en la importancia de la presencia de anticuerpos opsonizantes en el sitio de infección para combatir la enfermedad. Si los resultados *in vitro* reflejan la situación *in vivo*, estos estudios indican que los neutrófilos, que constituyen la primera línea de defensa frente a las infecciones bacterianas, no son capaces de eliminar a *B. pertussis* a menos que haya anticuerpos opsonizantes en el sitio de infección lo cual podría contribuir significativamente a la persistencia de esta bacteria en el tracto respiratorio de huéspedes no inmunes o con inmunidad disminuida como son los adolescentes y los adultos.

Estos resultados motivaron el estudio de la interacción de *B. pertussis* con otro tipo de células inmunes, los macrófagos, que juegan un rol importante tanto en la inmunidad innata como en la inmunidad adaptativa, constituyendo una de las principales células presentadoras de antígenos. Estas células, en virtud de su alta capacidad fagocítica y su larga vida media, constituyen el hábitat de muchas bacterias intracelulares constitutivas y facultativas que han desarrollado mecanismos que les permiten evadir tanto la acción bactericida de estas células, como la capacidad de presentar antígenos y ser reconocidas por las células T. Los estudios realizados con monocitos humanos diferenciados a macrófagos indican que bajo condiciones no

opsonizantes un porcentaje de *B. pertussis* fagocitada evade el tráfico a lisosomas permaneciendo en compartimientos con características de endosomas tempranos (Rab5 positivos). Las causas que determinan que solo una fracción de las bacterias fagocitadas logre evadir el tráfico inicial hacia los lisosomas aún esta en estudio. Sin embargo se puede especular que la regulación diferencial de determinados factores de virulencia durante el proceso infeccioso contribuya a esta situación. En este estudio se observó que la toxina adenilato ciclasa juega un rol importante en la evasión de la respuesta inmune durante los primeros estadios post-fagocitosis facilitando la evasión del tráfico a estructuras lisosomales posiblemente a través del aumento que produce en los niveles de AMPc. Luego de un período de infección de 24 a 48 hs, se observaron resultados compatibles con replicación bacteriana intracelular, lo cual sugiere que *B. pertussis* no solo logra evadir la acción bactericida del macrófago, sino que es capaz de adaptarse al microambiente encontrado en el mismo y eventualmente multiplicar. No se observó que mutantes defectivos en la expresión de ACT tuvieran una capacidad de replicación disminuida respecto a la cepa salvaje sugiriendo que la presencia de esta toxina, importante en las primeras horas post-fagocitosis, no es esencial para la sobrevivencia bacteriana en estadios posteriores de infección. Acorde con estos resultados, estudios realizados por otro grupo de investigación indican que la expresión de ACT se encuentra disminuida 2 hs después de ser fagocitada la bacteria sugiriendo que *B. pertussis* posiblemente regule la expresión de esta y otras toxinas durante su adaptación al medio intracelular [24]. La ausencia de anticuerpos opsonizantes parece ser un requisito indispensable para que este patógeno logre adaptarse y sobrevivir en el microambiente hostil encontrado dentro del macrófago ya que cuando la bacteria se encuentra opsonizada con anticuerpos la sobrevivencia no sólo disminuye drásticamente dentro de las primeras horas de infección sino que el número de bacterias viables disminuye gradualmente con el tiempo alcanzando niveles despreciables luego de 48 hs de infección. Estos resultados son compatibles con los encontrados empleando neutrófilos como célula blanco y refuerzan la idea de que el tipo de receptores involucrados en el reconocimiento de *B. pertussis* determina en gran parte el destino final de la bacteria. La habilidad de un patógeno para sobrevivir dentro de la célula depende no solo de su capacidad para evitar su reconocimiento y degradación por el sistema inmune, sino de su capacidad para obtener nutrientes. En este sentido, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que *B. pertussis* tiene acceso a endosomas de reciclaje lo cual no solo confirma observaciones previas respecto a la

naturaleza temprana del fagosoma sino que garantiza eventualmente el acceso de *B. pertussis* a nutrientes. En conjunto, estos resultados sugieren que los macrófagos podrían constituir nichos de persistencia intracelular durante la patogénesis de *B. pertussis*, lo cual permite explicar ciertas observaciones clínicas y experimentales bien documentadas pero escasamente comprendidas, como por ejemplo, la presencia de *B. pertussis* en macrófagos alveolares de niños infectados con HIV [25] o que padecieron neumonía provocada por *B. pertussis* [26], el hallazgo de *B. pertussis* en macrófagos alveolares de ratón y conejo luego de 21 días de infección [9, 27], y la necesidad de una respuesta inmune celular para controlar la infección [2].

La infección con *B. pertussis* induce la producción de un perfil Th1, caracterizado por la presencia de altos niveles de INF- $\gamma$  [28]. Esta citoquina juega un rol importante en el control de infecciones producidas por bacterias intracelulares induciendo la activación del macrófago, potenciando su capacidad degradativa y provocando un aumento en la expresión de moléculas involucradas en el procesamiento y presentación de antígenos. Estudios realizados en modelos murinos sugieren que esta citoquina también tiene un rol importante en el control de la infección por pertussis [29-31]. Con el fin de evaluar si los resultados obtenidos *in vitro* se verían alterados por el INF- $\gamma$  (presente durante la infección) se realizaron estudios de sobrevivencia con macrófagos activados con INF- $\gamma$ . Los resultados demuestran que la activación del macrófago incrementa la actividad bactericida de esta célula durante los primeros estadios de infección. Sin embargo no se encontraron efectos significativos en la infección a largo plazo aunque el INF- $\gamma$  se mantuvo durante todo el ensayo con recambios periódicos. Se observó, al igual que en macrófagos no activados con esta citoquina, un incremento en el número de bacterias intracelulares luego de 48 hs de infección. Estos resultados podrían significar, por ejemplo, que *B. pertussis* es capaz de adaptarse al medio hostil generado en macrófagos activados por INF- $\gamma$ . En este sentido, trabajos previos de nuestro grupo demuestran que *B. pertussis* es capaz de adaptarse a diferentes situaciones de stress, entre ellas, la baja disponibilidad de hierro inducida por esta citoquina en macrófagos huéspedes [31]. Otra posibilidad es que, a través de la acción de ciertos factores de virulencia, esta bacteria pueda, al menos en parte, contrarrestar los efectos del INF- $\gamma$ . A favor de esta hipótesis, se ha encontrado que FHA, ACT y el LPS de *B. pertussis* poseen una importante actividad inmunomoduladora, induciendo la producción de IL-10 e IL 6 en macrófagos y células dendríticas [32-36]. Estas citoquinas parecen cumplir un rol importante en la inhibición

del efecto del INF- $\gamma$  sobre los macrófagos. Por ejemplo, la IL-10 inhibe la activación de la vía Jak/Stat1 generada en respuesta a la unión del interferón con su receptor inmune previniendo la inducción de la expresión de MHC-II y la producción de intermediarios reactivos del oxígeno y de monóxido de nitrógeno en respuesta al estímulo con INF- $\gamma$  [37-39]. Por otro lado, se ha descrito que la IL-6 puede, bajo ciertas circunstancias, inhibir la acción estimuladora del INF- $\gamma$  sobre macrófagos infectados con microorganismos como *Brucella abortus* [40], *Toxoplasma gondii* [41] y *Mycobacterium tuberculosis* [42]. Los resultados presentados en este trabajo de Tesis indican que la infección con *B. pertussis* afecta significativamente la capacidad de los monocitos humanos de aumentar la expresión de HLA-DR en respuesta al INF- $\gamma$  sugiriendo que esta bacteria, al igual que otros patógenos intracelulares [40, 43], es capaz de alterar la respuesta de los macrófagos al estímulo con INF- $\gamma$  modulando la expresión de HLA-DR y disminuyendo, por lo tanto, la capacidad del macrófago de presentar antígenos y ser reconocido por la célula T.

En conjunto, los resultados presentados en esta Tesis Doctoral aportan nuevas evidencias que indican que *B. pertussis* es capaz de sobrevivir dentro de las células del hospedador constituyendo quizás un mecanismo de persistencia. La presencia de uno o más estadios intracelulares durante el ciclo infeccioso de *B. pertussis* podría explicar algunos interrogantes que se han suscitado en relación a pertussis, desde la particular epidemiología de este patógeno, hasta la conservación a lo largo de décadas de un locus regulatorio de la virulencia sin función aparente *in vivo*. Cabe recordar que esta bacteria es un patógeno estrictamente humano, sin reservorios o vectores conocidos por fuera del hombre. La persistencia de *B. pertussis* en poblaciones con gran cobertura de vacunación y alto estándar de vida, podría adjudicarse a la inexistencia de anticuerpos circulantes en adultos mayores a 15 años que permitiría el establecimiento de nichos de persistencia en localización intracelular, fuente de contagio de huéspedes susceptibles. En efecto, la capacidad para sobrevivir dentro de células del hospedador podría conferirle varias ventajas aparte de la obvia evasión temporal de la respuesta inmune. Si es necesaria una respuesta pro inflamatoria local para el reclutamiento y activación de fagocitos, entonces un nicho intracelular podría proteger al microorganismo hasta que la inflamación local haya sido modulada por mecanismos anti-inflamatorios, permitiéndole a la bacteria emerger en condiciones más permisivas. También es posible imaginar que en vez de ser eliminada tempranamente en la infección, la bacteria permanezca en localización intracelular en células fagocíticas y otros tipos celulares y

que desde este sitio protegido, tanto la misma bacteria como sus toxinas puedan ser liberadas al medio extracelular extendiendo la duración de la enfermedad como se ha observado en casos clínicos. Por otra parte los macrófagos podrían transportar bacterias a nuevos sitios de infección donde inicien nuevas microcolonias en condiciones de entorno favorable.

La presencia de anticuerpos opsonizantes en el sitio de infección parece ser crucial para evitar el establecimiento de nichos intracelulares. En este sentido, es importante destacar que de los antígenos presentes en las actuales vacunas tanto celulares como acelulares, sólo Prn es capaz de inducir la producción de anticuerpos con potente actividad opsonofagocítica [44]. Este antígeno presenta en una de sus regiones inmunodominantes una alta variación antigénica, lo que deriva en la existencia de al menos 13 variantes de Prn diferentes que circulan actualmente en la población mundial [45]. La efectividad de la variante Prn1, presente actualmente casi exclusivamente en las formulaciones vacunales acelulares y celulares, frente a la infección con cepas de *B. pertussis* que presentan otras variantes de Prn es aun motivo de estudio. Sin embargo, el importante incremento en los últimos años de cepas con variantes de Prn diferentes a la vacunal, fundamentalmente Prn2, sugieren que la variación antigénica en Prn podría haber contribuido a la reemergencia de pertussis. Se ha postulado que esta variación en un antígeno clave en la protección [44, 46], podría deberse a una inmuno selección originada por décadas de vacunación con cepas de colección. En el contexto de los estudios presentados en esta Tesis, una actividad opsonizante disminuida o deficiente en el reconocimiento antígeno-anticuerpo, podría resultar en bacterias insuficientemente opsonizadas aumentando las posibilidades de persistencia en localización intracelular aun en individuos inmunes. En un Anexo a este trabajo de Tesis se muestran resultados de experimentos diseñados para evaluar la protección cruzada entre Prn1 y Prn2 (esta última la cepa mas prevalente en el mundo). Los datos obtenidos sugieren que existe una protección cruzada disminuida en individuos con inmunidad disminuida lo cual indicaría que la variación en este antígeno puede haber contribuido efectivamente a la reemergencia.

Actualmente se están llevando a cabo estudios tendientes a obtener información más concluyente respecto a los cambios fenotípicos que conllevan a que *B. pertussis* logre adaptarse al microambiente encontrado dentro de la célula inmune así como los factores que determinan que dentro de una determinada población bacteriana solo una fracción logre resistir la acción bactericida de las células de hospedador. Este tipo



información nos permitirá comprender mejor los mecanismos de patogénesis y persistencia de este patógeno y se espera que contribuya a la identificación de nuevos inmunógenos y estrategias preventivas más eficaces.



## Referencias

1. Sandora TJ, Gidengil CA, Lee GM. **Pertussis vaccination for health care workers.** *Clin Microbiol Rev.* 2008,21:426-434.
2. Mills KHG. **Immunity to *Bordetella pertussis*.** *Microbes and Infection* 2001,3:655-677.
3. 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.* 2000,191:1841-1852.
4. Barbic J, Leef M, Burns D, Shahin R. **Role of gamma interferon in natural clearance of *Bordetella pertussis* infection.** *Infect. Immun.* 1997,65:4904-4908.
5. 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.* 1993,61:399-410.
6. Allen L. **Intracellular niches for extracellular bacteria: lessons from *Helicobacter pylori*.** *J Leukoc Biol* 1999,66:753-756.
7. Dubois A, Boren T. ***Helicobacter pylori* is invasive and it may be a facultative intracellular organism.** *Cell Microbiol.* 2007,9:1108-1116.
8. Bower JM, Eto DS, Mulvey MA. **Covert Operations of Uropathogenic *Escherichia coli* within the Urinary Tract.** *Traffic* 2005,6:18-31.
9. Hellwig SMM, Hazenbos WLW, van de Winkel JGJ, Mooi FR. **Evidence for an intracellular niche for *Bordetella pertussis* in broncho-alveolar lavage cells of mice.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1999,26:203-207.
10. 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.* 2001,30:279-288.
11. Ewanowich CA, Melton AR, Weiss AA, Sherburne RK, Peppler MS. **Invasion of HeLa 229 cells by virulent *Bordetella pertussis*.** *Infect Immun.* 1989,57:2698-2704.
12. Friedman RL, Nordensson K, Wilson L, Akporiaye ET, Yocum DE. **Uptake and Intracellular Survival of *Bordetella pertussis* in Human Macrophages.** *Infect Immun.* 1992,60:4578-4585.
13. Manes S, del Real G, Martinez-A C. **Pathogens: raft hijackers.** 2003,3:557-568.
14. Tuomanen E, Towbin H, Rosenfelder G, Braun D, Larson G, Hansson GC, Hill R. **Receptor analogs and monoclonal antibodies that inhibit adherence of *Bordetella pertussis* to human ciliated respiratory epithelial cells.** *J Exp Med.* 1988,168:267-277.
15. Brennan M, Hannah J, Leininger E. **Adhesion of *Bordetella pertussis* to sulfatides and to the GalNAc beta 4Gal sequence found in glycosphingolipids.** *J. Biol. Chem.* 1991,266:18827-18831.
16. Lajoie P, Nabi IR. **Regulation of raft-dependent endocytosis.** *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2007,11:644-653.
17. Kansau I, Berger C, Hospital M, Amsellem R, Nicolas V, Servin AL, Bernet-Camard MF. **Zipper-Like Internalization of Dr-Positive *Escherichia coli* by Epithelial Cells**

- Is Preceded by an Adhesin-Induced Mobilization of Raft-Associated Molecules in the Initial Step of Adhesion.** *Infect Immun.* 2004,72:3733-3742.
18. Mobberley-Schuman PS, Weiss AA. **Influence of CR3 (CD11b/CD18) Expression on Phagocytosis of *Bordetella pertussis* by Human Neutrophils.** *Infect. Immun.* 2005,73:7317-7323.
  19. 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.* 1990,61:1375-1382.
  20. Rodriguez ME, Hellwig SMM, Hozbor DF, Leusen J, van der Pol W-L, van de Winkel JGJ. **Fc Receptor-Mediated Immunity Against *Bordetella pertussis*.** *J Immunol* 2001,167:6545-6551.
  21. Hellwig SM, van Oirschot HF, Hazenbos WL, van Spruel 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.* 2001,183:871-879.
  22. Peyron P, Bordier C, N'Diaye E-N, Maridonneau-Parini I. **Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins.** *J Immunol* 2000,165:5186-5191.
  23. Rodriguez NE, Gaur U, Wilson ME. **Role of caveolae in *Leishmania chagasi* phagocytosis and intracellular survival in macrophages.** *Cellular Microbiology* 2006,8:1106-1120.
  24. Masure HR. **Modulation of adenylate cyclase toxin production as *Bordetella pertussis* enters human macrophages.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992,89:6521-6525.
  25. Bromberg K, Tannis G, Steiner P. **Detection of *Bordetella pertussis* associated with the alveolar macrophages of children with human immunodeficiency virus infection.** *Infect Immun.* 1991,59:4715-4719.
  26. 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.* 2008,47:328-338.
  27. Vandebriel RJ, Hellwig SMM, Vermeulen JP, Hoekman JH, Dormans JA, Roholl PJ, Mooi FR. **Association of *Bordetella pertussis* with host immune cells in the mouse lung.** *Microbial Pathogenesis* 2003,35:19-29.
  28. Hafler JP, Pohl-Koppe A. **The cellular immune response to *Bordetella pertussis* in two children with whooping cough.** *Eur J Med Res.* 1998,3:523-526.
  29. 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.* 2004,34:2579-2588.
  30. Torre D, Ferrario G, Bonetta G, Perversi L, Tambini R, Speranza F. **Effects of recombinant human gamma interferon on intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human phagocytic cells.** *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1994,9:183-188.
  31. Mahon BP, Mills KH. **Interferon-gamma mediated immune effector mechanisms against *Bordetella pertussis*.** *Immunol Lett.* 1999,68:213-217.
  32. McGuirk P, McCann C, Mills KHG. **Pathogen-specific T Regulatory 1 Cells Induced in the Respiratory Tract by a Bacterial Molecule that Stimulates Interleukin 10**

- Production by Dendritic Cells: A Novel Strategy for Evasion of Protective T Helper Type 1 Responses by *Bordetella pertussis*.** *J. Exp. Med.* 2002,195:221-231.
33. McGuirk P, Mills K. **Direct anti-inflammatory effect of a bacterial virulence factor: IL-10-dependent suppression of IL-12 production by filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*.** *European Journal of Immunology* 2000,30:415-422.
34. Hickey FB, Brereton CF, Mills KHG. **Adenylate cyclase toxin from *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* 2008,84:234-243.
35. Ross PJ, Lavelle EC, Mills KHG, 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.* 2004,72:1568-1579.
36. Fedele G, Celestino I, Spensieri F, Frasca L, Nasso M, Watanabe M, Remoli ME, Coccia EM, Altieri F, Ausiello CM. **Lipooligosaccharide from *Bordetella pertussis* induces mature human monocyte-derived dendritic cells and drives a Th2 biased response.** *Microbes and Infection* 2007,9:855-863.
37. Finbloom D, Winestock K. **IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes.** *J Immunol* 1995,155:1079-1090.
38. Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiyama S, Yoshimura A. **A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases.** *Nature.* 1997,387:921-924.
39. Shen X, Hong F, Nguyen V-A, Gao B. **IL-10 attenuates IFN- $\alpha$ -activated STAT1 in the liver: involvement of SOCS2 and SOCS3.** *FEBS Letters* 2000,480:132-136.
40. Barrionuevo P, Cassataro J, Delpino MV, Zwerdling A, Pasquevich KA, García Samartino C, Wallach JC, Fossati CA, Giambartolomei GH. ***Brucella abortus* inhibits major histocompatibility complex class II expression and antigen processing through interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2.** *Infect Immun.* 2008,76:250-262.
41. Beaman M, Hunter C, Remington J. **Enhancement of intracellular replication of *Toxoplasma gondii* by IL-6. Interactions with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ .** *J Immunol* 1994,153:4583-4587.
42. Nagabhushanam V, Solache A, Ting L-M, Escaron CJ, Zhang JY, Ernst JD. **Innate Inhibition of Adaptive Immunity: *Mycobacterium tuberculosis*-Induced IL-6 Inhibits Macrophage Responses to IFN- $\gamma$ .** *J Immunol* 2003,171:4750-4757.
43. Pai RK, Convery M, Hamilton TA, Boom WH, Harding CV. **Inhibition of IFN- $\gamma$ -Induced Class II Transactivator Expression by a 19-kDa Lipoprotein from *Mycobacterium tuberculosis*: A Potential Mechanism for Immune Evasion.** *J Immunol* 2003,171:175-184.
44. 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.* 2003,188:738-742.
45. King AJ BG, van Oirschot HF, Hoogerhout P, Knipping K, Mooi FR. **Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity.** *Microbiology* 2001,147:2885-2895.

46. Mastrantonio P, Spigaglia P, Oirschot H, van der Heide HG, Heuvelman K, Stefanelli P, Mooi FR. **Antigenic variants in *Bordetella pertussis* strains isolated from vaccinated and unvaccinated children.** *Microbiology* 1999,145:2069-2075.

## **Anexo**

# **Protección cruzada entre las variantes antigénicas de Pertactina**





## Anexo

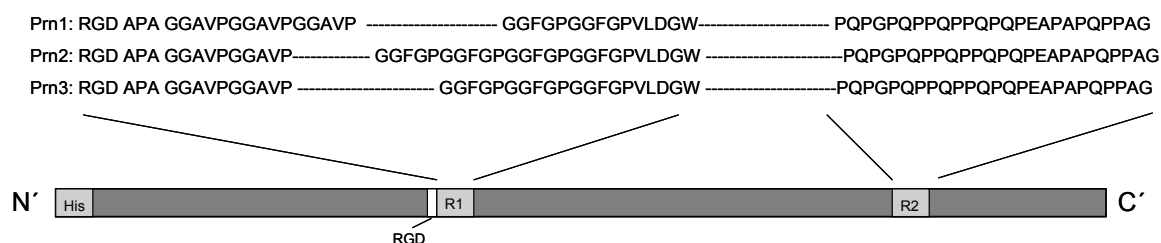
### Protección cruzada entre las variantes antigénicas de pertactina

#### 1. Introducción

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral indican que la presencia de anticuerpos opsonizantes es crucial en la protección contra pertussis. La fagocitosis de *B. pertussis* opsonizada con anticuerpos a través de receptores Fc de la célula inmune determina la activación del fagocito y el tráfico de la bacteria a compartimientos lisosomales donde es destruida. Por el contrario, la ausencia de anticuerpos determina que *B. pertussis* evada la fusión con lisosomas y sobreviva en localización intracelular contribuyendo posiblemente a la persistencia de este patógeno en el hospedador. Estudios previos de nuestro grupo indican que de los antígenos incluidos en las actuales formulaciones vacunales, Prn es el único que induce la producción de anticuerpos con actividad opsonofagocítica [1] lo que sugiere que Prn cumple un rol central en la inmunidad contra *B. pertussis*. En apoyo de estos resultados, datos obtenidos en modelos murinos y en estudios clínicos indican un rol importante de Prn en la protección. Las vacunas acelulares que contienen PT, FHA y Prn son más efectivas que aquellas que sólo contienen PT y FHA [2, 3]. Se ha encontrado que el nivel de anticuerpos anti-Prn tiene correlación con el nivel de protección [4, 5]. Por otro lado, se ha observado que tanto la inmunización pasiva como la activa con Prn, protege al vacunado [6]. En conjunto, estos estudios confirman que este antígeno tiene un rol relevante en la inducción de inmunidad protectora contra *B. pertussis*.

Pertactina es una proteína autotransportadora localizada en la superficie celular de *B. pertussis*. La estructura cristalina de Prn predice que está compuesta por hélices  $\beta$  de la cual emergen dominios que contienen motivos de secuencia asociados con la actividad biológica de la proteína [7]. Se ha observado que esta proteína de 69 kDa es altamente polimórfica encontrándose la variación principalmente limitada a dos regiones, designadas regiones 1 y 2, que contienen motivos repetitivos Gly-Gly-X-X-Pro y Pro-Gln-Pro, respectivamente (Fig. 1) [8]. La región 1 está localizada próxima al

extremo N-terminal flanqueando el motivo RGD, potencialmente involucrado en la adhesión a las células del huésped [9]. La región 2 está próxima al extremo C-terminal. Un estudio reciente indica que la región N-terminal es inmunodominante [10], mientras que la región variable 1, poco inmunogénica pero altamente flexible, es capaz de enmascarar, junto con la región C-terminal, epitopes de la región N-terminal importantes en el reconocimiento inmune [10, 11]. Un total de 13 tipos de Prn han sido identificados hasta el momento, de los cuales Prn1, Prn2 y Prn3 son los más prevalentes en la población [12]. Llamativamente, en los países donde se verificó un aumento significativo en el número de casos de tos convulsa, incluida la Argentina [13], se ha encontrado el mismo tipo de variante, Prn2. Cabe señalar que de las variantes estudiadas, Prn2 es la única contra la cual la cepa vacunal (Prn1) presenta protección deficiente en animales [6]. La región 1 de Prn2 posee una repetición GGxxP extra lo cual determina un cambio importante en la conformación respecto a Prn1. Se ha postulado que al ser esta región más larga en Prn2, es capaz de enmascarar de forma más eficiente epitopes inmunogénicos presentes en la región N-terminal [10]. Esto ha llevado a especular que como consecuencia de cinco décadas de vacunación con la misma cepa, ha habido una inmunoselección de cepas más virulentas que expresan Prn2 contra las cuales las vacunas actuales no son tan efectivas.



**Figura 1.** Estructura de las tres principales variantes de Prn. La secuencia de aminoácidos de la región variable R1 y R2 están indicadas. En la región 1, cercana al dominio N-terminal, Prn1 y Prn3 difieren en dos aminoácidos, mientras que Prn2 contiene un motivo repetitivo adicional. La región 2 próxima al extremo C terminal es idéntica en los tres tipos de variantes de Prn mostrados (Prn1, Prn2 y Prn3). RGD: Motivo Arg-Gly-Asp potencialmente involucrado en la adhesión a las células del hospedador.

Los estudios presentados en este anexo tuvieron como objetivo avanzar en la definición de la importancia epidemiológica de la divergencia de Prn y su posible rol en la reemergencia de tos convulsa. Para ello se investigó la capacidad de los anticuerpos inducidos por Prn1 (única variante vacunal) de reconocer a cepas que expresan Prn2 en ensayos de inmunoabsorción como en ensayos funcionales.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron la cepa salvaje *B. pertussis* Tohama I que expresa Prn1 y la cepa *B. pertussis* derivada de Tohama I que expresa Prn2 (B1586) [14]. Las bacterias fueron cultivadas en placas de Agar Bordet Gengou (DIFCO Laboratories, USA), suplementada con 15 % v/v de sangre desfibrinada de carnero (ABGs), durante 72 hs a 37 °C. Al cabo de este tiempo se repicó en una nueva placa ABGs y se cultivó a 37 °C durante 24 hs. Del cultivo en medio sólido se extrajo un inóculo para el cultivo en medio líquido SS a una densidad celular inicial equivalente a  $0.2 \text{ Abs}_{650 \text{ nm}}$  (30 hs, 37 °C, 160 r.p.m). Cuando los cultivos alcanzaron el estado exponencial tardío, las células fueron cosechadas por centrifugación ( $10000 \times g$  15 min a 4 °C) y utilizadas para la realización de ensayos de ELISA y de opsonofagocitosis.

### 2.2. Obtención de Prn1 y Prn2 recombinante

Las proteínas Prn1 y Prn2 recombinantes fueron obtenidas según ha sido descrito en Hijnen *et al.* [15] con algunas modificaciones. Brevemente, el marco de lectura abierto de Prn1 y Prn2 fue clonado en el vector pET-28a (Novagen, Darmstadt, Germany). Los primers utilizados fueron los siguientes:

F-5' ACACATATGGACTGGAACAACCAGTCCATCGTCAAGACCGGTG-3',

R-5' ATTGGATCCTTAGCCGCCGCGTCGCCGGTGAA-3'.

Los DNA genómicos de *B. pertussis* Tohama I que expresa Prn1 y de *B. pertussis* Tohama que expresa Prn2 (B1586) fueron utilizados como molde para la realización de la PCR con Pfu DNA polimerasa (Stratagene, La Jolla, CA). Los fragmentos de PCR conteniendo los genes de Prn1 y Prn2 fueron digeridos con las endonucleasas NdeI y BamHI (los sitios de restricción de estas enzimas fueron incluidos en los primers para facilitar el clonado) y subsecuentemente ligados dentro del vector de expresión pET-28a, digerido con NdeI y BamHI. Luego de la ligación, la mezcla fue utilizada para transformar células *E. coli* Mach1 competentes (Invitrogen, Carlsbad, CA). Posteriormente se realizó la purificación del DNA plasmídico por MiniPrep (Promega) de cultivos crecidos durante 12 horas. Los DNA plasmídicos

conteniendo el inserto fueron usados para transformar células *E. coli* BL21-Codon plus (DE3) competentes (Stratagene, La Jolla, CA). La incubación de las bacterias con 1mM de isopropil- $\beta$ -D tiogalactopiranosido (IPTG) (3 hs a 37 °C) indujo la expresión de Prn1 y Prn2 en cuerpos de inclusión. Para posibilitar su solubilización las células fueron incubadas con una solución conteniendo, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 300 mM NaCl, 8 M urea, 10 mM imidazol, pH 7,4. Las proteínas recombinantes contienen un dominio N terminal His<sub>6</sub>-Tag que permite purificarlas por cromatografía de afinidad. Ambas proteínas fueron purificadas por afinidad en una columna cargada con una resina de cobalto (HisPur<sup>TM</sup> Cobalt Resin, Pierce, Rockford, IL) equilibrada con 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 300 mM NaCl, 8 M urea, 10 mM imidazol, pH 7,4. Las proteínas unidas a la columna fueron eluidas con 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 300 mM NaCl, 8 M urea, 150 mM imidazol, pH 7,4. Las fracciones fueron analizadas mediante SDS-PAGE 12,5 %.

### 2.3. Muestras de suero

Para la realización de este estudio se utilizaron muestras de suero (gentilmente cedidas por Dr. Jussi Mertsola, National Public Health Institute, Turku, Finlandia) provenientes de adolescentes de 14 años de edad de una escuela rural del sudeste de Finlandia donde, a fines de 1996, ocurrió un brote de pertussis producido por una cepa de *B. pertussis* que expresaba Prn2 [16]. A los 11 días de detectado el primer caso en una de las aulas del establecimiento se tomaron muestras de suero de 22 alumnos y 8 semanas después de la primera muestra se tomaron las segundas muestras de suero. Los niños habían sido vacunados en su infancia con 3 dosis de vacuna celular (toxoides tetánico/diftérico/pertussis) (DTPc). La vacuna es producida en el National Public Health Institute (NPHI), Helsinki, y cada dosis contiene 20 Lf (Límite de floculación) de toxoide diftérico, 5 Lf de toxoide tetánico y  $5 \times 10^9$  bacterias *B. pertussis* (Prn1) inactivadas con formalina.

En este estudio se empleó además suero de ratón anti-Prn1 y anti-Prn2 obtenidos según se detalla a continuación. Grupos de 5 ratones hembra BALB/c de 6-8 semanas libres de patógenos fueron inmunizados subcutáneamente con 15  $\mu$ g de proteína (Prn1 o Prn2) formulada con hidróxido de aluminio [Al (OH)<sub>3</sub>] como adyuvante. Transcurridos 28 días, los ratones recibieron una nueva inmunización (refuerzo) con la respectiva proteína utilizando Al(OH)<sub>3</sub> como adyuvante. Finalmente, 42 días después de la

inoculación inicial los ratones fueron sangrados y se recuperó el suero correspondiente. Grupos de ratones inoculados con solución PBS fueron empleados como control negativo.

## 2.4. ELISA

El título de anticuerpos anti-Prn1 y anti-Prn2 fue evaluado en muestras de suero humano y en muestras de suero de ratones inmunizados con Prn1 o Prn2, según ha sido descrito en Wolfe *et al.* [17] con algunas modificaciones. Para ello, los pocillos de una placa de propileno para ELISA (Greiner Bio-One, Stonehouse, UK) fueron cubiertos con: **a)** cepas isogénicas *B. pertussis* que expresan Prn1 o Prn2 (Tohama o Bp1586) (100 µl por pocillo de suspensión bacteriana de DO<sub>650 nm</sub> 1 en PBS), o **b)** antígenos purificados de Prn1 o Prn2 (100 µl por pocillo de proteína purificada en concentración 3 µg/ml en buffer carbonato 0,04 M pH 9,6). Finalizada esta etapa, los pocillos se lavaron tres veces con solución PBS-0.05 % v/v Tween 20 (PBS-T) y se realizó el bloqueo de sitios libres remanentes con 300 µl por pocillo de una solución PBS suplementado con 10 % p/v leche en polvo descremada (PBS-L) durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Para cada suero, humano o de ratón, se realizaron 8 diluciones seriadas de orden 2 comenzando con una dilución inicial de 1/100. Las diluciones fueron preparadas en solución PBS-L suplementada con 0.05 % v/v Tween 20 (PBS-LT). Se adicionaron 100 µl de dilución de cada suero por pocillo y se incubó durante 2 hs a 28 °C en cámara húmeda. Luego de tres lavados con PBS-T, se adicionaron 100 µl por pocillo de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Pierce) o anti-IgG humano conjugado con peroxidasa (Pierce) según corresponda, diluido en PBS-LT y se incubó nuevamente durante 2 hs a 37 °C en cámara húmeda. Finalizada esta etapa, los pocillos se lavaron tres veces con PBS-T y se agregó 100 µl por pocillo de sustrato para peroxidasa, orto-fenildiamina, preparado en buffer fosfato/citrato/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1 M PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub> / 0.1 M ácido cítrico / 0.001 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Luego de 15 min la reacción se detuvo mediante el agregado de 50 µl por pocillo de solución 2 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La absorbancia se midió a 492 nm (Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer, Bio-Rad, UK). La dilución a la cual la DO<sub>492nm</sub> es igual a 0,8 fue utilizada para determinar el título del ELISA.

## 2.5. Obtención de neutrófilos

Neutrófilos de sangre periférica fueron aislados de sangre humana heparinizada utilizando gradientes de centrifugación Ficoll-Histopaque (Sigma, St. Louis, MO, USA). Los glóbulos rojos remanentes en la suspensión de polimorfonucleares (PMN) fueron removidos por lisis hipotónica logrando una pureza mayor al 95 %. La viabilidad celular se determinó por tinción vital con Trypan blue obteniéndose un nivel de viabilidad superior al 99 %. Previo a la realización de los ensayos funcionales, los neutrófilos fueron lavados dos veces con DMEM suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (Cansera, Rexdale, ON, Canada), resuspendidos y utilizados inmediatamente. Todos los experimentos descritos en este Capítulo fueron llevados a cabo utilizando neutrófilos purificados en el momento. El nivel de expresión del receptor Fc $\gamma$ RI (CD64) fue monitoreado mediante citometría de flujo utilizando el mAc anti Fc $\gamma$ RI 22 [18]. Solo fueron utilizados aquellos neutrófilos que no presentaban niveles detectables de expresión de CD64.

## 2.6. Actividad opsonofagocítica

*B. pertussis* Prn1 (Tohama) y *B. pertussis* Prn2 (Bp1586) fueron cultivadas en medio SS y utilizadas para determinar la capacidad opsonofagocítica de los anticuerpos presentes en muestras de suero humano y en muestras de suero de ratón inmunizados con Prn1 o Prn2 purificadas. Para ello, 100  $\mu$ l de bacterias (DO=1) se incubaron con 60  $\mu$ l de suero humano (diluidos 1/20 en PBS) o con 60  $\mu$ l de suero de ratón (diluidos 1/20, 1/100, 1/200 y 1/500 en PBS) durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS y las bacterias fueron incubadas con PMN durante 20 min a 4 °C. Luego de extensivos lavados a 4 °C para remover las bacterias no adheridas las muestras fueron divididas en dos alícuotas. Una alícuota fue mantenida en hielo para determinar el número inicial de bacterias adheridas al neutrófilo mientras que la otra alícuota fue incubada a 37 °C durante una hora para permitir que la fagocitosis transcurra. La fagocitosis fue detenida mediante la incubación de los neutrófilos en hielo. Posteriormente se determinó el número de bacterias asociadas a la superficie celular de los neutrófilos de ambas alícuotas mediante marcación fluorescente. Para ello, los PMN fueron incubados con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con PE (Molecular Probes, OR, USA) o fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos

de cabra anti-IgG de ratón conjugados con PE (Molecular Probes, OR, USA), según corresponda, durante 30 min a 4 °C. Con el fin de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos todas las incubaciones fueron realizadas en presencia de 25 % v/v de suero humano inactivado por calor. Las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo (BD FACSCalibur™, BD Biosciences). Las intensidades de fluorescencia en el rojo de los neutrófilos mantenidos durante 20 min a 4 °C fue utilizada como control de adhesión (Adhesión a neutrófilos, Tabla 1). El decaimiento en la fluorescencia roja luego de una hora de incubación a 37 °C reflejó el nivel de fagocitosis de las bacterias asociadas a la superficie. El porcentaje de fagocitosis fue calculado de la siguiente manera:  $PE1 \times (1 - PE2/PE1)$ , donde PE1 representa la media de la fluorescencia en PE de aquellas células mantenidas a 4 °C durante 20 min y PE2 representa la media de la fluorescencia en PE de aquellas células mantenidas durante 1 h a 37 °C.

## 2.7. Análisis estadístico

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





### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1. Estudio de la eficacia de anticuerpos inducidos por vacunación (Prn1) para reconocer una cepa que expresa Prn2.

Para la realización de este estudio se utilizaron muestras de suero provenientes de adolescentes vacunados con vacuna celular (Prn1) en su niñez y que estuvieron expuestos a un brote de pertussis causado por una cepa de *B. pertussis* (Prn2) producido dentro del establecimiento educativo al cual concurrían [16]. A los 11 días de detectado el primer caso en una de las aulas del establecimiento se tomaron muestras de sangre de todos los alumnos (primera muestra) y a las 8 semanas se extrajo nuevamente sangre (segunda muestra). Los alumnos (n=14) fueron divididos en dos grupos de acuerdo a la sintomatología clínica (ver Tabla adjunta). El primer grupo estuvo compuesto de 7 alumnos que padecieron tos paroxística sugestiva de pertussis. En 5 individuos de este grupo (S1-S5) la primera muestra de sangre fue tomada cuando los síntomas de tos ya habían comenzado, en otros 2 (S6 y S7) la primera muestra fue obtenida antes del comienzo de la tos. Los análisis del laboratorio indican que al menos 4 individuos de este grupo (S1, S4, S5 y S7) estuvieron infectados con *B. pertussis* (cultivo positivo o seroconversión positiva). Mientras que en 3 miembros de este grupo (S2, S3 y S6) la infección con *B. pertussis* no pudo ser demostrada mediante cultivo o serología. En el caso de S3, ciertos parámetros como el alto título de anticuerpos contra *B. pertussis* que presenta y la prolongada duración de los síntomas (82 días), sugieren que esta persona estuvo infectada pero la seroconversión no pudo ser detectada debido tal vez a que la primera muestra fue tomada luego de 11 días del comienzo de los síntomas, donde probablemente la respuesta inmune ya se había montado. En el segundo grupo están incluidos 7 alumnos que no tuvieron síntomas de tos durante todo el período testeado (hasta cuatro meses desde la aparición del primer caso). En este grupo, sin embargo, 2 individuos (A4 y A5) parecen haber cursado la infección de forma asintomática, según pudo ser demostrado en las pruebas de laboratorio en donde el microorganismo pudo ser en uno de los casos aislado (A4) y en el otro caso hubo seroconversión (A5).

Con el fin de evaluar si los anticuerpos correspondientes a las primeras muestras, y segundas muestras presentan un reconocimiento diferencial de las variantes Prn1 y Prn2 de *B. pertussis* se realizaron 3 tipos de ensayos en los que se evaluó:

- a) El título de anticuerpos IgG en suero, evaluado en un ELISA diseñado con proteína purificada (desnaturalizada) Prn1 o Prn2 como fase inmóvil.
- b) El título de anticuerpos IgG en suero, evaluado en un ELISA diseñado con célula entera de *B. pertussis* Prn1 o *B. pertussis* Prn2 como fase inmóvil.
- c) Actividad opsonofagocítica de los anticuerpos frente a *B. pertussis* Prn1 y *B. pertussis* Prn2. En este ensayo se evaluó la capacidad de los anticuerpos de mediar la adhesión a PMN y la posterior fagocitosis.

En los datos mostrados en la Tabla adjunta se observa que la mayoría de los adolescentes que no se infectaron (S6, A1, A2 y A6) presentaban alto título de anticuerpos anti-Prn en la primera muestra de suero, con excepción de S2, A3 y A7 los cuales, a pesar del bajo título de anticuerpos anti-*B. pertussis* y en particular anti-Prn, no estuvieron infectados, sugiriendo que este grupo probablemente no estuvo en contacto con el agente infeccioso. En contraste, en los niños en que se demostró infección con *B. pertussis*, el título de anticuerpos anti-Prn era significativamente menor (S1, S4, S5, S7, A4 y A5). Estos resultados se condicen con estudios previos que demuestran una correlación entre el título de anticuerpos anti-Prn y el nivel de protección frente al desarrollo de tos convulsa [4, 5]. En casos sintomáticos (a excepción de S2 y S6 que no presentaban infección con pertussis, y S3 cuya primera muestra posiblemente fue tomada luego de ocurrida la seroconversión) se observó una importante seroconversión entre la primera y segunda muestra con un aumento importante en el título de anticuerpos anti-Prn. Por el contrario, en la mayoría de los casos asintomáticos no hubo seroconversión y el título de anticuerpos anti-Prn tampoco se modificó.

Según se puede ver en la Tabla, no se detectaron diferencias significativas en el nivel de reconocimiento de los anticuerpos contra Prn1 y Prn2 purificada (desnaturalizadas) en las primeras y segundas muestras de suero. Estos resultados sugieren que los epitopes lineales presentes en ambas variantes de Prn purificada son igualmente reconocidos por los anticuerpos inducidos por vacunación (primera muestra) y los anticuerpos producidos post-infección (segunda muestra). Cuando se utilizó célula entera para sensibilizar la placa de ELISA tampoco se observaron diferencias

significativas en el nivel de reconocimiento de los anticuerpos contra *B. pertussis* Prn1 y *B. pertussis* Prn2, a excepción de algunas muestras en donde parece haber un leve incremento en el reconocimiento de Prn1 respecto a Prn2 (S1, S6 y S7) evidente principalmente en las primeras muestras de suero. Es importante destacar que en los ELISAs realizados empleando célula entera, si bien Prn se encuentra en conformación nativa, son reconocidos numerosos antígenos de *B. pertussis* lo que quizás enmascara la existencia de un reconocimiento diferencial de epitopes conformacionales de Prn presentes en las variantes Prn1 y Prn2.

Trabajos previos indican que de los anticuerpos producidos por las vacunas celulares y acelulares, sólo los anticuerpos anti-pertactina son capaces de mediar la opsonización de la bacteria y su posterior fagocitosis a través de receptores Fc de la célula inmune [1]. Por el contrario, anticuerpos anti-Fimbria, anti-FHA o anti-PT no poseen actividad opsonizante. Por esta razón, se evaluó la actividad opsonofagocítica de los sueros en estudio empleando para ello ambos tipos de variantes de *B. pertussis*. Se estudió tanto la capacidad de los anticuerpos de mediar la adhesión a células polimorfonucleares (PMN) como la de inducir fagocitosis (ver Tabla adjunta). Los resultados indican que, en general, aquellos individuos que se infectaron con *B. pertussis* (S1, S4, S5, S7, A4 y A5), presentaban en las primeras muestras una baja actividad opsonofagocítica que se correlaciona con el bajo título de anticuerpos anti-Prn que presentaban. Además, este grupo presentó tanto en la primera como en la segunda muestra una menor capacidad de mediar la adhesión a neutrófilos que se tradujo en una fagocitosis menor de *B. pertussis* Prn2 respecto a *B. pertussis* Prn1, sugiriendo que existe un reconocimiento diferencial de ambas cepas y que estos individuos estaban menos protegidos contra la infección con *B. pertussis* Prn2. En contraste, en aquellos individuos en los que el título de anticuerpos anti-Prn era elevado y no se infectaron (S6, A1, A2, A6), la adhesión a neutrófilos y el nivel de fagocitosis fue elevado tanto en el caso de *B. pertussis* Prn1 como *B. pertussis* Prn2, no observándose diferencias significativas entre ambas variantes en la mayoría de los casos. Tampoco se observaron diferencias significativas en S3 que presenta un alto título anti-Prn. Estos resultados sugieren que cuando el título de anticuerpos anti-Prn es elevado, la protección que confieren los anticuerpos anti-Prn producidos por vacunación es suficiente para evitar la infección producida por cepas que expresan Prn2. Esto está de acuerdo con trabajos recientes que indican que la variación en pertactina no constituiría un problema en individuos altamente inmunizados [19]. En cambio, cuando el título de anticuerpos anti-

Prn es bajo se pone de manifiesto que en realidad existe un reconocimiento diferencial de las variantes de Prn. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos llevados a cabo en modelos murinos de infección que indican que sólo cuando los ratones son inmunizados con bajas dosis de Prn1, que inducen niveles bajos de anticuerpos, se observan diferentes niveles de protección frente a aislados de *B. pertussis* que expresan diferentes variantes de Prn [6]. Las razones de estas diferencias no han sido esclarecidas, sin embargo, se puede especular que cuando el título de anticuerpos es suficientemente elevado las diferencias antigénicas quedan compensadas por el alto número de anticuerpos circundantes capaces de opsonizar diferentes zonas de la proteína. Estos resultados sugieren que la divergencia antigénica en Prn podría tener consecuencias desfavorables en la protección cuando la inmunidad conferida por vacunación comienza a declinar (a los 4-5 años post vacunación) contribuyendo posiblemente a la reemergencia de pertussis en la población adulta.

### 3.2. Estudio de la reactividad cruzada de anticuerpos anti-Prn1 y anti-Prn2 de ratón inmunizados con Prn1 y Prn2 purificada.

Nuestros resultados sugieren que los epitopes conformacionales, ausentes en las proteínas purificadas desnaturalizadas, están probablemente involucrados en el reconocimiento diferencial. Para evaluar esta posibilidad se inmunizaron ratones con Prn1 o Prn2 recombinante purificada (desnaturalizada). Se evaluó, al igual que se hizo con las muestras de suero humano, el título de anticuerpos anti-Prn1 y anti-Prn2 en ELISAs con Prn1 o Prn2 purificada (desnaturalizada) fase inmóvil, o célula entera de *B. pertussis* Prn1 o *B. pertussis* Prn2 como fase inmóvil. Se evaluó además la actividad opsonofagocítica de cada suero contra *B. pertussis* Prn1 o *B. pertussis* Prn2. Debido a que el reconocimiento diferencial de las variantes de Prn parece depender, al menos en parte, del título de anticuerpos anti-Prn (Tabla adjunta), los ensayos de opsonofagocitosis fueron realizados utilizando distintas diluciones de suero. En ninguno de estos ensayos se observaron diferencias significativas en el nivel de reconocimiento de Prn1 respecto a Prn2, tanto en los títulos obtenidos por ELISA como en las pruebas funcionales empleando neutrófilos purificados a ninguna de las diluciones ensayadas. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los epitopes conformacionales están involucrados en el reconocimiento diferencial de Prn1 respecto a Prn2. De acuerdo con estos resultados, trabajos previos demostraron que anticuerpos monoclonales dirigidos

contra epitopes conformacionales dependientes de la región variable 1 se unen de forma diferencial a los diferentes tipos de Prn mientras que aquellos monoclonales que reconocen epitopes lineales dentro de la región variable 1 se unen de forma similar a todas las variantes de pertactina de *B. pertussis* [6]. Se ha sugerido que la variación en la región 1 afecta la respuesta de anticuerpos dirigidos contra la región N-terminal, la cual es altamente inmunogénica [11]. En el caso de Prn2, al ser la región 1 más larga que la de Prn1, sería capaz de enmascarar epitopes conformacionales de la región N-terminal contribuyendo a un menor reconocimiento [19]. En humanos, se ha encontrado que los anticuerpos que presentan mayor avidez por Prn son los inducidos contra epitopes conformacionales [20] lo cual avala los resultados anteriores en los que sólo se observó una menor actividad opsonofagocítica frente a *B. pertussis* Prn2 respecto a *B. pertussis* Prn1 cuando se utilizaron sueros humanos con bajo título contra Prn y no cuando se utilizaron sueros de ratón inmunizados con Prn desnaturalizada. En estudios futuros se prevén realizar inmunizaciones con Prn purificada y refoldada lo que permitirá evaluar mejor el rol de los epitopes conformacionales en el reconocimiento diferencial de las variantes de Prn.

En resumen, estos estudios, aunque preliminares, sugieren que la variación antigénica de pertactina podría tener un rol importante en la infección de individuos en los cuales el título de anticuerpos contra pertactina es bajo. En estos casos se observó una significativa reducción en la capacidad opsonofagocítica de los anticuerpos producidos por la cepa vacunal contra *B. pertussis* Prn2 lo que podría determinar que las cepas que expresan Prn2 tengan más probabilidades de ser fagocitadas a través de receptores que no inducen actividad celular bactericida contribuyendo a la persistencia de esta variante en la población. El incremento a nivel mundial de cepas que expresan Prn2 parece apoyar esta hipótesis.



| Muestra        | Días entre la primera muestra y el comienzo de la tos | Diagnóstico de infección con <i>B. pertussis</i> |                  | Título de anticuerpos IgG en primera/segunda muestra* contra |           | Título de anticuerpos IgG en primera/segunda muestra* contra |                          |               |
|----------------|---|--|------------------|--|-----------|--|--------------------------|---------------|
|                |   | Cultivo  | Seroconversión † | Prn 1  | Prn2      | <i>B. pertussis</i> Prn1                                     | <i>B. pertussis</i> Prn2 |               |
| Paciente, sexo | Sintomáticos  |  |                  |  |           |  |                          |               |
|                | S1, M   | -6‡ (124)Δ                                       | Positivo         | Positiva   | 100/600   | 100/800  | 600/12800                | 400/12800     |
|                | S2, F   | -21 (32)   | Negativo         | Negativa   | 50/50     | 50/50  | 800/800                  | 800/800       |
|                | S3, M   | -11 (82)   | Negativo         | Negativa   | 600/600   | 600/800  | >12800/>12800            | >12800/>12800 |
|                | S4, M   | -9 (14)  | Negativo         | Positiva   | 100/400   | 200/800  | 400/3200                 | 400/3200      |
|                | S5, F   | -2 (84)  | Negativo         | Positiva   | 25/150    | 25/300   | 300/12800                | 300/12800     |
|                | S6, M   | +1 (19)  | Negativo         | Negativa   | 600/350   | 800/400  | 6400/3200                | 3200/2800     |
|                | S7, F   | +10 (17)   | Negativo         | Positiva   | 100/1700  | 75/3400  | 600/5800                 | 400/3200      |
|                | Asintomáticos   |  |                  |  |           |  |                          |               |
|                | A1, M   | 0  | Negativo         | Negativa   | 6400/6400 | 12800/12800  | 48000/48000              | 36000/36000   |
|                | A2, M   | 0  | Negativo         | Negativa   | 2400/2400 | 3200/3200  | 12800/12800              | 12800/12800   |
|                | A3, M   | 0  | Negativo         | Negativa   | 50/25     | 400/200  | 1000/1200                | 1000/1200     |
|                | A4, F   | 0  | Positivo         | Negativa   | 100/100   | 150/150  | 600/1400                 | 500/1600      |
|                | A5, M   | 0  | Negativo         | Positiva   | 50/200    | 100/200  | 600/3200                 | 600/3200      |
| A6, M          | 0   | Negativo   | Negativa         | 2200/1600  | 2200/1600 | 12800/12800  | 12800/12800              |               |
| A7, F          | 0   | Negativo   | Negativo         | 150/300  | 150/300   | 800/800  | 800/800                  |               |

\* La segunda muestra fue tomada 8 semanas después de la primera muestra de suero.

† Seroconversión se define como positiva si existe un incremento de la menos 4 veces en el título de anticuerpos entre la segunda y primera muestra.

‡ Menos (-) significa cuántos días pasaron entre el comienzo de la tos y la toma de la primera muestra, mas (+) significa días que pasaron entre la toma de la primera muestra y el comienzo de la tos.

Δ Números en paréntesis indican la duración de la tos.

| Muestra           | Días entre la primera muestra y el comienzo de la tos | Diagnóstico de infección con <i>B. pertussis</i> |                | Actividad opsonofagocítica primera/segunda* muestra |                          |                            |                          |           |
|-------------------|---|--|----------------|---|--------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------|
|                   |   |  |                | Adhesión a PMN <sup>a</sup>                         |                          | Fagocitosis % <sup>b</sup> |                          |           |
|                   |   | Cultivo  | Seroconversión | <i>B. pertussis</i> Prn1                            | <i>B. pertussis</i> Prn2 | <i>B. pertussis</i> Prn1   | <i>B. pertussis</i> Prn2 |           |
| Paciente,<br>sexo | Sintomáticos  |  |                |   |                          |                            |                          |           |
|                   | S1, M   | -6‡ (124)Δ                                       | Positivo       | Positiva  | 68/560                   | 4,5/37                     | 20/431                   | 0/104     |
|                   | S2, F   | -21 (32)   | Negativo       | Negativa  | 96/46                    | 10/10                      | 25/0                     | 0/0       |
|                   | S3, M   | -11 (82)   | Negativo       | Negativa  | 535/702                  | 909/966                    | 385/582                  | 818/830   |
|                   | S4, M   | -9 (14)  | Negativo       | Positiva  | 39/463                   | 6/36                       | 0/254                    | 1/26      |
|                   | S5, F   | -2 (84)  | Negativo       | Positiva  | 57/3247                  | 4,7/1811                   | 3/2857                   | 0,5/1430  |
|                   | S6, M   | +1 (19)  | Negativo       | Negativa  | 264/273                  | 250/303                    | 130/420                  | 230/380   |
|                   | S7, F   | +10 (17)   | Negativo       | Positiva  | 98/496                   | 4,5/362                    | 8/288                    | 0/46      |
|                   | Asintomáticos   |  |                |   |                          |                            |                          |           |
|                   | A1, M   | 0  | Negativo       | Negativa  | 2343/3446                | 1419/980                   | 1921/2481                | 1305/2257 |
|                   | A2, M   | 0  | Negativo       | Negativa  | 2930/2643                | 3950/3270                  | 1505/2379                | 3357/2616 |
|                   | A3, M   | 0  | Negativo       | Negativa  | 85/445                   | 5/5                        | 9/311                    | 1/1       |
|                   | A4, F   | 0  | Positivo       | Negativa  | 88/225                   | 4/20                       | 18/110                   | 0/6       |
|                   | A5, M   | 0  | Negativo       | Positiva  | 89/445                   | 5/73                       | 13/311                   | 0/51      |
| A6, M             | 0   | Negativo   | Negativa       | 4621/5424   | 1112/1508                | 4205/5044                  | 745/1085                 |           |
| A7, F             | 0   | Negativo   | Negativo       | 116/1161  | 7/79                     | 13/929                     | 1/325                    |           |

<sup>a</sup> Bacterias opsonizadas con suero correspondiente a la primera/segunda muestra fueron incubadas con PMN durante 20 min a 4 °C. Las bacterias adheridas fueron marcadas con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con PE y analizadas por citometría de flujo. Se muestran valores de fluorescencia media asociada a PMN representativos de tres experimentos independientes.

<sup>b</sup> Bacterias opsonizadas con suero correspondiente a la primera/segunda muestra fueron incubadas con PMN durante 20 min a 4 °C y divididas en dos alícuotas. Una de las alícuotas fue mantenida a 4 °C y la otra fue incubada a 37 °C durante 1h. Las bacterias adheridas a la superficie de los PMN fueron marcadas con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con PE y las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. El porcentaje de fagocitosis se define como PE1\* (1-PE2/PE1) donde PE1 representa la media geométrica de las muestras mantenidas a 4 °C y PE2 representa la media geométrica de las muestras incubadas a 37 °C.



## Referencias

1. 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.* 2003,188:738-742.
2. Cherry JD. **Comparative efficacy of acellular pertussis vaccines: an analysis of recent trials.** *Pediatr Infect Dis J.* 1997,16:S90-96.
3. Cherry J, Heininger U. **Pertussis and other *Bordetella* infections.** In R. D. Feigin, J. D. Cherry, G. J. Demmler, and S. Kaplan (ed.), *Textbook of pediatric infectious diseases, 5th ed.* The W. B. Saunders Co, Philadelphia, Pa. 2004:1588-1608.
4. Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, Stehr K. **A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses.** *Vaccine* 1998,16:1901-1906.
5. Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. **Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*.** *Vaccine* 1998,16:1907-1916.
6. King AJ BG, van Oirschot HF, Hoogerhout P, Knipping K, Mooi FR. **Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity.** *Microbiology* 2001,147:2885-2895.
7. Emsley P, Charles IG, Fairweather NF, Isaacs NW. **Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin.** *Nature.* 1996,381:90-92.
8. Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, van der Heide HGJ, Gaastra W, Willems RJL. **Polymorphism in the *Bordetella pertussis* Virulence Factors P.69/Pertactin and Pertussis Toxin in The Netherlands: Temporal Trends and Evidence for Vaccine-Driven Evolution.** *Infect. Immun.* 1998,66:670-675.
9. 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.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991,88:345-349.
10. Hijnen M. **The *Bordetella pertussis* protein pertactin: role in immunity and immune evasion.** *Doctoral Thesis* 2006.
11. Hijnen M, de Voer R, Mooi FR, Schepp R, Moret EE, van Gageldonk P, Smits G, Berbers GA. **The role of peptide loops of the *Bordetella pertussis* protein P.69 pertactin in antibody recognition.** *Vaccine* 2007,25:5902-5914.
12. Mooi FR, Hallander H, Wirsing von Konig CH, Hoet B, Guiso N. **Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000,19:174-181.
13. Fingermann M, Fernandez J, Sisti F, Rodríguez 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* 2006,24:3513-3521.
14. Stenger RM, Poelen MCM, Moret EE, Kuipers B, Bruijns SC, Hoogerhout P, Hijnen M, King AJ, Mooi FR, Boog CJ, van Els CA. **Immunodominance in Mouse and Human CD4+ T-Cell Responses Specific for the *Bordetella pertussis* Virulence Factor P.69 Pertactin.** *Infect. Immun.* 2009,77:896-903.

15. Hijnen M, van Gageldonk PG, Berbers GA, van Woerkom T, Mooi FR. **The *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin retains its immunological properties after overproduction in *Escherichia coli*.** *Protein Expr Purif.* 2005,41:106-112.
16. Tran Minh NN, He Q, Edelman K, Olander RM, Viljanen MK, Arvilommi H, Mertsola J. **Cell-mediated immune responses to antigens of *Bordetella pertussis* and protection against pertussis in school children.** *Pediatr Infect Dis J.* 1999,18:366-370.
17. Wolfe DN, Goebel EM, Bjornstad ON, Restif O, Harvill ET. **The O Antigen Enables *Bordetella parapertussis* To Avoid *Bordetella pertussis*-Induced Immunity.** *Infect. Immun.* 2007,75:4972-4979.
18. Repp R, Valerius T, Sandler A, Gramatzki M, Iro H, Kalden JR, Platzer E. **Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor.** *Blood* 1991,78:885-889.
19. Hijnen M, He Q, Schepp R, Van Gageldonk P, Mertsola J, Mooi FR, Berbers GA. **Antibody responses to defined regions of the *Bordetella pertussis* virulence factor pertactin.** *Scand J Infect Dis.* 2008,40:94-104.
20. Hijnen M, Mooi FR, van Gageldonk PGM, Hoogerhout P, King AJ, Berbers GAM. **Epitope Structure of the *Bordetella pertussis* Protein P.69 Pertactin, a Major Vaccine Component and Protective Antigen.** *Infect. Immun.* 2004,72:3716-3723.