



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

Tesis Doctoral

Biofilm como forma de vida de *Bordetella pertussis* en su hospedador. Diferencias fenotípicas y en la capacidad de adhesión y formación de biofilm entre cepas de referencia y aislados clínicos. Identificación de moléculas de Quórum Sensing.

DIEGO GABRIEL NOSEDA

OSVALDO YANTORNO
Director

2011

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS, PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, SE REALIZÓ EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CINDEFI-CONICET-CCT La Plata), DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA; BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. OSVALDO MIGUEL YANTORNO.

RECONOCIMIENTO

MI RECONOCIMIENTO AL CONCEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS (CONICET), A LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA Y AL CINDEFI POR HABERME BRINDADO LA POSIBILIDAD DE REALIZAR ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL.

DEDICATORIAS

*A Claudia, mi gran amor,
A mis padres, Maisie y Daniel,
A mis hermanos y sobrinos,
Por su infinita ayuda y apoyo.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer especialmente al Dr. Osvaldo Yantorno por aceptarme en su laboratorio para realizar este trabajo de tesis bajo su dirección y por compartir durante todo este tiempo su valiosa experiencia y conocimientos. Por transmitirme toda su confianza y permanente apoyo a lo largo de este trabajo de investigación.

Extiendo mi agradecimiento al Dr. Diego Serra por brindarme desde mi llegada al laboratorio toda su ayuda, entusiasmo y comprensión. Por compartir conmigo sus conocimientos y valiosa experiencia en todos los temas relacionados con *Bordetella*.

Agradezco también a la Dra. Alejandra Bosch por transmitirme generosamente todos sus conocimientos, en especial en la temática de espectroscopía IR. Por toda su colaboración y constante apoyo durante este trabajo de Tesis.

Asimismo, quiero agradecer a la Dra. María Eugenia Rodríguez por brindarme su ayuda en temas relacionados con metodologías de laboratorio.

Quiero agradecer también a mis compañeros de laboratorio, quiénes me acompañaron de manera agradable y placentera a lo largo de estos años:

A Yanina, por ofrecerme su valiosa ayuda en el laboratorio, compartiendo sus conocimientos y experiencias en temáticas asociadas a *Bordetella*.

A Pablo, por su gran amistad y compañerismo durante estos años en el laboratorio. Por estar siempre dispuesto a escucharme y ayudarme en lo que necesitara.

A Claudia, Laura, y Alejandro, por haberme ayudado con cuestiones relacionadas a protocolos en el laboratorio durante estos años de experimentos.

A Jime, Natalia, Hugo y Juan, por su buena onda y contagiosa motivación en el trabajo.

A Julio, por enseñarme detalles técnicos metodológicos y por su grato compañerismo.

A Bárbara y Gonzalo, por su colaboración y compañerismo en el laboratorio.

A Alberto Ramos, por su amistad y por la experiencia y conocimientos transmitidos durante su estadía en el grupo.

A los demás compañeros del CINDEFI, por ofrecerme su ayuda en lo que precisara. Por estar siempre dispuestos a compartir generosamente equipos y reactivos.

Al Director del CINDEFI, el Dr. Edgardo Donati, por permitirme trabajar y llevar a cabo el doctorado en este Instituto.

Quiero agradecer asimismo al Dr. Claudio Valverde de la UNQ, por sus aportes en aspectos vinculados al tema de Quórum Sensing.

También agradezco al Dr. Damián Marino del CIMA, por su importante colaboración y orientación en los estudios cromatográficos mediante HPLC MS/MS-MRM.

Mi agradecimiento del mismo modo, al Ing. Paul Vargas del CEQUINOR, por su notable ayuda en los ensayos aplicando cromatografía gaseosa-espectroscopía de masas.

Agradezco también al Lic. Esteban González (CPA-CONICET), por compartir sus conocimientos teórico-prácticos en el área de cromatografía.

Un agradecimiento especial a mi familia y amigos, por su incondicional apoyo y contención en cada momento de mi vida:

A mis padres, Maisie y Daniel, por ser ambos grandes ejemplos de perseverancia, esfuerzo y voluntad. Gracias por enseñarme a levantarme luego de cada caída, para poder así concretar mis objetivos. Por apoyarme incondicionalmente en todos mis proyectos y desafíos. Gracias por todo su amor y entrega constante. Los quiero mucho!

A mis hermanos, Miguel, Cecilia, Mariana y Alejandra, por caminar junto a mí desde siempre. Por alentarme permanentemente en mis decisiones y proyectos. Gracias por enseñarme que con esfuerzo y constancia se pueden alcanzar los objetivos. Por los hermosos sobrinos que me dieron.

A todos mis sobrinos, por generar constantemente lindos momentos de alegría y felicidad. Gracias por darme siempre tantas satisfacciones y por el estímulo para continuar.

A mi cuñada Eugenia y a mis cuñados Pablo y Sergio, por transmitirme siempre su entusiasmo y por interesarse en mis proyectos.

A mis amigos de toda la vida: Hernán, Sergio, Nacho, Federico e Iván, por estar siempre en las buenas y en las malas. Gracias por escucharme y brindarme su apoyo durante estos años de amistad, compartiendo tantos momentos de alegrías.

A Claudia, mi gran amor, gracias por estar en cada instante a mi lado más allá de las distancias. Por apoyarme y darme fuerzas incesantemente. Gracias por alentarme en todo momento para que yo pudiera seguir adelante con la Tesis. Por tu comprensión, confianza e infinito cariño. Gracias por compartir siempre mis proyectos y dejarme compartir los tuyos también. Por ser el motor para que yo pudiera concretar todos mis desafíos. Claudia, a vos va dedicado este trabajo de Tesis.

CONTENIDO

	Página
Lista de Abreviaturas	xi
 CAPÍTULO I	
Introducción general	1
 CAPÍTULO II	
Diferenciación fenotípica entre aislados clínicos y cepas de referencia de <i>Bordetella pertussis</i> mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier	33
 CAPÍTULO III	
Crecimiento en biofilm de aislados clínicos y de la cepa de referencia <i>Bordetella pertussis</i> Tohama I.....	81
 CAPÍTULO IV	
Detección e identificación de moléculas señal de Quórum Sensing del tipo Acil-homoserín lactonas en <i>Bordetella pertussis</i>	131
 Discusión General	 235

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Azul de alcian
A ₅₉₀	Absorbancia a 590 nm
Abs IR	Absorbancia Infrarrojo
ABGs	Agar Bordet-Gengou suplementado
ACT	Toxina Adenilato ciclasa
AHL	Acil-homoserín lactona
AJC	Análisis Jerárquico de Clusters
AI-1	Autoinductor de tipo 1
AI-2	Autoinductor de tipo 2
Alc	Alcalignina
AT	Medio de cultivo para <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BHA	Agar cerebro-corazón
BrkA	Factor de resistencia a complemento
BvgAS	Sistema de 2 componentes de <i>BvgAS</i> (<i>Bordetella virulence genes</i>)
BvgA	Activador transcripcional de los genes de virulencia de <i>Bordetella</i>
Bvg ⁺	Fase virulenta
Bvg ⁻	Fase avirulenta
Bvg ⁱ	Fase intermedia
BvgS	Sensor de los genes de virulencia de <i>Bordetella</i>
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, Estados Unidos
CIP	Colección del Instituto Pasteur, Francia
CV	Cristal violeta
Da	Dalton
DC	Células dendríticas
DNT	Toxina Dermonecrótica
DO ₆₅₀	Densidad óptica a 650 nm
DTPa	Vacuna acelular compuesta por antígenos purificados (<u>D</u> ifteria, <u>T</u> etano, <u>P</u> ertussis acelular)
DTPc	Vacuna formulada con toxoide diftérico y tetánico, y células de <i>B. pertussis</i> detoxificadas
DTPcHib	Vacuna cuádruple compuesta por los toxoides diftérico y tetánico, células de <i>B. pertussis</i> detoxificadas y el polisacárido de <i>Haemophilus influenzae</i> serotipo b
DMSO	Dimetil sulfóxido
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
EPS	Sustancia polimérica extracelular
FHA	Hemoaglutinina Filamentosa
Fim	Fimbria
FT-IR	Infrarrojo con transformada de Fourier
GC/EI-MS	Cromatografía gaseosa con ionización electrónica-espectroscopía de masas

HSL	Homoserín lactona
HCT	Homocisteín tiolactona
IFN- γ	Interferón gamma
IR	Infrarrojo
KPa	Kilo Pascales
LB	Luria-Bertani
LSC	Cromatografía Líquido sólido
LPS	Lipolisacarido
MØ	Macrófagos
μ	Velocidad específica de crecimiento
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
NCBI	Centro Nacional de Información en Biotecnología
NK	Células <i>natural killer</i>
NO	Oxido nítrico
NT	Células <i>T naive</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
PME	Proteína de membrana externa
Prn	Pertactina
PT	Toxina pertussis
QS	Quorum sensing
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SIM	Monitoreo ión selectivo
SS	Medio de cultivo Stainer-Scholte
TcfA	Factor de colonización traqueal
TCT	Citotoxina traqueal
TLC	Cromatografía en placa delgada
μ	Velocidad específica de crecimiento
UFC	Unidad formadora de colonia
UV	Ultravioleta
V	Volts
vag	Genes activados en virulencia (<i>virulence activated genes</i>)
vrg	Genes reprimidos en virulencia (<i>virulence repressed genes</i>)
ZnSe	Seleniuro de Zinc

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

ÍNDICE DEL CAPÍTULO I	Página
I.1- TOS CONVULSA	5
I.1.1- Marco Histórico.....	5
I.1.2- Epidemiología	5
I.1.2.1- <i>Incidencia en el mundo</i>	5
I.1.2.2- <i>Incidencia en la Argentina</i>	7
I.1.2.3- <i>La reemergencia</i>	8
I.1.3- Manifestaciones Clínicas	9
I.1.4- Diagnóstico	10
I.1.5- El género <i>Bordetella</i>	11
I.1.6- Sistema de Regulación BvgAS y Fases de Virulencia	13
I.1.7- Factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS.....	15
I.1.8- Factores de virulencia no regulados por el sistema BvgAS.....	17
I.1.9- Patogénesis.....	19
I.1.10- Inmunidad	20
I.1.11- Vacunas y vacunación	21
I.1.12- Tratamiento	22
I.2- OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS	23
I.3- REFERENCIAS	26

I.1- TOS CONVULSA

I.1.1- Marco Histórico

La tos convulsa o pertussis es una enfermedad altamente contagiosa del tracto respiratorio humano, causada por varias especies de bacterias Gram-negativas del género *Bordetella*. Las especies de *Bordetella* que han sido asociadas con esta enfermedad son: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* y *B. holmesii* (1). De las cuatro especies, *B. pertussis* es la que ocasiona mayor morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Esta bacteria es un patógeno estrictamente humano del cual no se conocen reservorios animales o ambientales, transmitiéndose al inhalar microgotas provenientes del estornudo o tos de una persona infectada. Pertussis es una de las principales causas de mortalidad infantil que provocada por una enfermedad inmunoprevenible. La enfermedad fue descrita por primera vez por Baillou luego de una epidemia en París en 1578 (2). En el año 1679, Sydenham denominó pertussis (*per*, intensa + *tusis*, tos) a esta enfermedad respiratoria que afectaba a lactantes y niños provocando en muchos casos la muerte. Bordet y Gengou reportaron por primera vez el aislamiento de *B. pertussis* a partir de esputo de pacientes en 1906 (3). Desde entonces la enfermedad ha recibido diversos nombres según las épocas y lugares. En nuestro país fue conocida como tos ferina, pertussis o coqueluche, sin embargo actualmente se la reconoce como tos convulsa en referencia a los violentos episodios de tos característicos de la misma. Debido a que pertussis fue una enfermedad severa en infantes, el desarrollo de vacunas comenzó apenas se consiguió cultivar el microorganismo en el laboratorio (4). Entre los años 1914 y 1923, Hess, Luttinger y Madsen llevaron a cabo los primeros ensayos de vacunación anti-pertussis (5). De esta forma la primera vacuna desarrollada contra la enfermedad conteniendo bacterias enteras inactivadas, fue introducida en los Estados Unidos en la década de 1940 generalizándose su uso a partir de la década de 1950. Problemas asociados a la reactogenicidad de la vacuna a células enteras promovieron el desarrollo de vacunas acelulares compuestas por antígenos purificados. La primera vacuna anti-pertussis acelular fue introducida en Japón en 1981 (6) y posteriormente adoptada con diferentes modificaciones en su formulación por diversos países industrializados.

I.1.2- Epidemiología

I.1.2.1- Incidencia en el mundo

Pertussis es una enfermedad de incidencia mundial con picos de aparición cada dos a cinco años. Es una enfermedad altamente contagiosa, con tasas de contagio entre los contactos

familiares susceptibles de hasta 90% y entre 50% y 80% en ámbitos escolares (7). Afecta principalmente a niños menores de 5 años y con potencial gravedad, mayor riesgo de complicaciones y mortalidad a menores de 6 meses. Estos adquieren usualmente la enfermedad de niños mayores o adultos que pueden ser agentes de transmisión asintomáticos o presentar tos atribuida a otras etiologías (8).

Antes de la introducción de la vacuna celular, en las décadas de 1940 y 1950, la enfermedad era una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en infantes y niños en todo el mundo. Durante las décadas de 1920 y 1930, en los Estados Unidos el número de casos anuales ascendía a más de 175.000 y el número de muertes rondaba las 8.000 (9). La incidencia anual promedio para dicho país durante ese periodo correspondía a 157 casos por 100.000 habitantes (10).

La introducción de la vacuna a células enteras generó una drástica disminución en la incidencia de pertussis entre las décadas de 1940 y 1970 en todo el mundo (11). En los Estados Unidos, en 1976, la incidencia anual fue de 1 caso por cada 100.000 habitantes (10). Sin embargo a pesar del sostenido incremento en las tasas de vacunación, en los últimos 20 años se ha observado un notorio aumento de la incidencia de pertussis a nivel mundial, lo que ha llevado a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a declarar esta enfermedad como reemergente. La OMS reporta en los últimos años entre 30 y 50 millones de casos anuales en todo el mundo, de los cuales entre 200.000 y 400.000 pacientes han tenido un desenlace fatal (12). Asimismo, según esta organización, pertussis ocupa el quinto puesto en mortalidad infantil causada por una enfermedad prevenible por vacunación.

Concomitantemente con la reemergencia de la enfermedad en los últimos años se ha observado un notorio incremento del número de casos reportados en adolescentes y adultos, registrándose además manifestaciones clínicas atípicas, las cuales hacen evidente un creciente carácter persistente de la enfermedad (12). Datos obtenidos por el Centro para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) indicaron que en 2004 el número de casos aumentó 19 veces en personas entre 10 y 19 años y 16 veces en personas mayores de 20 años respecto del período 1990-1993 (13). Estos estudios han llevado a especular que la infección con *B. pertussis* es en realidad endémica en adolescentes y adultos (11, 14). El cambio en la prevalencia de la enfermedad hacia individuos de mayor edad, es una característica destacada del resurgimiento de pertussis en todo el mundo (13). Estudios recientes indican que los adolescentes y adultos infectados conforman un reservorio importante del patógeno y que estos individuos constituyen la fuente de transmisión para

lactantes y niños parcialmente inmunizados (7, 12). La localización de *B. pertussis* en estos portadores aún se desconoce.

I.1.2.2- Incidencia en la Argentina

Con la introducción en nuestro país de la vacuna a células enteras, durante la década de 1970, la incidencia de tos convulsa descendió marcadamente pero manteniendo oscilaciones trianuales. En el año 1972 la tasa de notificación en Argentina fue de 157 casos por cada 100.000 habitantes, mientras que en el año 2000 fue de 1,56 casos cada 100.000 habitantes (15). Sin embargo a partir del año 2003 comienza a registrarse un drástico incremento en la incidencia de la enfermedad en adolescentes y adultos de todo el país a pesar de la elevada cobertura de vacunación en la población (16). El número de casos de pertussis reportados en el mencionado año fue de 624, mientras que en el 2008 esta cifra aumentó a 3250. En relación a esta información se observó que la mayor tasa de notificación de la enfermedad se mantuvo en la población infantil menor de 6 meses con esquemas de vacunación incompleta. Sin embargo también se registró un incremento en el número de casos en adolescentes y adultos de diferentes edades (16). En la Figura 1 se muestra el número de casos de pertussis reportados en Argentina desde el año 1999 hasta el año 2008. A partir del año 2008, con el aumento que se venía produciendo en la tasa de vacunación se registra en nuestro País una importante disminución en el número de casos informados, que se prolonga hasta el año 2010. En el año 2009 se establece la obligatoriedad de aplicar una nueva dosis de refuerzo a los 11 años, con una vacuna acelular. Sin embargo el número de casos se vuelve a

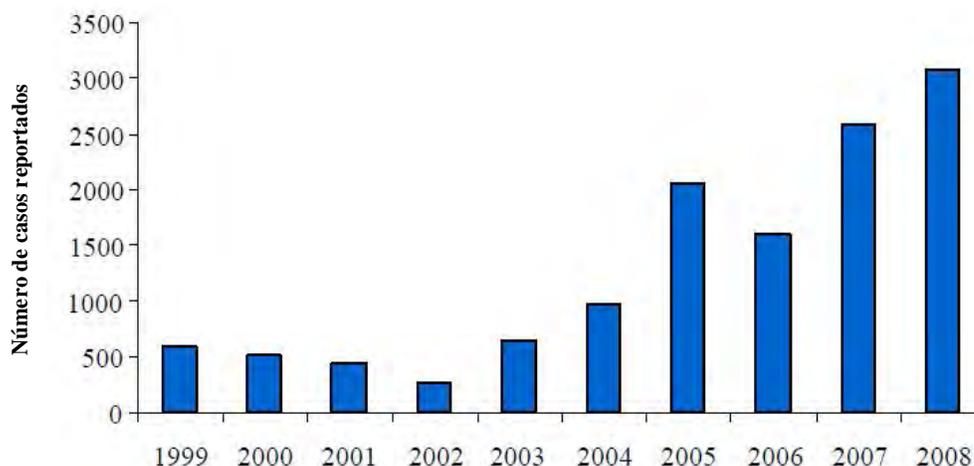


Fig. 1. Número de casos de pertussis notificados en Argentina desde el año 1999 hasta el año 2008. Los datos fueron obtenidos de la Dirección Nacional de Epidemiología correspondiente al Ministerio de Salud (<http://www.msal.gov.ar/htm/Site/salasituacion/index.asp>).

incrementar a partir de fines de 2010, estimándose que cuando finalice el año 2011 se alcanzarán nuevamente los 3000 casos anuales de pertussis. Todo esto demuestra la vigencia de este problema de salud.

En coincidencia con lo observado en otros países, los datos estadísticos indican un cambio en el perfil epidemiológico de la tos convulsa con un desplazamiento desde poblaciones de corta edad hacia poblaciones de mayor edad (17). El alarmante aumento de casos de tos convulsa pone de manifiesto la necesidad de esclarecer los mecanismos asociados a la patogénesis y persistencia de *B. pertussis* en el hospedador con el fin de establecer las deficiencias en las estrategias preventivas actuales y posibilitar la implementación de mejoras que permitan controlar la circulación de este patógeno y lograr la erradicación de la enfermedad.

I.1.2.3- La reemergencia

Entre las causas de la reemergencia de la tos convulsa a nivel mundial se pueden mencionar:

- La corta duración de la inmunidad adquirida mediante la vacunación. En el caso de la vacuna celular la inmunidad comienza a declinar luego de 3 a 5 años del último refuerzo, con ausencia de protección luego de 10 a 12 años. La inmunidad conferida por la vacuna acelular empezaría a declinar luego de 4 a 5 años (18).
- Inmunoselección de cepas más virulentas como resultado de la vacunación con vacunas formuladas en base a cepas de colección. Esto determina que las vacunas actuales no sean completamente efectivas contra las cepas circulantes (19). Las cepas de *B. pertussis* circulantes en la población presentan variaciones polimórficas respecto de las cepas vacunales en regiones inmunodominantes de los principales antígenos presentes en las vacunas.

En nuestro país las variantes alélicas que prevalecen coinciden con las que han sido aisladas 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. Estas variantes alélicas otorgan a las cepas circulantes resistencia contra la inmunidad adquirida (20).

- La disminución de la eficacia de las vacunas actuales debido a cambios antigénicos en las cepas circulantes. La eficacia de las vacunas contra tos convulsa se estima entre el 70 y el 90% luego de la tercera dosis (20-21). Cabe destacar que las vacunas actuales previenen los síntomas de la enfermedad pero no la infección, debido a que la eficacia de

las vacunas es inferior a la proporción crítica de inmunización necesaria para impedir la transmisión (15).

Otras causas que podrían influir en la situación varían según el nivel de desarrollo de los países. Entre ellas se destacan:

- Esquemas de vacunación inadecuados.
- Regulares sistemas de vigilancia epidemiológica.

Con respecto a la baja eficacia de las vacunas, se especula que esta sería una de las causas por la cual grupos de adolescentes y adultos vacunados sufren infecciones o re-infecciones con *B. pertussis* con mayor frecuencia, pero sin manifestar cuadros agudos típicos de la enfermedad. Asimismo en muchos casos presentan síntomas poco severos, aunque persistentes, inclusive llegando a cursar la infección sin sintomatología. Estos grupos de individuos infectados, difíciles de diagnosticar, actuarían como reservorios esporádicos de infección y fuente de contagio del patógeno, aumentando el riesgo de transmisión a niños pequeños o infantes no vacunados, situación que promovería la circulación de *B. pertussis* en la población (11, 22).

Otra posible causa de la baja eficacia que presentan las vacunas, más allá de las diferencias fenotípicas existentes entre las cepas circulantes de *B. pertussis* y las cepas vacunales, podría estar relacionada con el hecho de que para su formulación se utilizan bacterias crecidas en medios líquidos, ricos en nutrientes, donde las células flotan libremente (células planctónicas), sin interacciones entre ellas y alcanzando su velocidad máxima de crecimiento en la fase exponencial. Esta forma de crecimiento dista considerablemente de ser la que encuentra la población *in vivo*, ya que *B. pertussis* crece adherida a la superficie del epitelio respiratorio del hospedador al menos durante la primera etapa de la infección, con lo cual el fenotipo expresado por el organismo integrante de una vacuna difiere del que presenta la misma bacteria creciendo en un hospedador. Dicha situación, que contribuye a la diferenciación fenotípica entre organismos infectantes y vacunales, favorecería la persistencia del patógeno en el hospedador humano, a pesar de la vacunación.

I.1.3- Manifestaciones Clínicas

El cuadro clínico asociado a la tos convulsa puede manifestar variaciones dependiendo de diversos factores como el historial de vacunación, la etapa de la infección, la edad y/o las condiciones clínicas del paciente.

Luego de un período de incubación de 7 a 10 días, pueden definirse tres estadios clínicos o fases durante el curso de la enfermedad:

- **Período catarral:** Comprende de 7 a 12 días presentando como síntomas inespecíficos catarro, estornudos, lagrimeo, irritación conjuntival y tos suave. Durante esta fase de la enfermedad la tasa de contagio es muy elevada.
- **Período convulsivo o paroxístico:** Esta etapa suele durar de 2 a 8 semanas y se caracteriza por fuertes y repetidos ataques de tos, con múltiples expectoraciones violentas (paroxismo o evento paroxístico). Asimismo se observa cianosis, salivación, lagrimeo, vómitos y sudoración profunda. Después de un paroxismo intenso el paciente suele quedar en un estado de completa confusión y en ocasiones puede llegar a la asfixia. La mayoría de las manifestaciones clínicas de esta fase se deben a la presencia de toxinas liberadas por el microorganismo (en tráquea y bronquios) y a su diseminación sistémica.
- **Período de convalecencia:** Esta fase puede durar de 1 a 3 meses y se caracteriza por la disminución gradual y progresiva de los episodios de tos.

Entre las complicaciones comunes de esta enfermedad se incluyen: neumonía, otitis media, convulsiones y encefalopatías. La neumonía puede ser un evento primario generado por 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. Cabe agregar que en neonatos e infantes pequeños la enfermedad puede manifestarse con crisis de apnea y cianosis en vez de los episodios de tos característicos. Asimismo la enfermedad es más severa y riesgosa para este grupo de individuos con complicaciones como neumonía, neumotórax, encefalopatías e hipertensión pulmonar severa (23-24). La mayoría de los casos de muerte por infección con *B. pertussis* ocurren en infantes en su primer año de vida. Asimismo, se ha establecido que la fuente de infección para niños son frecuentemente miembros del grupo familiar, tanto adolescentes como adultos (25).

Con respecto a los individuos inmunizados, especialmente adolescentes y adultos, la enfermedad es a menudo poco severa y se la puede confundir con otras causas de tos crónica comunes en estos grupos de individuos como el asma o goteo postnasal (26).

I.1.4- Diagnóstico

Una gran variedad de métodos han sido desarrollados para la detección de *B. pertussis*, sus productos o la respuesta inmune que genera. Sin embargo todos tienen limitaciones en

cuanto a sensibilidad, especificidad o practicidad. Entre las pruebas para diagnosticar tos convulsa se destacan: el cultivo del microorganismo, inmunofluorescencia directa, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las pruebas serológicas (22). El aislamiento del microorganismo por medio de cultivos en el contexto de la enfermedad clínica o asintomática es considerado la metodología estándar para la detección.

Los medios de cultivo habitualmente utilizados para el aislamiento de estos organismos son: Agar Bordet-Gengou suplementado con sangre de carnero o medio de Stainer-Scholte adicionado con ciclodextrina. El material para el cultivo se obtiene a partir de hisopados nasofaríngeos o muestras de secreciones (22). La muestra cultivada debe examinarse diariamente durante 5-7 días para identificar las pequeñas colonias que crecen lentamente. El prolongado período de tiempo necesario para la lectura definitiva de los cultivos llevó al desarrollo de anticuerpos marcados con fluorescencia para la detección de *B. pertussis* en frotis nasofaríngeos.

A través del método de inmunofluorescencia directa se pueden identificar colonias en cultivos, sin embargo esta prueba presenta baja sensibilidad y especificidad, por lo que es poco recomendable para el diagnóstico (27).

Las pruebas de diagnóstico basadas en PCR son rápidas, presentan una mayor sensibilidad que el cultivo y poseen la ventaja de distinguir entre las distintas especies de *Bordetella*. Sin embargo estas pruebas pueden generar falsos positivos por lo que es necesario establecer un riguroso control de calidad (28). Los métodos serológicos se aplican principalmente en adolescentes y adultos comprendiendo técnicas de aglutinación, inmunoabsorción enzimática (ELISA) como así también Western blot.

Todas estas pruebas son útiles a nivel epidemiológico, pero resultan poco adecuadas durante la fase aguda de la enfermedad. Debido a que la posibilidad de aislar *B. pertussis* disminuye de manera progresiva durante el transcurso de la enfermedad, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) aconseja la utilización de pruebas de cultivo y PCR dentro de las 3 primeras semanas del inicio de los síntomas o manifestación de tos, las pruebas de PCR y serológicas cuando la tos ha permanecido entre 3 y 4 semanas y serología cuando la tos ha durado por más de 4 semanas (27).

I.1.5- El género *Bordetella*

Los integrantes del género *Bordetella* son β -proteobacterias de la familia Alcaligenacea. Son cocobacilos Gram-negativos de pequeño tamaño. Todas las especies de *Bordetella* son aerobios estrictos, con la excepción de *B. petrii*. Algunas de estas bacterias son complicadas

para crecer en cultivo del laboratorio. El género *Bordetella* está compuesto por 9 especies: *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis_{hu}*, *B. parapertussis_{ov}* (adaptada en ovejas), *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum* y *B. petrii* (29-30).

De las especies que integran el género *Bordetella*, *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis_{hu}*, *B. parapertussis_{ov}* y *B. holmesii* infectan el tracto respiratorio de mamíferos. Las diferencias entre rango de hospedador y enfermedades relativas a estas especies son intrigantes debido a que comparten numerosos componentes bacterianos involucrados en la patogénesis (31). Estas especies son adquiridas a través de secreciones provenientes de otros hospedadores infectados. Asimismo, los integrantes del género *Bordetella* presentan un fuerte tropismo por las cilias de la mucosa respiratoria, las cuales son el principal sitio de infección de estos patógenos. La colonización de un hospedador por parte de estas especies es iniciada por su adherencia y proliferación en la superficie de la mucosa ciliada, causando ciliostasis (disrupción de la función normal de las cilias) y daño del epitelio respiratorio, siendo las principales patologías asociadas a estas especies de *Bordetella* (32-33).

Estudios genéticos sugieren que *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* son las especies más estrechamente relacionadas (34). Asimismo indican que *B. bronchiseptica* es la especie más cercana, a nivel evolutivo, a un ancestro común de estas tres especies y que las dos especies adaptadas al ser humano, *B. pertussis* y *B. parapertussis_{hu}* evolucionaron independientemente a partir de linajes de *B. bronchiseptica* diferentes. *B. parapertussis_{hu}* causa infecciones en humanos con sintomatología similar a la tos convulsa. Asimismo, *B. bronchiseptica*, inicialmente descrita como un patógeno de animales, también puede producir enfermedades respiratorias en el hombre (35).

En la Figura 2 se exhibe una micrografía correspondiente a células de *B. pertussis* donde se puede observar su forma característica.

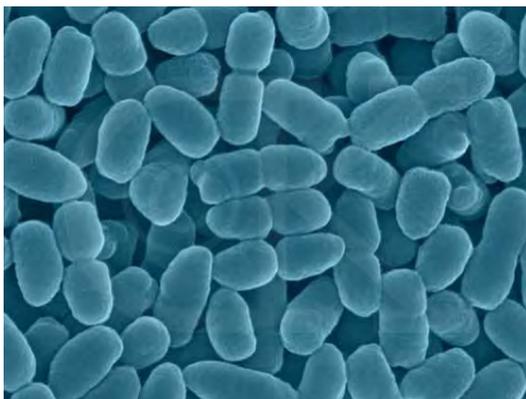


Fig. 2. Imagen del cocobacilo Gram-negativo *Bordetella pertussis*. Micrografía adquirida de <http://www.historique.net/microbes/pertussis>.

I.1.6- Sistema de Regulación BvgAS y Fases de Virulencia

Bordetella pertussis posee un número importante de factores de virulencia que están relacionados con su capacidad de infectar al hospedador. La expresión de la mayoría de los factores de virulencia está regulada o modulada en respuesta a cambios en las condiciones ambientales a través de un sistema de transducción de señales de dos componentes sensor/activador denominado BvgAS (*Bordetella virulence gene activador / sensor*) (36). Entre los factores de virulencia cuya expresión es controlada por este sistema se encuentran adhesinas, autotransportadores y toxinas. Asimismo, *B. pertussis* presenta algunos factores cuya expresión es independiente de dicho sistema de regulación. Las características de algunos de los factores de virulencia se describirán en las siguientes secciones.

El sistema BvgAS está compuesto por un regulador transcripcional, BvgA y un sensor híbrido anclado a la membrana externa, BvgS. La activación del BvgAS implica un mecanismo de fosfotransferencia de cuatro pasos detallados en la Figura 3 A (37). *In vitro*, el sistema se activa cuando la bacteria crece a 37°C en un medio de cultivo estándar y se inactiva a temperaturas de cultivo menores a 26°C o en presencia de concentraciones milimolares de agentes moduladores como MgSO₄ (40 mM) o ácido nicotínico (10 mM). Los factores involucrados en la activación de BvgAS *in vivo* se desconocen hasta el momento. El sistema BvgAS funciona controlando la expresión diferencial de distintos genes asociados con la virulencia a lo largo de tres fases fenotípicas: i) La fase virulenta o Bvg⁺, la cual se caracteriza por la expresión de los genes *vag* (*virulence activated genes*), los cuales codifican factores de virulencia. Estos genes se pueden diferenciar de acuerdo con su expresión temporal en *vag* tempranos (codifican algunas adhesinas) y *vag* tardíos (codifican toxinas). Asimismo esta fase se identifica por la ausencia de expresión de los genes *vrg* (*virulence repressed genes*) de función aún no esclarecida. ii) La fase avirulenta o Bvg⁻ se identifica por la ausencia de expresión de los genes *vag* y la expresión de los genes *vrg*. iii) La fase intermedia o Bvgⁱ (etapa de transición entre las fases Bvg⁺ y Bvg⁻) se caracteriza por la expresión de los genes *vag* tempranos, el gen *bvgAS* y el gen *bipA*, único gen de su clase identificado hasta ahora (Fig. 3 B) (38). De este modo el sistema BvgAS funcionaría como un “reóstato” controlando de manera ajustada y coordinada la expresión diferencial de varios perfiles de genes relacionados con la virulencia en al menos tres fases fenotípicas (38).

Existe evidencia que sugiere que durante la transmisión de persona a persona hay factores ambientales que determinarían que *B. pertussis* se encuentre en fase Bvg⁻ o Bvgⁱ (39). Así, durante los primeros estadios de colonización este patógeno no expresaría las proteínas codificadas por los genes *vag* (bacteria en fase Bvg⁻). Posteriormente la expresión de

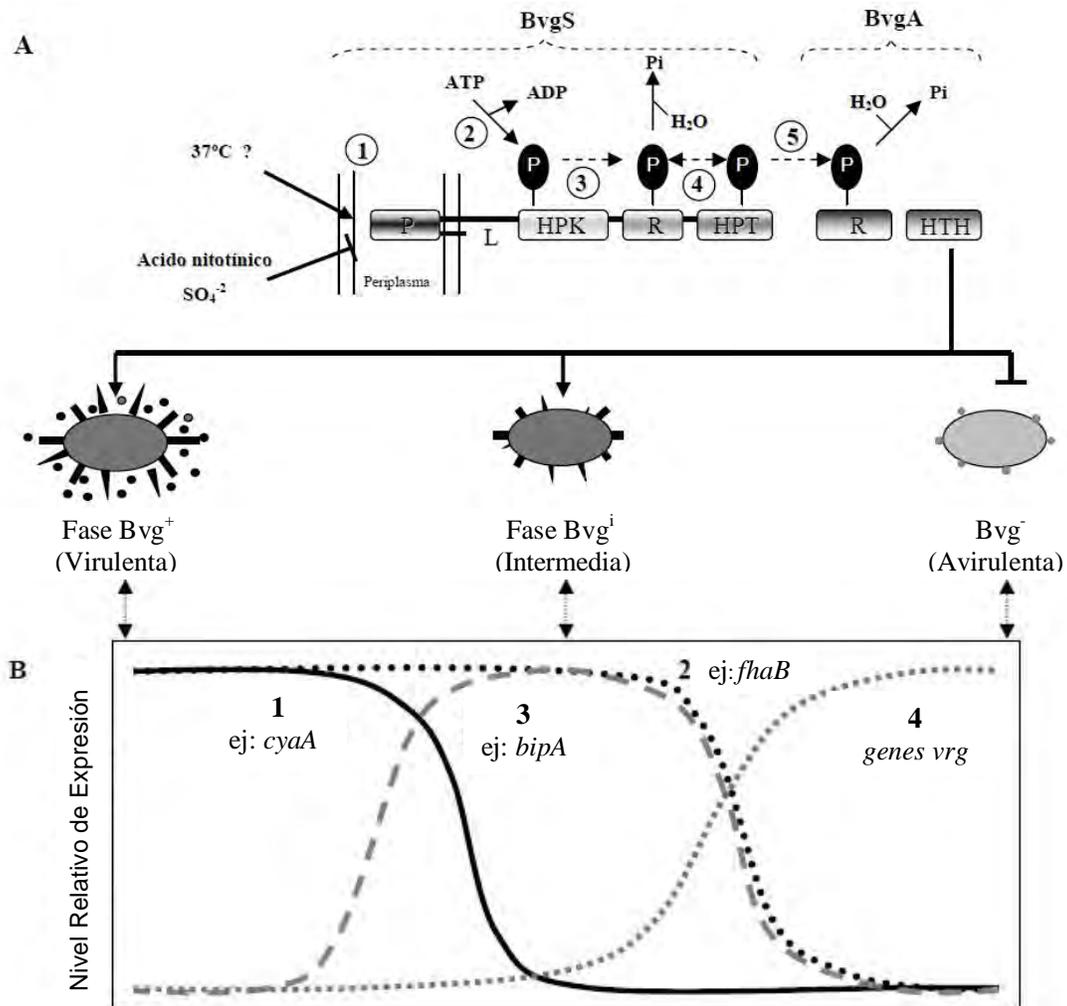


Fig. 3. A) Esquema del sistema de dos componentes BvgAS y de su mecanismo de activación. BvgS es una proteína sensora transmembrana integrada por: dominio periplásmico (P), región de unión (L), dominio con actividad histidina quinasa (HPK), dominio receptor (R) y dominio con actividad histidina fosfotransferasa (HPT). La proteína BvgA es un regulador de respuesta que contiene un dominio receptor (R) y un dominio hélice-giro-hélice (HTH) que permite la unión a ADN. *In vitro*, la proteína BvgS recibe la señal (paso 1), se autofosforila (paso 2) e inicia la fosfotransferencia que conduce a la activación de BvgA (pasos 3, 4 y 5). El sistema BvgAS controla cuatro clases de genes asociados con la virulencia, y que se expresan de modo diferencial definiendo tres fases fenotípicas: Bvg⁺, Bvgⁱ y Bvg⁻. **B) Curvas de expresión relativa de las cuatro clases de genes.** La fase Bvg⁺ se caracteriza por la expresión de los *vag* tardíos como *cyaA* que codifica la toxina AC (curva 1) y de los genes *vag* tempranos como *fhaB* que codifica la adhesina FHA (curva 2). La fase Bvgⁱ se identifica por la expresión de los genes *vag* tempranos y de los que se expresan en la transición entre Bvg⁺ y Bvg⁻, como *bipA* (curva 3). La fase Bvg⁻ se define por la expresión de los genes *vrg* (curva 4). Esquema adaptado del trabajo publicado por Mattoo y Cherry (2005).

adhesinas (fase Bvgⁱ) inducidas por un cambio en las condiciones del entorno, favorecería la interacción con las células del epitelio respiratorio. Luego de esta etapa, la expresión de toxinas propias de la fase Bvg⁺ generaría la alteración de los mecanismos de defensa del hospedador (40).

Estos cambios secuenciales en los perfiles de expresión de genes de virulencia, los cuales se corresponden con transiciones entre las fases fenotípicas, responderían *in vitro* a cambios graduales en las concentraciones de agentes modulantes (MgSO₄ o ácido nicotínico) o a cambios en la temperatura de cultivo. Este fenómeno de transición entre fases se conoce como modulación fenotípica (41). A pesar de que se han propuesto modelos que postulan que factores ambientales y del hospedador podrían promover eventos de modulación fenotípica *in vivo* que potenciarían tanto la persistencia del patógeno en el hospedador como su transmisión (39), hasta hoy no se sabe exactamente cual es el rol de este fenómeno *in vivo* ni la fase o fases predominantes durante las distintas etapas de la colonización por parte de estos organismos.

I.1.7- Factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS

Entre los factores de virulencia controlados por el sistema BvgAS y que presentan función de adhesina se destacan: Hemaglutinina Filamentosa (FHA), Fimbrias (Fim) y Pertactina (Prn). Entre los que exhiben función de toxinas: Adenilato Ciclasa (ACT), Toxina Pertussis (PTx) y Toxina Dermonecrótica (DNT) (ver Figura 4). Se describen a continuación algunas características de estos factores de virulencia:

Hemaglutinina Filamentosa (FHA): Es una proteína fibrilar que puede estar asociada a la superficie o ser secretada al medio extracelular. El gen *fhaB*, que codifica para FHA, pertenece al grupo de genes *vag* tempranos y se expresa en las fases Bvg⁺ y Bvgⁱ (42). FHA es sintetizada como un precursor, FhaB, el cual sufre varias modificaciones hasta generar la proteína madura FHA. La proteína FHA madura contiene 3 dominios involucrados en la adhesión de *B. pertussis* a las células del hospedador: el dominio RGD que promueve la unión a macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y glóbulos rojos (43); el de interacción a carbohidratos (Dominio CRD) el cual media la adhesión a células epiteliales respiratorias ciliadas (44) y el dominio que presenta afinidad por heparina y otros carbohidratos sulfatados, por el cual ocurre la adhesión a células epiteliales no ciliadas (45). FHA es la adhesina más importante de *B. pertussis*, presentando gran potencial inmunogénico, por lo que es considerada entre los antígenos fundamentales para la formulación de vacunas acelulares.

- **Fimbria (Fim):** Proteína de tipo filamentoso que se localiza en la superficie de *B. pertussis*, participando en la fijación a las células epiteliales y a la mucosa. Existen dos serotipos de subunidad mayor de Fimbria, Fim2 y Fim3, que comparten la subunidad

menor denominada FimD (46). Los genes que codifican las distintas subunidades de Fim forman parte de operón *fimBCD*, el locus funcional para la biosíntesis de fimbria. Fim se adhiere al epitelio respiratorio a través de Fim2 y Fim3 y a monocitos por medio de FimD (47). Asimismo, interacciona con carbohidratos sulfatados ubicados en el tracto respiratorio como heparina, condroitin y dextrano (48). Promueve inmunidad protectora contra la infección por lo que es un componente en algunas vacunas acelulares.

- **Pertactina (Prn) y otros autotransportadores:** Estos factores de virulencia pertenecen a la familia de proteínas asociadas a la superficie de la bacteria o secretadas al medio extracelular y que dirigen su propia exportación (49). Pertactina posee un dominio RGD, así como regiones ricas en prolina y leucina, involucrados en la adhesión al hospedador (50). Asimismo, la proteína Prn promueve inmunidad protectora. TcfA, BrkA, SphB1 y Vag8 son los otros autotransportadores que poseen uno o más dominios RGD potencialmente involucrados en la adhesión bacteriana (48).
- **Toxina Adenilato Ciclasa (ACT):** Pertenece a la familia de citotoxinas formadoras de poros y dependiente de Ca^{+2} denominadas toxinas RTX (*repeats-in-toxins*) (51). 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 (52). A diferencia de otras toxinas de su clase, la mayor cantidad de ACT permanece asociada a la superficie mientras que sólo una pequeña parte se libera al medio externo (53). Dentro de la célula blanco, ACT es activada por calmodulina y cataliza la producción de AMPc en cantidades supra fisiológicas (54). El incremento de AMPc interfiere con los mecanismos de transmisión de señales en células del sistema inmune y modula diferentes funciones efectoras, incluyendo la respuesta oxidativa, lo cual favorece la sobrevida bacteriana al contacto con la célula del hospedador. Es considerada un factor antifagocítico y antiinflamatorio (55).
- **Toxina Pertussis (PTx):** Esta toxina, exclusiva de *B. pertussis*, 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. Es el factor de virulencia más importante de *B. pertussis* debido a la gran toxicidad que posee, la cual deriva de sus múltiples efectos. El polipéptido S1 constituye la subunidad A con actividad enzimática ADP ribosiltransferasa NAD-dependiente, mientras la subunidad B, que se compone de los polipéptidos S2, S3, S4 y S5 ensamblados en una proporción 1:1:2:1, es la responsable de

la interacción con los receptores celulares (56). PTx es secretada al medio extracelular y una vez dentro de la célula eucariota, la subunidad B se intercala con la membrana citoplasmática y une ATP, lo cual provoca la liberación de la subunidad activa S1 (57). Esta subunidad inactiva a la proteína Gi mediante ADP ribosilación, lo cual bloquea la inhibición de la adenilato ciclasa eucariota y la activación de los canales de K⁺ (58). La toxina PTx desencadena efectos supresores en el sistema inmune como la inhibición de la respuesta oxidativa, la quimiotaxis y la liberación de enzimas lisosomales en neutrófilos y macrófagos (59). PTx detoxificada es capaz de generar una importante respuesta protectora, por tal motivo es un componente primario en las vacunas acelulares.

Toxina Dermonecrótica (DNT): Es una proteína termolábil de tipo A-B compuesta por un dominio N-terminal de unión a receptor y uno enzimático C-terminal (60). DNT es secretada, internalizada vía endocitosis y luego clivada, para actuar causando la poliaminación y desaminación de GTPasas Rho intracelulares, que regulan varios procesos celulares incluyendo la reorganización del citoesqueleto y diferenciación celular entre otros. Por la acción de esta toxina, las GTPasas permanecen activas constitutivamente lo cual provoca la intoxicación celular (33).

I.1.8- Factores de virulencia no regulados por el sistema BvgAS

Entre los factores de virulencia que no son controlados por el sistema BvgAS se encuentran: Citotoxina Traqueal, Lipopolisacáridos y Sistemas de Captura de Hierro (ver Figura 4). Se describirán algunas características de dichos factores de virulencia.

- **Citotoxina Traqueal (TCT):** Esta toxina es un glicopéptido muy pequeño producto de la degradación del péptidoglicano que constituye la pared bacteriana y liberado durante el crecimiento de *B. pertussis* (61). TCT interacciona con las células epiteliales ciliadas causando disfunción ciliar y muerte celular. La destrucción de las células epiteliales estaría relacionada con un aumento en la producción de óxido nítrico (ON), debido a que TCT estimularía la expresión de la ON sintetasa (62). El óxido nítrico provoca 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 (63).
- **Lipopolisacáridos (LPS):** Como otras bacterias Gram-negativas, *B. pertussis* posee LPS en su membrana externa, una potente endotoxina bacteriana. En este patógeno la misma

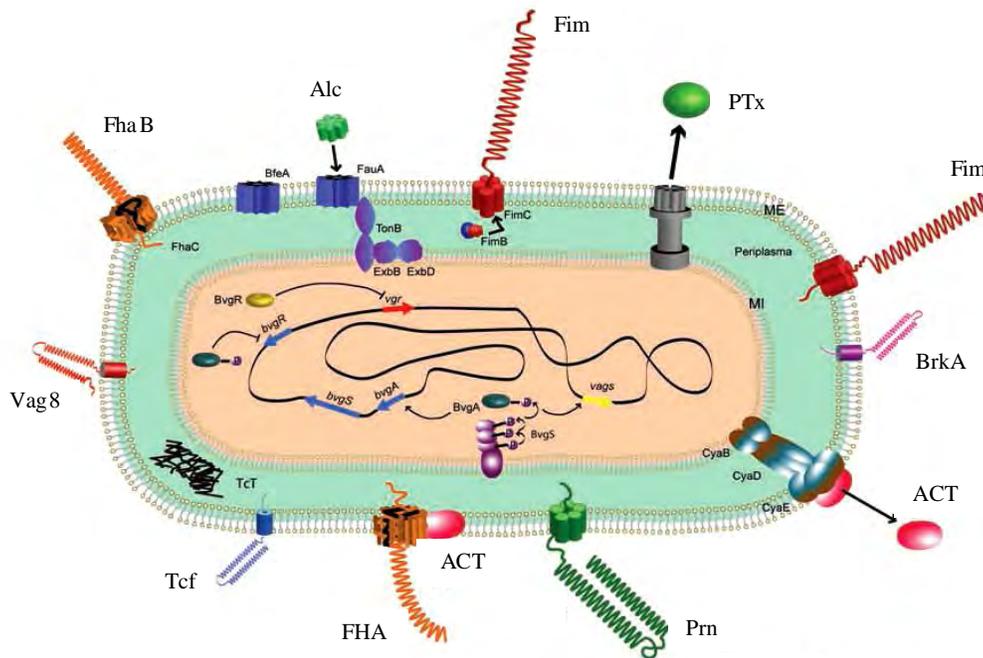


Fig. 4. Representación del patógeno *B. pertussis* con sus factores de virulencia. Los factores de virulencia controlados por el sistema BvgAS son: las adhesinas Hemaglutinina Filamentosa (FHA), Fimbria (Fim), Pertactina (Prn), autotransportadores TcfA, BrkA, SphB1, Vag8 y las toxinas Adenilato Ciclasa (ACT), Toxina Pertussis (PTx) y Toxina Dermonecrótica (DNT). Entre los factores de virulencia que no son regulados por BvgAS se encuentran: Citotoxina Traqueal (TCT), Lipopolisacáridos (LPS) y Alcaliginina (Alc).

está constituida por una parte lipídica (lípidos A) anclada a la membrana externa y un núcleo oligosacárido. No posee antígeno O (cadena de polisacáridos), característico del LPS de la mayoría de las bacterias Gram-negativas (64). El LPS de *B. pertussis* es pirogénico, mitogénico e histaminosensibilizante, siendo el lípidos A de esta molécula la fracción endotóxica principal (65). Cuando el LPS interactúa con receptores de células epiteliales y del sistema inmune induce la expresión de citotoxinas pro-inflamatorias conduciendo a la toxicidad sistémica. Por otra parte, el LPS protege a *B. pertussis* de la acción de la Proteína Surfactante A presente en el epitelio respiratorio, evitando así la eliminación de la bacteria (66). Es responsable de la reactogenicidad en la vacuna celular y presenta actividad adyuvante en la vacuna celular como en las formulaciones acelulares.

- **Sistemas de Captura de Hierro:** Una de las barreras contra microorganismos invasores que conforman el sistema de inmunidad innata del hospedador es la baja disponibilidad de hierro (Fe) libre. En mamíferos, el Fe intracelular se encuentra en la forma de hemoproteínas, mientras que el Fe extracelular se encuentra unido a glicoproteínas como la transferrina y lactoferrina. Estas proteínas quelantes determinan que la concentración de Fe

libre sea insuficiente para permitir el desarrollo microbiano (67). Sin embargo, los microorganismos cuentan con mecanismos que les permiten superar la restricción de Fe impuesta por el hospedador entre los que se encuentra la producción y utilización de quelantes de Fe denominados sideróforos (68). *B. pertussis* produce alcalignina, un sideróforo tipo hidroxamato capaz de extraer Fe de las glicoproteínas quelantes del hospedador, superando así la restricción de hierro libre (69).

I.1.9- Patogénesis

El proceso infeccioso y la evolución de la enfermedad implican una serie de sucesos entre los que se encuentran la adhesión, la evasión a los sistemas de defensa del hospedador, el daño tisular y la posible persistencia del patógeno dentro del mismo. Estos eventos están regulados por la interacción entre los factores de virulencia y los receptores celulares del hospedador. La infección en tos convulsa comienza con la adhesión de *B. pertussis* a las células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio superior. En esta etapa de colonización se hallan implicados diversos factores de virulencia (FHA, Fim, PTx, Prn, TcfA, BrkA y Vag8) (70). La abundancia de proteínas con función del tipo de adhesina contribuye a la efectividad del proceso de adhesión. Estudios realizados con cultivos celulares y con modelos animales sugieren a FHA como la adhesina más potente e importante (71).

Por otro lado, en la etapa de evasión a las defensas del hospedador se encuentran involucradas las toxinas pertussis (PTx) y adenilato ciclasa (ACT). Como se describió anteriormente la ACT inhibe funciones fundamentales en células del sistema inmune, como es la fagocitosis. Asimismo PTx suprime diferentes procesos asociados a neutrófilos y macrófagos, como así también la migración de linfocitos a la zona de infección. Por lo tanto, la variedad de reacciones asociadas a estas toxinas generan la imposibilidad por parte del sistema inmunológico de eliminar al microorganismo (59, 72).

El daño tisular estaría causado principalmente por la actividad de la toxina dermonecrótica y por la citotoxina traqueal. Estas proteínas generan la intoxicación de las células del epitelio respiratorio provocando la interrupción de funciones celulares esenciales. Asimismo se cree factible que las alteraciones tisulares del tracto respiratorio sean las responsables de la tos paroxística. Se ha determinado que el daño del epitelio respiratorio junto con la ciliostasis y la acumulación de mucus dificultan la eliminación del patógeno (33).

Según se ha postulado, *B. pertussis* puede persistir dentro del hospedador especialmente luego de la fase aguda de la enfermedad. El fenómeno de invasión y sobrevivencia intracelular ha sido propuesto como uno de los mecanismos de persistencia de este patógeno. Varios

estudios han mostrado que *B. pertussis* es capaz de invadir y sobrevivir dentro de macrófagos, neutrófilos y células epiteliales respiratorias del hospedador (73-74). Por otro lado, un mecanismo que poseen muchos patógenos para conseguir la persistencia en los hospedadores es la formación de biofilm, el cual se define como una comunidad de microorganismos sésiles, embebida en una matriz de sustancia polimérica extracelular (75). Las evidencias indican que los patógenos que crecen en biofilm exhiben rasgos fenotípicos que podrían ser ventajosos para su virulencia, como resistencia a las defensas del hospedador y a terapias antimicrobianas convencionales (76). Estudios realizados por nuestro laboratorio demuestran que *B. pertussis* posee la capacidad de desarrollar biofilm *in vitro* e *in vivo* (77-78). En este sentido, la formación de biofilm por parte de este patógeno puede colaborar en la evasión de la respuesta inmune y en la sobrevida dentro del hospedador.

I.1.10- Inmunidad

El desarrollo de la inmunidad contra *B. pertussis* en hospedadores no inmunes comprende tres etapas diferenciadas: el reconocimiento de los componentes bacterianos por las células del sistema de inmunidad innata y adquirida, la producción de mediadores solubles, y el reclutamiento y activación de moléculas y células efectoras.

Cuando *B. pertussis* se adhiere a células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio alcanza a ser reconocida y capturada por células del sistema inmune innato como macrófagos (MØ), células dendríticas (DC), células *natural killer* (NK), o células T *naive* (NT) (79). Las DC procesan los antígenos bacterianos y los presentan a los linfocitos T. Como consecuencia del reconocimiento antigénico, los MØ, DC y NT producen las interleuquinas IL-12 e IL-18, desencadenando una respuesta de células T subtipo Th1. Las citoquinas proinflamatorias, IL-1 y TNF- α , y el óxido nítrico (NO) producidos por MØ inducidos por toxinas bacterianas, colaboran en el reclutamiento de fagocitos profesionales.

Por otro lado, el interferón gamma (IFN- γ) secretado en la fase temprana de la infección por las células NK y NT, y luego por las células Th1, causaría el reclutamiento y activación de macrófagos y neutrófilos. Asimismo el IFN- γ actuaría sobre los linfocitos B estimulándolos a secretar anticuerpos opsonizantes y fijadores de complemento. Las bacterias opsonizadas podrían ser fagocitadas por neutrófilos y eliminadas por NO o intermediarios reactivos del oxígeno (80). Por su parte, los anticuerpos anti-*B. pertussis* cumplen acciones esenciales en la protección contra esta infección. Anticuerpos contra ciertos antígenos de *B. pertussis* presentan la capacidad de evitar la adhesión a las células epiteliales a través del bloqueo de adhesinas, neutralizar toxinas bacterianas como también promover la opsonofagocitosis (81).

I.1.11- Vacunas y vacunación

En la era pre-vacunación (antes de 1945), más de la mitad de los niños se infectaba con *B. pertussis* antes de comenzar la etapa escolar. Más aún, la tos convulsa fue una de las principales causas de muerte infantil durante el siglo XIX. Con el uso generalizado de la vacuna celular, a partir de 1940/1950, el número de casos de esta enfermedad se redujo notoriamente. Dicha vacuna se formuló a partir de bacterias enteras de *B. pertussis* en fase virulenta e inactivadas por calor. Las primeras vacunas celulares carecían de estandarización de procedimientos. Los distintos fabricantes empleaban diferentes cepas y procedimientos de producción, con las consecuentes variaciones en el producto final. A pesar de esto su empleo resultó beneficioso pero la reactogenicidad asociada a este tipo de vacunas, probablemente por la presencia de LPS, determinó que su uso fuese objetado lo que impulsó el desarrollo de vacunas acelulares o de segunda generación, formuladas a partir de antígenos purificados (factores de virulencia regulados por el sistema Bvg) de *B. pertussis* (21-22).

En la actualidad existen diferentes preparaciones de vacunas acelulares que combinan antígenos purificados con los toxoides tetánico y diftérico (DTPa = Difteria + Tétano + Pertussis acelular). Según el antígeno de *B. pertussis* que se incluya estas preparaciones pueden ser: monovalentes (contiene solo PTx detoxificada; dPTx), bivalentes (dPTx y FHA), trivalentes (dPTx, FHA y Prn), tetravalentes (dPTx, FHA, Prn y Fim) y pentavalentes (dPTx, FHA, Prn, Fim2 y Fim3) (22). Debido a que las vacunas acelulares no contienen LPS, en general, son menos reactogénicas que las vacunas celulares. Sin embargo, a excepción de algunas preparaciones pentavalentes, las vacunas acelulares son menos efectivas que las vacunas celulares. Desde hace ya varios años las mencionadas vacunas acelulares se aplican a individuos menores de 7 años. Recientemente se han comenzado a utilizar preparaciones acelulares de refuerzo que presentan en su formulación cantidades menores de antígeno pertussis y del toxoide diftérico. Esta última clase de vacunas se aplica exclusivamente en adolescentes y/o adultos (22). Se cree que con la vacunación de adolescentes y adultos se logrará disminuir la incidencia de la enfermedad en este grupo de individuos como así también el riesgo de contagio a niños pequeños o infantes no vacunados.

En Argentina, como también en otros países en vías de desarrollo, se sigue empleando la vacuna celular, la cual se administra en conjunto con los toxoides tetánico y diftérico (DTPc) y con el polisacárido de *Haemophilus influenzae* serotipo b, conformando la vacuna cuádruple bacteriana (DTPcHib). De acuerdo al Calendario Nacional de Vacunación esta clase de vacunas se aplica en cinco dosis administradas a los 2, 4, 6, 18 meses y 6 años de edad. La eficacia de estas vacunas se correlaciona con el número de dosis administradas:

aproximadamente 18% para una única dosis, 48% para dos dosis, 58% para tres dosis y 78% para cuatro o más dosis.

Una de las consecuencias de la vacunación ha sido el cambio etario de la incidencia de tos convulsa: de niños entre 1 a 9 años en poblaciones no vacunadas a infantes, adolescentes y adultos en poblaciones con altas tasas de vacunación (7). A partir del año 2009 se estableció la aplicación de manera obligatoria de una dosis de refuerzo a los 11 años de edad.

Con respecto a la eficacia de las vacunas mencionadas, cabe precisar que las mismas previenen los síntomas de la enfermedad, pero no la infección. Asimismo la inmunidad adquirida por la administración de estas vacunas confiere protección por un corto plazo. Por estos motivos resulta necesario aumentar la eficacia de las vacunas actuales a fin de poder erradicar la enfermedad.

Como se dijo anteriormente, en la última década la situación ha empeorado y la enfermedad sigue siendo endémica en todo el mundo. Aún en países con alto índice de vacunación incluyendo el nuestro, la incidencia de la tos convulsa aumentó de manera alarmante (82-83), lo cual ha llevado a que la OMS declare a esta enfermedad como re-emergente. La permanente circulación de la bacteria en la población a pesar de las vacunas en uso sumado a la mencionada pérdida progresiva de inmunidad pos-vacunación probablemente ha generado esta situación epidemiológica cada vez más grave. En definitiva, las vacunas actuales no son efectivas para erradicar la enfermedad debido principalmente a que la bacteria ha demostrado gran plasticidad para eludir la inmunidad generada por estas vacunas.

I.1.12- Tratamiento

La infección con *B. pertussis* de niños menores de 6 meses requiere la internación hospitalaria debido a las complicaciones que pueden generarse, como por ejemplo, apnea, hipoxia y dificultad para respirar. El tratamiento con antibióticos tiene su máxima efectividad en el período catarral. Una vez establecida la tos paroxística, dicho tratamiento tiene poco efecto sobre el curso clínico de la enfermedad aunque se recomienda para reducir la transmisión del patógeno a otras personas. En el pasado la droga de elección para el tratamiento de pertussis fue la eritromicina, 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 la utilización de claritromicina y azitromicina (84). En niños mayores de dos meses de edad con alergia o intolerancia a los macrólidos se puede emplear trimetoprim-sulfametoxazol.

Como fármacos coadyuvantes para el tratamiento sintomático de los paroxismos de tos se han utilizado el salbutamol, los corticoides y la globulina hiperinmune anti-pertussis (85). Los dos primeros se utilizan con frecuencia tanto en el tratamiento ambulatorio como hospitalario. Sin embargo no hay estudios 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 aplicación no ha sido significativo (85). Por lo tanto hasta el momento no está justificado el empleo de ninguna clase de inmunoglobulinas.

I.2- OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS

Ha sido reportado en los últimos años la existencia de diferencias genotípicas entre aislados clínicos circulantes de *B. pertussis* y cepas utilizadas para la producción de vacunas (86-87). Estas variaciones, las cuales estarían asociadas principalmente con el polimorfismo de genes que codifican para los factores de virulencia, serían una de las causas de la reducida eficacia de las vacunas actuales y de la reemergencia de la tos convulsa a nivel mundial, resaltada especialmente en adolescentes y adultos (20). Asimismo, se ha indicado que la vacunación con cepas de colección adaptadas al laboratorio ha generado la selección de cepas que exhiben mayor virulencia y patogenicidad (88). En relación a este contexto, el grupo de *Bordetelles* del Instituto Pasteur de París, reportó que genomas de cepas circulantes de *B. pertussis* representativas de Europa y Sudamérica portan menor material genético en comparación con el genoma de las cepas de la era prevacunacional (89), confirmando así las diferencias existentes entre los aislados clínicos actuales y cepas vacunales y de referencia de *B. pertussis*. En nuestro País se han comenzado a caracterizar genéticamente aislados clínicos de *B. pertussis*, corroborando la existencia de divergencias entre los mismos y la cepa de referencia Tohama I (20, 90). La información proporcionada por estos trabajos podría ser complementada por datos provenientes de estudios fisicoquímicos que permitan establecer diferencias fenotípicas entre organismos.

El grupo de Vacunas bacterianas del CINDEFI ha empleado la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) como una herramienta para la discriminación e identificación de microorganismos (91-92). Esta metodología ha sido utilizada por distintos laboratorios para identificar y diferenciar a nivel de especie y subespecie diversas poblaciones microbianas (93-100). Dado estos antecedentes se decidió utilizar espectroscopía FT-IR para establecer si existen diferencias fenotípicas entre aislados clínicos

locales de *B. pertussis* y cepas de referencia. En este contexto, en el **Capítulo 2** se exponen los resultados obtenidos empleando espectroscopía FT-IR en combinación con Análisis Jerárquico de Clusters para diferenciar aislados clínicos provenientes del Hospital de Niños de La Plata y cepas de referencia. Mediante este estudio se evaluó el grado de disimilitud fenotípica entre las muestras analizadas. Asimismo, esta metodología se utilizó para explorar diferencias fenotípicas entre *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*, estableciendo un nivel de heterogeneidad entre las distintas poblaciones. El estudio de aislados clínicos de *B. pertussis* permite avanzar en el entendimiento de los mecanismos que este patógeno ha adquirido para evadir las presiones impuestas por la vacunación y para persistir en el hospedador.

Otra de las causas de la baja eficacia que exhiben las vacunas para controlar pertussis, podría ser consecuencia del hecho de que para la producción de dichas vacunas se utilizan bacterias crecidas en medios líquidos, donde las células crecen libremente sin limitación de nutrientes alcanzando en fase exponencial su máxima velocidad de crecimiento. Esta forma de crecimiento dista mucho de ser la que encuentra la población *in vivo*, ya que *B. pertussis* crece, al menos en la primera fase de la infección, adherida a la superficie del epitelio respiratorio del hospedador. Este crecimiento adherido a superficies podría dar como resultado un fenotipo distinto al que muestran las células planctónicas, favoreciendo la persistencia del patógeno en el hospedador a pesar de la vacunación. En nuestro laboratorio se trabaja desde hace algunos años en una línea de investigación sobre un nuevo modelo de crecimiento de *B. pertussis* basado en biofilms. Se ha reportado que *B. pertussis* presenta la capacidad de desarrollar biofilms tanto *in vitro* como *in vivo* (77-78). Esta forma de crecimiento adherido a superficies representa una mejor aproximación al modo de vida que despliega la bacteria *in vivo*, siendo una estrategia de colonización y posiblemente de sobrevida dentro del hospedador. Asimismo, nuestro grupo de trabajo ha logrado demostrar el carácter distintivo de la fisiología de *B. pertussis* en biofilm respecto a la condición planctónica utilizada tradicionalmente, como se detalló, en la producción de vacunas (78, 101). El crecimiento en biofilm le otorga a los patógenos mayor capacidad para persistir en su hospedador evadiendo mejor la respuesta inmune y otorgándoles mayor resistencia a las terapias antimicrobianas tradicionales (102). Estas características constituyen la causa de muchas infecciones crónicas, y son la clave para comprender por que ciertas estrategias de prevención y tratamiento desarrolladas considerando solo el modo de crecimiento planctónico, han fracasado en su intento de controlar enfermedades infecciosas persistentes asociadas a biofilms. El hecho de que se hallan reportado diferencias entre genomas de cepas circulantes y cepas vacunales y de referencia de *B. pertussis*, sugirió la idea de estudiar

la capacidad de adhesión a superficies y el crecimiento en biofilm de aislados clínicos de *B. pertussis* en relación con la cepa de referencia Tohama I. Los análisis efectuados se abordan en el **Capítulo 3**.

Considerando el contexto del crecimiento bacteriano en biofilm, numerosos trabajos han reportado una gran cantidad de bacterias que poseen la capacidad de controlar este evento fisiológico, a través del sistema de comunicación intercelular conocido como Quórum Sensing (103-104). Se ha indicado que este sistema, el cual actúa de manera dependiente de la densidad celular, regula en bacterias patógenas la expresión de genes asociados con la virulencia y patogenicidad (105). La mayoría de las bacterias Gram-negativas que poseen sistemas de Quórum Sensing utilizan acil-homoserín lactonas como moléculas señal, las cuales exhiben una elevada diversidad conformacional e interaccionan con proteínas específicas formando un complejo capaz de modular la expresión de genes involucrados en diversas funciones fisiológicas (106). En este contexto, en el **Capítulo 4** se estudió la posibilidad de que *B. pertussis* presente la capacidad de sintetizar señales químicas correspondientes al sistema de Quórum Sensing. Para tal fin se aplicaron diversos análisis que involucran la utilización de cepas biosensoras capaces de detectar con elevada especificidad y sensibilidad la presencia de moléculas tipo acil-homoserín lactonas, TLC y análisis mediante CG-MS y HPLC-MS/MS. Cabe destacar que este tipo de sistemas de comunicación no ha sido todavía reportado para organismos del género *Bordetella*. La confirmación de que *B. pertussis* es capaz de sintetizar alguna señal química del tipo acil-homoserín lactona nos permitiría inferir que este patógeno posee al menos un sistema de señalización del tipo Quórum Sensing. Esto generaría un considerable interés en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas antipertussis con el fin de bloquear la acción de estas moléculas y así reprimir la expresión de genes vinculados con la virulencia y persistencia de *B. pertussis*, interrumpiendo o al menos controlando alguno de sus procesos fisiológicos como la formación de biofilms.

Al final de este trabajo de investigación se presenta la Discusión General de la Tesis.

I.3- REFERENCIAS

1. Mooi, F. R., and de Greeff, S. C. (2007) The case for maternal vaccination against pertussis, *Lancet Infect Dis.* 7, 614-624.
2. Cone, T. E. J. (1970) Whooping cough is first described as a disease sui generis by Baillou in 1640, *Pediatrics* 46, 522.
3. Bordet, J., and Gengou, O. (1906) Le microbe de la coqueluche, *Ann Inst Pasteur Microbiol* 20, 48-68.
4. Cherry, J. D., Brunell, P. A., Golden, G. S. and D. T. Karzon. (1988) Report of the task force on pertussis and pertussis immunization, *Pediatrics* 81, 939-984.
5. Ledermann, W. D. (2004) Breve historia de la Bordetella pertussis, una elusiva damisela, *Rev. Chil. Infect.* 23, 241-246.
6. Sato, Y., Kimura, M. and H. Fukumi. (2008) Development of a pertussis component vaccine in Japan, *Lancet* 369, 122-126.
7. Cherry, J., Heininger, U., Feigin, R., Demmler, G., and Kaplan, S. (2004) Pertussis and other Bordetella infections. Textbook of pediatric infectious diseases. Philadelphia, Pa.: The W. B. Saunders Co, 1588-1608.
8. Sturmberg, J. P., and Watt, P. (1999) Could it be whooping cough?, *Aust Fam Physician.* 28, 129-131.
9. Cherry, J. D. (1984) The epidemiology of pertussis and pertussis immunization in the United Kingdom and the United States: a comparative study, *Curr. Probl. Pediatr* 14, 1-78.
10. Davis, S., Strebel, P., Cochi, S., Zell, E., and Hadler, S. *Pertussis surveillance-United States, 1989-1991. MMWR* 1992;41(No. SS-8):11-19.
11. Mattoo, S., and Cherry, J. D. (2005) Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to Bordetella pertussis and other Bordetella subspecies, *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 326-382.
12. Pertussis. (2006) World Health Organization. Disponible en: <http://www.who.int/immunizationmonitoring/diseases/pertussis/en/index.html>.
13. Edwards, K., and Freeman, D. (2006) Adolescent and adult pertussis: disease burden and prevention, *Curr Opin Pediatr* 18, 77-80.
14. Cherry, J. D. (1999) Epidemiological, clinical, and laboratory aspects of pertussis in adults, *Clin Infect Dis* 28 Suppl 2, S112-S117.
15. Riva Posse, C., and Miceli, I. P. (2005) Evolucion de coqueluche en la Argentina del siglo XX, *Medicina* 65, 7-16.
16. Direccion Nacional Epidemiologia, M. S. y. A., Argentina. (2006) Disponible en: http://www.msal.gov.ar/hm/Site/sala_situacion/index.asp.
17. Romanin, V., Salvay, M.C., Man, C., Mistchenko, A. and A. Gentile (2005) Brote de Bordetella pertussis en un hospital pediátrico, *Rev. Hosp. Niños Buenos Aires* 47, 214.
18. Halperin, S. A. (2007) The control of pertussis-2007 and beyond., *N Engl J Med* 356 (2), 110-113.
19. Sintchenko, V. (2008) The re-emergence of pertussis: implications for diagnosis and surveillance, *N S W Public Health Bull.* 19, 143-145.
20. Fingerhann, M., Fernandez, J., Sisti, F., Rodriguez, M. E., Gatti, B., Bottero, D., Graieb, A., Gaillard, M. E., Ayala, S. G., Mooi, F. R., Lopardo, H., and Hozbor, D. (2006) Differences of circulating Bordetella pertussis population in Argentina from the strain used in vaccine production, *Vaccine.* 24, 3513-3521. Epub 2006 Feb 3528.
21. Immunization. *Vaccines and biologicals: pertussis vaccine. 2006. World Health Organization.* <http://www.who.int/vaccines/en/pertussis>.
22. Sandora, T. J., Gidengil, C. A., and Lee, G. M. (2008) Pertussis vaccination for health care workers, *Clin Microbiol Rev.* 21, 426-434.

23. McEniery, J. D., Delbridge, R. G. and D. M. Reith (2004) Infant pertussis deaths and the management of cardiovascular compromise, *J. Paediatr. Child Health* 40, 230-232.
24. Smith, C., and Vyas, H. (2000) Early infantile pertussis: increasingly prevalent and potentially fatal, *Eur. J. Pediatr.* 159, 898-900.
25. Bisgard, K. M., Pascual, F. B., Ehresmann, K. R., Miller, C. A., Cianfrini, C., Jennings, C. E., Rebmann, C. A., Gabel, J., Schauer, S. L., and Lett, S. M. (2004) Infant pertussis: who was the source?, *Pediatr Infect Dis J.* 23, 985-989.
26. Birkebaek, N. H., Kristiansen, M., Seefeldt, T., Degn, J., Moller, A., Heron, I., Andersen, P.L., Moller, J.K. and L. Ostergard (1999) Bordetella pertussis and chronic cough in adults, *Clin. Infect. Dis.* 29, 1239-1242.
27. Muller, F. M., Hoppe J. E. and C. H. Wirsing von Konig. (1997) Laboratory diagnosis of pertussis: state of the art in 1997, *J. Clin. Microbiol* 35, 2435-2443.
28. Lievano, F. A., Reynolds, M. A., Waring, A. L., Ackelsberg, J., Bisgard, K. M., Sanden, G. N., Guris, D., Golaz, A., Bopp, D. J., Limberger, R. J., and Smith, P. F. (2002) Issues associated with and recommendations for using PCR to detect outbreaks of pertussis, *J Clin Microbiol.* 40, 2801-2805.
29. Cotter, P. A., and Miller, J. F. (2000) Genetic analysis of the Bordetella infectious cycle, *Immunopharmacology.* 48, 253-255.
30. Preston, A. (2005) Bordetella pertussis: the intersection of genomics and pathobiology, *Cmaj.* 173, 55-62.
31. Cotter, P., and Miller, J. (2001) Bordetella. In: Groisman EA, Principles of bacterial pathogenesis. San Diego, CA: Academic Press. p. 619-74.
32. Anderton, T. L., Maskell, D. J., and Preston, A. (2004) Ciliostasis is a key early event during colonization of canine tracheal tissue by Bordetella bronchiseptica, *Microbiology.* 150, 2843-2855.
33. Fukui, A., and Horiguchi, Y. (2004) Bordetella dermonecrotic toxin exerting toxicity through activation of the small GTPase Rho, *J Biochem (Tokyo)* 136 (4), 415-419.
34. Gerlach, G., von Wintzingerode, F., Middendorf, B., and Gross, R. (2001) Evolutionary trends in the genus Bordetella, *Microbes Infect.* 3, 61-72.
35. Woolfrey, B. F., and Moody, J. A. (1991) Human infections associated with Bordetella bronchiseptica, *Clin Microbiol Rev.* 4, 243-255.
36. Smith, A. M., Guzman, C. A., and Walker, M. J. (2001) The virulence factors of Bordetella pertussis: a matter of control, *FEMS Microbiol Rev.* 25, 309-333.
37. Uhl, M. A., and Miller, J. F. (1994) Autophosphorylation and phosphotransfer in the Bordetella pertussis BvgAS signal transduction cascade, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 1163-1167.
38. Deora, R., Bootsma, H. J., Miller, J. F. and P. A. Cotter. (2001) Diversity in the Bordetella virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene, *Mol. Microbiol* 40, 669-683.
39. Vergara-Irigaray N., C.-M. A., Rodriguez-Cuesta J., Miller J.F., Cotter P.A., Martinez D.T. (2005) Evaluation of the role of the Bvg intermediate phase in Bordetella pertussis during experimental respiratory infection, *Infect Immun* 73 (2):, 748-760.
40. Cotter, P. A., and DiRita, V. J. (2000) Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective., *Annu Rev Microbiol* 54, 519-565.
41. Melton, A. R., and Weiss, A. A. (1993) Characterization of environmental regulators of Bordetella pertussis, *Infect. Immun* 61, 807-815.
42. Roy, C. R., and Falkow, S. (1991) Identification of Bordetella pertussis regulatory sequences required for transcriptional activation of the fhaB gene and autoregulation of the bvgAS operon, *J. Bacteriol.* 173 (7), 2385-2392.

43. Relman, D., Tuomanen, E., Falkow, S., Golenbock, D., Saukkonen, K., and Wright, S. (1990) Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*, *Cell* 61 (7), 1375-1382.
44. Prasad, S., Yin, Y., Rodzinski, E., Tuomanen, E., and Masure, H. (1993) Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*, *Infect Immun* 61 (7), 2780-2785.
45. Menozzi, F., Gantiez, C., and Locht, C. (1991) Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin, *FEMS Microbiol Lett* 62 (1), 59-64.
46. Mooi, F. R., van der Heide, H. G., ter Avest, A. R., Welinder, K. G., Livey, I., van der Zeijst, B. A., and Gaastra, W. (1987) Characterization of fimbrial subunits from *Bordetella* species, *Microb Pathog.* 2, 473-484.
47. Hazenbos, W. L., Geuijen, C. A., van den Berg, B. M., Mooi, F. R., and van Furth, R. (1995) *Bordetella pertussis* fimbriae bind to human monocytes via the minor fimbrial subunit FimD, *J Infect Dis.* 171, 924-929.
48. Geuijen, C., Willems, R., and Mooi, F. (1996) The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars, *Infect Immun* 64 (7), 2657-2665.
49. Henderson, I. R., and Nataro, J. P. (2001) Virulence functions of autotransporter proteins, *Infect Immun* 69 (3), 1231-1243.
50. Charles, I. G., Dougan, G., Pickard, D., Chatfield, S., Smith, M., Novotny, P., Morrissey, P., and Fairweather, N. F. (1989) Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86, 3554-3558.
51. Welch, R. (1991) Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria, *Mol Microbiol* 5, 521-528.
52. Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A., and Danchin, A. (1988) Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*, *Embo J.* 7, 3997-4004.
53. Zaretzky, F. R., Gray, M. C., and Hewlett, E. L. (2002) Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of *Bordetella pertussis*: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction, *Mol Microbiol* 45 (6), 1589-1598.
54. Wolff, J., Cook, G., Goldhammer, A., and Berkowitz, S. (1980) Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77, 3841-3844.
55. Confer, D., Slungaard, A., Graf, E., Panter, S., and Eaton, J. (1984) *Bordetella* adenylate cyclase toxin: entry of bacterial adenylate cyclase into mammalian cells, *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* 17, 183-187.
56. Nicosia, A., Perugini, M., Franzini, C., Casagli, M. C., Borri, M. G., Antoni, G., Almoni, M., Neri, P., Ratti, G., and Rappuoli, R. (1986) Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: operon structure and gene duplication, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 4631-4635.
57. Kaslow, H., and Burns, D. (1992) Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation, *FASEB J.* 6 (9), 2684-2690.
58. Katada, T., Tamura, M., and Ui, M. (1983) The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein, *Arch Biochem Biophys* 224 (1), 290-298.
59. Carbonetti, N. H., Artamonova, G. V., Van Rooijen, N., and Ayala, V. I. (2007) Pertussis toxin targets airway macrophages to promote *Bordetella pertussis* infection of the respiratory tract, *Infect Immun.* 75, 1713-1720. Epub 2007 Jan 1722.
60. Cowell, J., Hewlett, E., and Manclark, C. (1979) Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*, *Infect Immun.* 25 (3), 896-901.

61. Luker, K., Collier, J., Kolodziej, E., Marshall, G., and Goldman, W. (1993) Bordetella pertussis tracheal cytotoxin and other muramyl peptides: distinct structure-activity relationships for respiratory epithelial cytopathology, *Proc Natl Acad Sci USA*. 90 (6), 2365-2369.
62. Flak, T., and Goldman, W. (1996) Autotoxicity of nitric oxide in airway disease, *Am J Respir Crit Care Med*. 154 (4 Pt 2): S202-S6.
63. Flak, T. A., and Goldman, W. E. (1999) Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis, *Cell Microbiol* 1 (1), 51-60.
64. Preston, A., Thomas, R., and Maskell, D. J. (2002) Mutational analysis of the Bordetella pertussis wlb LPS biosynthesis locus, *Microb Pathog* 33 (3), 91-95.
65. Nakase, Y., Tateishi, M., Sekiya, K., and Kasuga, T. (1970) Chemical and biological properties of the purified O antigen of Bordetella pertussis, *Jpn J Microbiol* 14 (1), 1-8.
66. Schaeffer, L. M., McCormack, F. X., Wu, H., and Weiss, A. A. (2004) Bordetella pertussis lipopolysaccharide resists the bactericidal effects of pulmonary surfactant protein A, *J Immunol* 173 (3), 1959-1965.
67. Litwin, C., and Calderwood, S. (1993) Role of iron in regulation of virulence genes, *Clin Microbiol Rev*. 6 (2), 137-149.
68. Weinberg, E., Roth, J., Bolin, C., Brogden, K., Minion, F., and Wannemuehler, M. (1995) Acquisition of iron and other nutrients in vivo Virulence mechanisms of bacterial pathogens, *Washington, D. C.: American Society for Microbiology*. 81-95.
69. Moore, C. H., Foster, L. A., Gerbig, D. G., Jr, Dyer, D. W., and Gibson, B. W. (1995) Identification of alcaligin as the siderophore produced by Bordetella pertussis and B. bronchiseptica, *J Bacteriol* 177 (4): , 1116-1118.
70. Van Den Berg, B. M., Beek Huizen, H., Willems, R. J. L., Mooi, F. R. and R. Van Furth. (1999) Role of Bordetella pertussis virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract, *Infect. Immun* 67(3), 1056-1062.
71. van den Akker, W. M. (1998) The filamentous hemagglutinin of Bordetella parapertussis is the major adhesin in the phase-dependent interaction with NCI-H292 human lung epithelial cells, *Biophys. Res. Commun* 252, 128-133.
72. Munoz, J. J. (1988) Action of pertussigen (pertussis toxin) on the host immune system in pathogenesis and immunity in pertussis. p. 173-192., *In A. C. Wardlaw and R. Parton (ed.), Pathogenesis and immunity in pertussis. John Wiley & Sons, Ltd., New York, N.Y.*
73. Bassinet, L., Gueirard, P., Maitre, B., Housset, B., Gounon, P., and Guiso, N. (2000) Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by Bordetella pertussis, *Infect. Immun* 68, 1934-1941.
74. Friedman, R. L., Nordensson, K., Wilson, L., Akporiaye, E. T., and Yocuml, D. E. (1992) Uptake and intracellular survival of Bordetella pertussis in human macrophages, *Infect. Immun* 60(11), 4578-4585.
75. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., and Lappin-Scott, H. M. (1995) Microbial biofilms, *Annu Rev Microbiol*. 49, 711-745.
76. Donlan, R. M. (2001) Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process, *Clin Infect Dis*. 33, 1387-1392. Epub 2001 Sep 1320.
77. Bosch, A., Serra, D., Prieto, C., Schmitt, J., Naumann, D., and Yantorno, O. (2006) Characterization of Bordetella pertussis growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy, *Appl Microbiol Biotechnol*. 71, 736-747. Epub 2005 Nov 2016.
78. Serra, D., Bosch A., Russo, D., Rodriguez, M., Zorreguieta, A., Schmitt, J., Naumann, D., and O. Yantorno. (2007) Continuous nondestructive monitoring of Bordetella pertussis biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy and other corroborative techniques, *Anal Bioanal Chem* 387, 1759-1767.

79. Mills, K. H. (2001) Immunity to *Bordetella pertussis*, *Microbes. Infect* 3, 655-677.
80. Mills, K., Ryan, M., McGuirk, P., Griffin, F., Murphy, G., and Mahon, B. (1999) The immunology of *Bordetella pertussis* infection, *Biologicals* 27(2), 77.
81. Cherry, J., Gornbein, J., Heininger, U., and Stehr, K. (1998) A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses, *Vaccine* 16 (20), 1901-1906.
82. de Melker, H. E., Schellekens, J. F., Neppelenbroek, S. E., Mooi, F. R., Rumke, H. C., and Conyn-van Spaendonck, M. A. (2000) Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of the Netherlands: observations on surveillance data, *Emerg Infect Dis* 6 (4), 348-357.
83. Menzies, R., Wang, H., and McIntyre, P. (2003) Has pertussis increased in NSW over the past decade? An evaluation using hospitalisation and mortality data versus notifications 1988-2002., *NSW Public Health Bull* 14 (4-5), 71-76.
84. Altunaiji, S., Jukuruzovic, R., Curtis, N., and Massie, J. (2007) Antibiotics for whooping cough (pertussis), *Cochrane Database Syst rev*.
85. Gonzalez-Hachero, J. (1999) Diagnostico de la Tos Ferina, *Vox Paediatrica* 7, 135-138.
86. Mastrantonio, P., Spigaglia, P., van Oirschot, H., van der Heide, H. G., Heuvelman, K., Stefanelli, P., and Mooi, F. R. (1999) Antigenic variants in *Bordetella pertussis* strains isolated from vaccinated and unvaccinated children, *Microbiology*. 145, 2069-2075.
87. Elomaa, A., Advani, A., Donnelly, D., Antila, M., Mertsola, J., Hallander, H., and He, Q. (2005) Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates in finland, where the whole-cell pertussis vaccine has been used for 50 years, *J Clin Microbiol*. 43, 3681-3687.
88. Mooi, F. R., van Loo, I. H., and King, A. J. (2001) Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: a cause for its reemergence?, *Emerg Infect Dis*. 7, 526-528.
89. Bouchez, V., Caro, V., Levillain, E., Guigon, G., and Guiso, N. (2008) Genomic content of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in areas of intensive children vaccination, *PLoS One*. 3, e2437.
90. Botero, D., Gaillard, M., Fingerman, M., Weltman, G., Fernandez, J., Sisti, F., Graieb, A., Roberts, R., Rico, O., Rios, G., Regueira, M., Binztein, N., and Hozbor, D. (2007) Pulsed-Field gel electrophoresis, Pertactin, Pertussis Toxin S1 subunit polymorphisms and surface analysis of vaccine and chemical *Bordetella pertussis* strains, *Clin Vacc immunol* 14, 1490-1498.
91. Bosch, A., Golowczyc, M., Abraham, A., Garrote, G., De Antoni, G., and Yantorno, O. (2006) Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy, *Int J Food Microbiol* 111, 280-287.
92. Bosch, A., Miñan, A., Vescina, C., Degrossi, J., Gatti, B., Monttanaro, P., Messina, M., Franco, M., Vay, C., Schmitt, J., Naumann, D., and Yantorno, O. (2008) Fourier transform infrared spectroscopy for rapid identification of nonfermenting Gram negative bacteria isolated from sputum samples from cystic patients, *J Clin Microbiol* 46, 2535-2546.
93. Curk, M., Peladan, F., and Hubert, J. (1994) Fourier transform infrared spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species, *FEMS Microbiol Lett* 123, 241-248.
94. Bastert, J., Korting, H., Traenkle, A., and Schmalreck, A. (1999) Identification of dermatophytes by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), *Mycoses* 42, 525-528.
95. Amiel, C., Mariey, L., Denis, C., Pichon, P., and Travert, J. (2001) FT-IR spectroscopy and taxonomic purpose: Contribution to the classification of lactic acid bacteria, *Lait* 81, 249-255.

96. Helm, D., Labischinsky, H., Schallehn, G., and Naumann, D. (1991) Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy, *J Gen Microbiol* 137, 69-79.
97. Van der Mei, H., Naumann, D., and Busscher, H. (1993) Grouping of oral streptococcal species using Fourier-transform infrared spectroscopy in comparison with classical microbiological identification, *Arch Oral Biol* 38, 1013-1019.
98. Kummerle, M., Scherer, S., and Seiler, H. (1998) Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy, *Appl Environ Microbiol.* 64, 2207-2214.
99. Johnsen, K., and Nielsen, P. (1999) Diversity of Pseudomonas strains isolated with King's B and Gould's S1 agar determined by repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction, 16S rDNA sequencing and Fourier transform infrared spectroscopy characterisation, *FEMS Microbiol Lett* 173, 155-162.
100. Amiel, C., Mariey, L., Curk-Daubie, M., Pichon, P., and Travert, J. (2000) Potentiality of Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) for discrimination and identification of dairy lactic acid bacteria, *Lait* 80, 445-459.
101. Serra, D. O., Lucking, G., Weiland, F., Schulz, S., Gorg, A., Yantorno, O. M., and Ehling-Schulz, M. (2008) Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in Bordetella pertussis, *Proteomics.* 8, 4995-5010.
102. Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clin Microbiol Rev.* 15, 167-193.
103. Fuqua, W. C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators, *J Bacteriol.* 176, 269-275.
104. Miller, M. B., and Bassler, B. L. (2001) Quorum sensing in bacteria, *Annu Rev Microbiol.* 55, 165-199.
105. Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J., and Salmond, G. P. (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria, *FEMS Microbiol Rev.* 25, 365-404.
106. Swift, S., Downie, J. A., Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Salmond, G. P., and Williams, P. (2001) Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology, *Adv Microb Physiol.* 45, 199-270.

CAPÍTULO II

Diferenciación fenotípica entre aislados clínicos y cepas de referencia de *Bordetella pertussis* mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier

ÍNDICE DEL CAPÍTULO II	Página
II.1- INTRODUCCIÓN	37
II.1.1- Resurgimiento de la tos convulsa.....	37
II.1.2- Reemergencia de la tos convulsa en Argentina	38
II.1.3- Espectroscopía infrarroja: generalidades.....	39
II.1.4- Estados vibracionales en moléculas poli-atómicas complejas.....	41
II.1.5- Espectroscopía FT-IR de materiales biológicos complejos.....	42
II.1.6- Técnicas de medición de espectros IR de muestras microbianas.....	45
II.1.6.1- <i>Medidas de Absorbancia / Transmitancia</i>	46
II.1.6.2- <i>Adquisición y análisis de espectros IR</i>	46
II.1.7- Objetivos del capítulo.....	48
II.2- MATERIALES Y MÉTODOS	49
II.2.1- Microorganismos y condiciones de cultivo	49
II.2.1.1- <i>Cepas de referencia y aislados clínicos</i>	49
II.2.1.2- <i>Condiciones de cultivo</i>	49
II.2.2- Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier	50
II.2.2.1- <i>Ajuste de la cantidad de biomasa a analizar por espectroscopía FT-IR</i>	50
II.2.2.2- <i>Preparación de muestras</i>	51
II.2.2.3- <i>Tratamiento de las muestras</i>	51
II.2.2.4- <i>Espectrómetro</i>	53
II.2.2.5- <i>Adquisición de espectros</i>	54
II.2.2.6- <i>Eliminación del vapor de agua</i>	54
II.2.3- Análisis y pre-tratamiento de espectros.....	54
II.2.3.1- <i>Prueba de Calidad Espectral</i>	54
II.2.3.2- <i>Pre-tratamiento de espectros</i>	56
II.2.4- Estudios de discriminación fenotípica.....	58
II.2.4.1- <i>Diferenciación fenotípica entre organismos del género Bordetella</i>	58
II.2.4.2- <i>Diferenciación fenotípica entre muestras de B. pertussis</i>	59

II.3- RESULTADOS	60
II.3.1- Ajuste de la cantidad de biomasa a analizar mediante FT-IR.....	60
II.3.2- Análisis de variabilidad o varianza espectral.....	61
II.3.3- Análisis de reproducibilidad espectral.....	62
II.3.4- Estudios de discriminación fenotípica.....	69
II.3.4.1- <i>Diferenciación fenotípica entre B. pertussis y B. bronchiseptica</i>	69
II.3.4.2- <i>Diferenciación fenotípica entre aislados clínicos de B. pertussis</i>	71
II.4- DISCUSIÓN	74
II.5- REFERENCIAS	76

II.1- INTRODUCCIÓN

II.1.1- Resurgimiento de la tos convulsa

Con la introducción y uso generalizado de vacunas, la tasa de casos notificados de pertussis se redujo notoriamente. Sin embargo después de casi 60 años de uso intensivo de vacunas se comprueba que la enfermedad se ha mantenido y que en la década de 1990 resurgió en varios países, incluso en aquellos con poblaciones altamente vacunadas (1), siendo un importante problema de salud particularmente en las regiones subdesarrolladas con bajas tasas de vacunación. La disminución de la inmunidad adquirida por vacunación luego de 6-8 años, no puede explicar por sí sola el marcado aumento de la incidencia de la enfermedad en un amplio rango de edades. Estudios recientes apoyan la evidencia de que la utilización de la vacuna difteria-tétano-pertussis celular (DTPc) ha llevado al control únicamente de los aislamientos similares a las cepas vacunales (2-3). Resulta cada vez más evidente que la adaptación del patógeno, impulsada por sucesivas modificaciones genéticas, es un aspecto crucial en el resurgimiento de la enfermedad (4). El hecho de que pertussis sea todavía una enfermedad endémica a pesar de la vacunación, estaría generado entre otras causas por los cambios antigénicos en los aislados circulantes de manera tal que las cepas vacunales no son capaces de inducir la inmunidad necesaria para proteger contra estos nuevos aislados (5-6).

Estudios comparativos de aislados clínicos de distintos países, mediante serotipificación y técnicas de genética molecular, como el análisis de secuencias de genes de factores de virulencia, revelaron diferencias entre cepas vacunales y aislados clínicos que podrían contribuir a explicar la adaptación del patógeno (7-8). En este contexto, se ha reportado que la variación o divergencia antigénica entre aislados clínicos y cepas vacunales estaría asociada con el polimorfismo de los genes que codifican para factores de virulencia como PRN, FIM y PT, cuyos epítopes se modificarían dificultando el reconocimiento del patógeno por el sistema inmunológico luego de la vacunación (9-10). Se ha encontrado que, en general, los alelos “tipo no vacunal” de los genes que codifican para PT, PRN y la FIM han reemplazado gradualmente a los alelos “tipo vacunal” que estaban inicialmente en circulación. Es decir que la vacunación ha seleccionado cepas circulantes antigénicamente diferentes de las cepas vacunales (10). En relación a esta información cabe precisar que se han descrito al menos 13 alelos para el gen que codifica Prn, de los cuales los alelos *prn1*, *prn2* y *prn3* son los que exhiben mayor predominancia en los aislados circulantes, sin embargo la mayoría de las cepas vacunales contienen los alelos *prn1* o *prn7* (11). Asimismo,

se ha identificado para el gen *fim2* los alelos *fim2-1* y *fim2-2* los cuales están presentes en las cepas circulantes, mientras que las cepas vacunales contienen únicamente el alelo *fim2-1*; en tanto del gen *fim3* se encontraron 4 alelos, de los cuales solo *fim3-1* está presente en la mayoría de las cepas vacunales (12). Para la subunidad PtxA de la toxina pertussis se identificaron 8 alelos, no obstante las cepas vacunales contienen, según se ha demostrado, solamente *ptxA1*, *ptxA2* y *ptxA4* (13). Recientemente Mooi y col reportaron que el drástico aumento de casos de tos convulsa en los Países Bajos después de 1995, podría estar asociado con la aparición de cepas de *B. pertussis* portando un nuevo alelo para el promotor de la toxina pertussis, *ptxP3*, el cual habría reemplazado a *ptxP1*, confiriendo un aumento en la producción de dicha toxina y por consiguiente mayor virulencia (14).

Análisis de cepas circulantes aisladas recientemente en Europa han demostrado que las mismas pueden expresar menos y también modificados antígenos vacunales o exhiben una mayor expresión de antígenos no vacunales (15). Heikkinen y col comunicaron que cepas clínicas aisladas en Finlandia en las décadas de 1950 y 1960 exhibían sólo siete genes ausentes respecto a la cepa *B. pertussis* Tohama I (aislada en 1954), mientras que cepas aisladas durante la década de 1970 presentaban la delección de 24 genes respecto a dicha cepa de referencia. El contenido de los genes de las cepas aisladas en los 20 años siguientes se mantuvo básicamente semejante (16-17). Se ha descrito que las vacunas actuales contienen antígenos que solo se encuentran en el 10% de los aislados de *B. pertussis*, por lo que la vacunación tanto con vacunas a células enteras como con vacunas acelulares exhibiría una reducida protección contra las cepas circulantes (18). Estos estudios confirman que la población de *B. pertussis* es dinámica y evoluciona constantemente, lo cual sugiere que la bacteria podría utilizar la pérdida de genes, además de la sustitución de alelos, como estrategias para adaptarse a poblaciones altamente inmunizadas (19-20). Es evidente que para poder controlar la tos convulsa, la vigilancia de la enfermedad debe continuar involucrando métodos de diagnóstico específicos, así como un intensivo análisis de los organismos circulantes para lograr diseñar vacunas que resulten apropiadas.

II.1.2- Reemergencia de la tos convulsa en Argentina

En nuestro país mediante la aplicación de técnicas moleculares, como la electroforesis de campo pulsado (PFGE) y la tipificación de los genes *prn* y *ptxSA*, se ha logrado determinar las diferencias genotípicas existentes entre cepas circulantes de Argentina y las cepas vacunales de *pertussis*, detectando polimorfismo alélico y variación de factores de virulencia entre las mismas (4). Por medio de estos estudios se determinó que la gran mayoría de las

cepas circulantes aisladas en Argentina a partir de 1980 presentaban la variante 1 de la subunidad A de PTx (PtxA1), sin embargo las cepas utilizadas en la elaboración de las vacunas contienen la variante 2 de dicha subunidad (PtxA2). Mientras que para el factor de virulencia pertactina las cepas circulantes poseen en general la variante 2 (PRN 2), las cepas vacunales contienen la variante 1 (PRN 1) (4, 21). Las variaciones encontradas permitieron corroborar la existencia de divergencia antigénica entre las cepas vacunales y cepas circulantes aisladas en Argentina, lo cual lleva a que el patógeno sea menos sensible a la inmunidad inducida por la vacunación, contribuyendo al aumento de la incidencia de pertussis y por lo tanto a su reemergencia (4). Asimismo, se ha indicado que las variantes antigénicas halladas en Argentina son mayoritariamente las mismas a las encontradas en Australia, Japón y países europeos, argumentando a favor de una presión de selección dirigida por la vacuna (22). En definitiva los estudios moleculares realizados en Argentina, muestran diferencias genéticas entre cepas circulantes y vacunales de *B. pertussis*, lo cual es fundamental tener en cuenta para el desarrollo de una vacuna mejorada.

II.1.3- Espectroscopía infrarroja: generalidades

La espectroscopía infrarroja (IR) ha sido extensamente utilizada en combinación con métodos estadísticos multivariantes para realizar estudios taxonómicos de microorganismos a nivel intra e interespecie, como así también intergénero (23-30). Dada la permanente “evolución” de los organismos circulantes de *B. pertussis* se decidió aplicar esta metodología a efectos de establecer si mediante la misma se podían encontrar diferencias en la composición bioquímica de los organismos en estudio que permitieran establecer diferencias a nivel intraespecie. En el presente capítulo, se utiliza la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) junto con el método estadístico multivariante Análisis Jerárquico de Clusters (AJC), con el fin de discriminar fenotípicamente aislamientos clínicos recientes y cepas de referencia de *B. pertussis*.

A continuación se describen algunas características de la espectroscopía FT-IR y del método AJC aplicado en los estudios de diferenciación fenotípica. La espectroscopía IR es una técnica de análisis que se basa en la absorción de luz IR (4000 a 400 cm^{-1}) por parte de los distintos enlaces químicos presentes en las moléculas. Dicha absorción produce la excitación de estados vibracionales y rotacionales de los enlaces, los cuales poseen una frecuencia de vibración en el rango infrarrojo del espectro electromagnético. La mayoría de los espectros IR representan las vibraciones propias de los estiramientos de las uniones químicas, que

ocurren a alta energía dentro de la región IR, y las absorciones asociadas al balanceo de los enlaces, que se producen a baja energía. Para la absorción de luz IR, las moléculas deben poseer un dipolo oscilante, el cual debe cambiar cuando ocurre la transición para permitir la absorción. Asimismo, las frecuencias de vibración dependerán de la constante de fuerza de los enlaces entre los átomos y las masas de los mismos. Las vibraciones entre átomos pueden ser debidas a cambios en la longitud del enlace (estiramiento) o cambios en el ángulo de enlace (balanceo), siempre conservando el centro de masas (31-32) (Fig. 1).

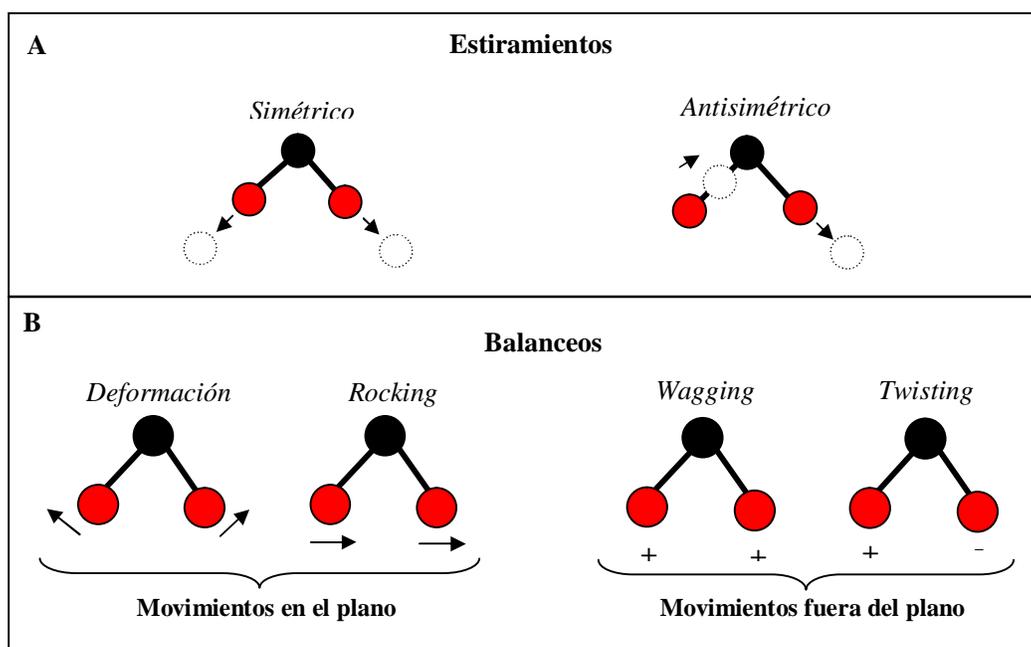


Fig. 1. Tipos de vibraciones entre átomos. A) Vibraciones por Estiramientos: Son generadas por cambios en la longitud del enlace entre dos átomos. B) Vibraciones por Balanceos: Son causadas por cambios en el ángulo de enlace, ya sea en el plano o por fuera de este.

La luz infrarroja es relativamente de baja energía, de modo que al producirse una absorción IR en las moléculas los niveles cuánticos vibracionales o rotacionales se excitan a un nivel cuántico vibracional o rotacional mayor pero no a un nivel cuántico electrónico mayor (33). Para una molécula sencilla como el agua, las bandas espectrales pueden ser interpretadas como provenientes de vibraciones de balanceo, estiramiento simétrico y antisimétrico. En consecuencia deberán observarse 3 bandas de absorción en el espectro IR correspondiente (Fig. 2). Cada uno de los modos normales de vibración está asociado a una variación de energía potencial y consecuentemente a un conjunto de niveles energéticos.

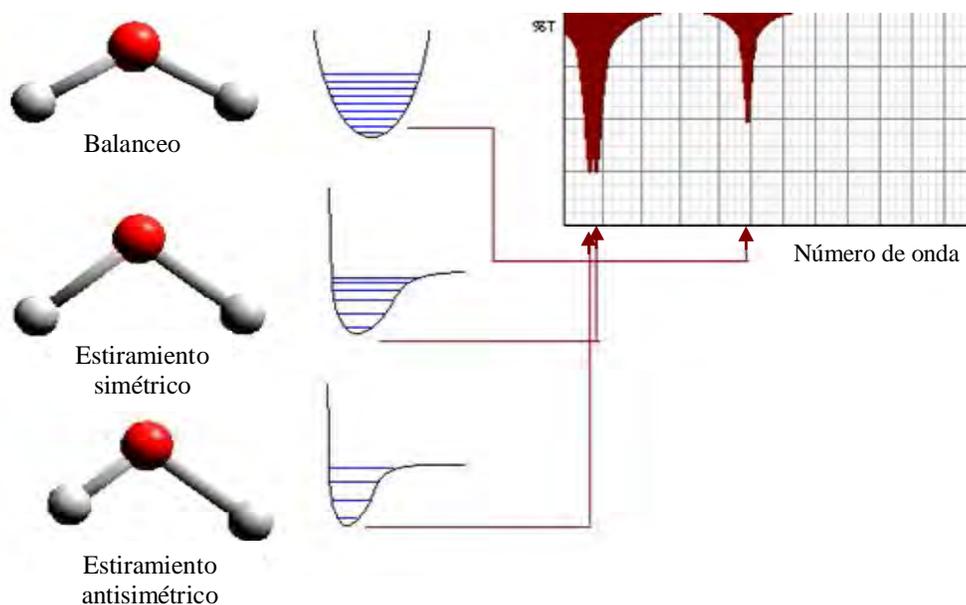


Fig. 2. Bandas de absorción vibracional para la molécula de agua. Para una molécula sencilla como el agua, las 3 bandas de absorción provienen de las vibraciones generadas por balanceo y por el estiramiento simétrico y antisimétrico.

II.1.4- Estados vibracionales en moléculas poli-atómicas complejas

Una molécula poli-atómica puede tener distintos modos vibracionales activos, de modo que es posible a través de radiación IR excitar dos o más vibraciones al mismo tiempo (31). Para una molécula poli-atómica con mayor complejidad que el H_2O , se observa un total de $3N-6$ modos normales de vibración, donde N es el número total de átomos. Si tomamos como ejemplo al pentano (C_5H_{12}), deberíamos considerar para el análisis 45 modos normales de vibración, lo cual resulta muy complicado de analizar. Sin embargo podríamos simplificar este análisis asumiendo que cada grupo funcional en la molécula puede ser tratado de manera independiente. En el ejemplo del pentano, se puede asumir que la molécula presenta dos grupos funcionales: metilos (CH_3) y metilenos (CH_2). Cada grupo funcional tiene un conjunto propio de frecuencias de vibración que corresponden a sus modos normales de vibración. Bajo esta consideración, el espectro del pentano podría ser considerado como el resultado de la absorción de ambos grupos funcionales tomados independientemente, sin considerar dónde se encuentre el grupo dentro de la molécula (33). Las bandas de absorción que se encuentran a números de onda mayores a 1400 cm^{-1} corresponden a los estiramientos simétricos y antisimétricos y a los balanceos de los enlaces C-H del metilo y metileno. Las bandas ubicadas a números de onda menores a 1400 cm^{-1} son parte de la denominada *Región de Huella Dactilar (fingerprint)*. Las bandas observadas en esta región dependen de la

estructura global de la molécula, más que de los estiramientos o balanceos de un enlace químico. El dibujo (*pattern*) en esta región es específico para cada molécula, por lo que permite la comparación con espectros de referencia para identificar o discriminar entre moléculas muy similares (34) (Ver Figuras 3 y 4).

Existen dos causas principales que dan origen a la diferente intensidad de las bandas de absorción. Una es la concentración del componente en la muestra y la otra es la magnitud del cambio en el momento dipolar del grupo funcional, que dio origen a dicha banda en la muestra (31). La ecuación que relaciona ambas causas es la ley de Lambert y Beer: $A = \epsilon l c$. En esta ecuación, **A** representa la absorbancia, la cual es medida por el alto o por el área de la banda. El parámetro **l**, constituye el paso óptico, que por lo general tiene un valor del orden de los micrones para muestras sólidas y líquidas. La concentración (**c**) puede ser medida en moles·l⁻¹, ppm o % (p/p). Finalmente, la absorptividad molar (ϵ) es un parámetro proporcional al cambio en el momento dipolar y representa, para una muestra dada a un determinado número de onda, una constante invariante

Podría suceder que dos o más grupos funcionales provenientes de una o más moléculas tengan su banda de absorción a un número de onda similar o muy cercano, esto producirá un aumento en el ancho de banda debido a la superposición de picos. Esta superposición de bandas es comúnmente observada en espectros IR correspondientes a material de origen biológico (34).

II.1.5- Espectroscopía FT-IR de materiales biológicos complejos

Todos los sistemas biológicos presentan una gran variabilidad temporal y espacial en la composición química. Los cambios químicos de las células dependen entre otros factores de la edad de las mismas y del tipo y condición de cultivo. Dado que las muestras biológicas están constituidas por las mismas macromoléculas, los espectros IR poseen un perfil similar (32). A fin de interpretar químicamente el espectro IR de una muestra biológica, diversos grupos de trabajo realizaron estudios con moléculas individuales que permitieron asignar la presencia de bandas espectrales a diferentes grupos funcionales (31, 34-35). De esta manera, se consiguió asociar cada banda de un espectro IR con su correspondiente componente macromolecular. En la Figura 3 se observa la asignación de las bandas espectrales a las principales macromoléculas constituyentes del material biológico. A través de dichos estudios, se consiguió demostrar que el espectro FT-IR representa el perfil fenotípico del material u organismo analizado. Los espectros IR de microorganismos, contienen información sobre las biomoléculas que conforman la pared celular, membranas plasmáticas,

citoplasma y polímeros intracelulares. Un espectro IR constituye una representación del fenotipo, y resulta altamente específico y reproducible sólo cuando se trabaja bajo las mismas condiciones operativas (36). La asignación de picos o frecuencias de absorción a una determinada estructura o grupo funcional, constituye una tarea compleja debido a que las bandas de absorción están compuestas por la superposición de bandas más angostas correspondientes a diferentes componentes celulares. Para solucionar esta dificultad, se comenzaron a aplicar sobre los espectros, técnicas de aumento de resolución como son las derivadas primera y segunda (37).

Para facilitar la interpretación de los espectros, los mismos pueden ser divididos en zonas denominadas regiones o ventanas espectrales (W_i). A continuación, se describen para cada región espectral, las asignaciones de las bandas de absorción pertenecientes a grupos funcionales presentes en biomoléculas (36-37).

- La región entre 4000 y 3100 cm^{-1} , está dominada principalmente por una banda muy ancha debida al estiramiento O-H, correspondiente a grupos oxidrilo y H_2O .

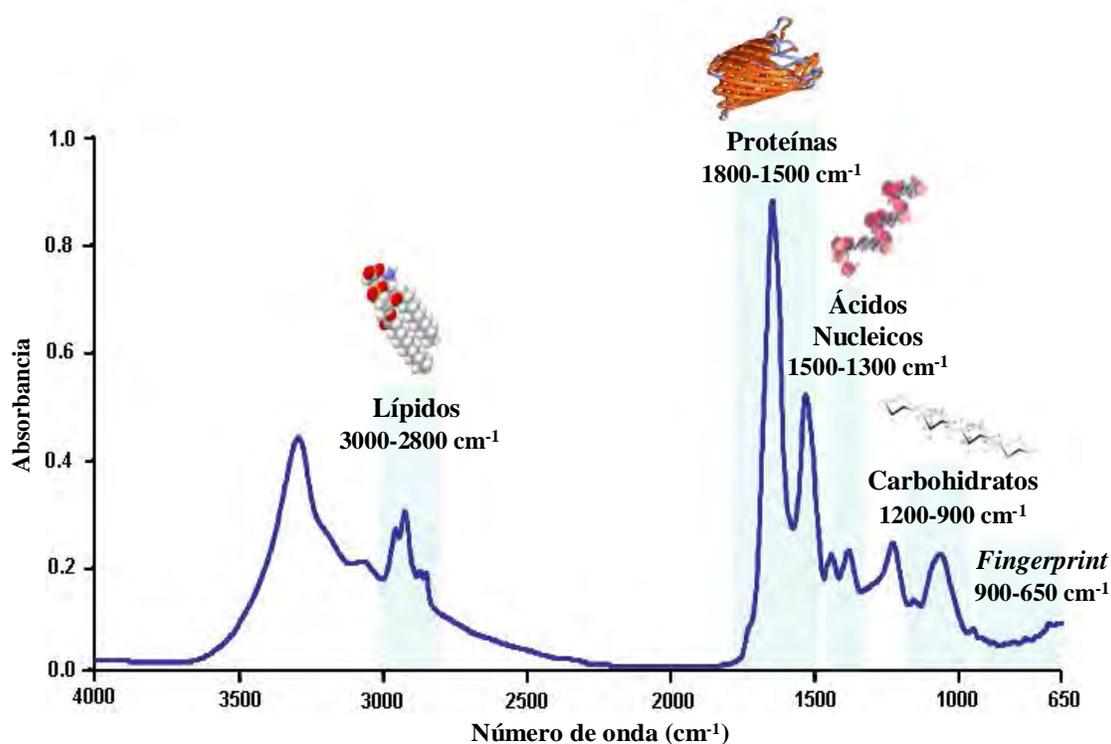


Fig. 3. Asignación de bandas espectrales a las principales macromoléculas constituyentes del material biológico. El rango espectral $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ corresponde a los lípidos, $1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ a las proteínas, $1500\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ a los ácidos nucleicos, $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ a los carbohidratos y $900\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ a la región conocida como *Fingerprint*. El espectro IR pertenece a la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I.

- La región correspondiente a W_1 , ubicada entre 3100 a 2800 cm^{-1} , exhibe las vibraciones debidas a estiramientos y balanceos de C-H en los grupos funcionales CH_3 y CH_2 . Aunque dicha región es atribuida por lo general a la absorción de ácidos grasos, también se le puede atribuir a vibraciones de algunas cadenas laterales de aminoácidos y carbohidratos.

- La ventana W_2 , en el rango 1800-1500 cm^{-1} , es la región donde se registran absorciones de grupos funcionales presentes en proteínas, péptidos y ésteres. Entre 1700-1600 cm^{-1} se ubica la banda más intensa de los espectros de microorganismos, la cual se designa como Amida I. Esta región se caracteriza por la absorción correspondiente al grupo C=O de las amidas. Asimismo, en esta ventana se encuentra la banda correspondiente a Amida II (balanceo de N-H y estiramiento de C-N). Se encuentra también, la banda perteneciente al estiramiento del grupo C=O de los ésteres (1740 cm^{-1}) presente en lípidos y otras moléculas.

- La ventana espectral correspondiente a W_3 , entre 1300 y 1500 cm^{-1} es la denominada zona mixta, ya que involucra absorciones de grupos funcionales presentes en lípidos, proteínas carbohidratos y ácidos nucleicos. En la zona cercana a 1450 cm^{-1} , se encuentra la absorción debida al balanceo C-H correspondientes al CH_2 y CH_3 . Próxima a 1240 cm^{-1} se encuentra una banda ancha debida al estiramiento asimétrico del enlace P=O, constituyendo una superposición de bandas que podrían provenir de grupos fosfodiésteres y fosfatos libres.

- La región espectral W_4 , en el rango 1200-900 cm^{-1} , es principalmente dominada por una serie compleja de picos debidos principalmente a un fuerte acoplamiento de los estiramientos C-C y C-O y de las deformaciones C-O-C y C-O-H correspondientes a diversos oligo y polisacáridos. Asimismo en esta ventana se encuentra el estiramiento simétrico del grupo PO_2^- perteneciente a ácidos nucleicos (1080 cm^{-1}).

- La región de *Fingerprint*, W_5 , ubicada en el intervalo 900-650 cm^{-1} , exhibe gran variedad de picos de muy baja intensidad, pero extremadamente característicos. Esta ventana puede contener también bandas muy débiles de vibraciones de anillos aromáticos de fenilalanina, tirosina, triptofano y de varios nucleótidos. En esta región resulta muy poco probable poder efectuar una asignación de frecuencias de vibración a determinados grupos funcionales. Solo se puede asignar con certeza el pico correspondiente a 720 cm^{-1} por tratarse de una frecuencia característica de los modos vibracionales de torsión del CH_2 de ácidos grasos.

En la Figura 4 se exhibe un espectro bacteriano en el cual se indican las ventanas espectrales y las correspondientes asignaciones de bandas a macromoléculas y grupos funcionales más importantes.

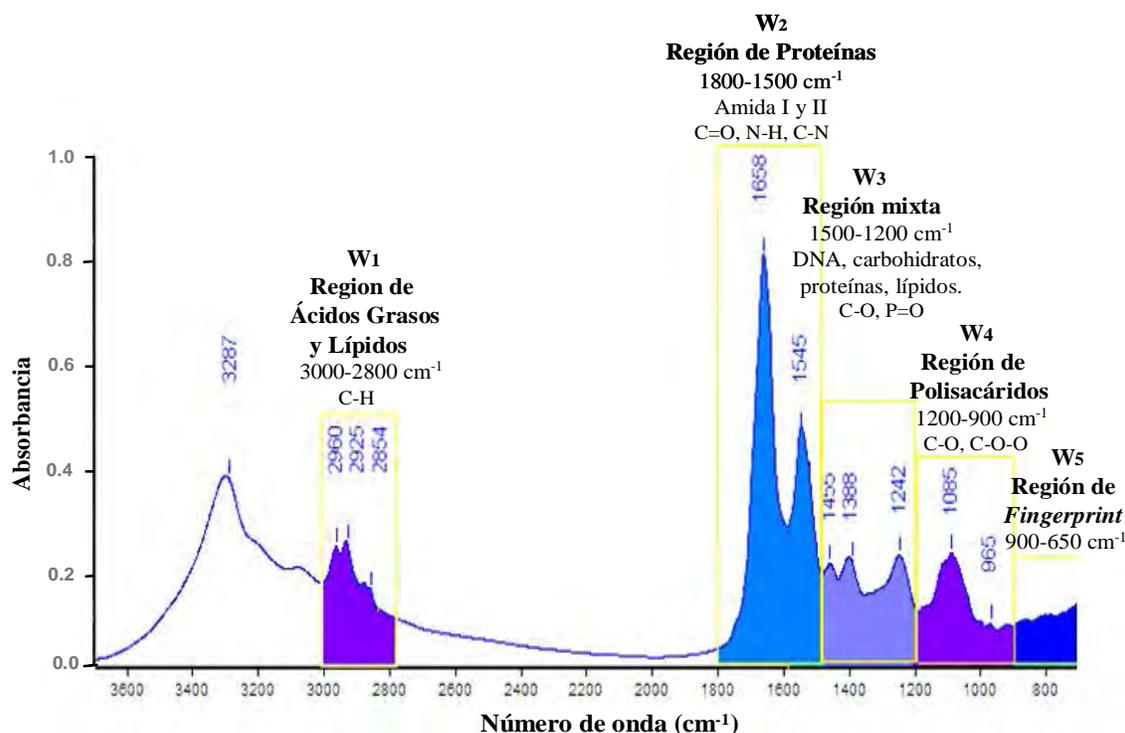


Fig. 4. Espectro bacteriano con sus correspondientes ventanas espectrales. Los espectros IR pueden ser divididos en ventanas o regiones espectrales que facilitan su interpretación. Cada región contiene bandas de absorción pertenecientes a grupos funcionales específicos de las células bacterianas.

II.1.6- Técnicas de medición de espectros IR de muestras microbianas

Para llevar a cabo el estudio de muestras microbianas por espectroscopía FT-IR es fundamental tener presente los siguientes aspectos:

- Las muestras a analizar deben estar en un rango de concentración que permita el cumplimiento de la ley de Lambert y Beer.
- Las muestras una vez preparadas y secas deben tener el aspecto de un film transparente y homogéneo. La heterogeneidad de las mismas produce una dispersión difusa en la superficie de la muestra que provoca desplazamientos en la línea de base de los espectros.
- Las bandas de absorción obtenidas deben poseer una intensidad adecuada para lograr conservar la linealidad en el detector.
- La relación señal/ruido de los espectros IR debe ser suficientemente alta para llevar a cabo su comparación.
- La comparación de espectros IR precisa que los mismos presenten absorbancias IR globales similares en todo el rango espectral.

II.1.6.1- *Medidas de Absorbancia / Transmitancia*

La mayoría de los estudios microbianos realizados con espectroscopía FT-IR se llevan a cabo utilizando la técnica de Absorbancia/Transmitancia (A/T). Debido a que el agua se encuentra prácticamente en todas las muestras biológicas, los materiales que constituyen las celdas deben ser insolubles en agua. Los materiales más comúnmente utilizados son ZnSe, CaF₂, BaF₂, Ge y Si, entre los que difiere el índice de refracción y la zona del espectro donde son transparentes (38).

Distintos dispositivos han sido desarrollados para el análisis de muestras mediante la técnica de Absorbancia/Transmitancia (A/T). El más sencillo consiste en un sistema porta-celda al cual se le puede introducir una sola celda de cualquiera de los materiales indicados previamente. Asimismo, existe otro dispositivo muy utilizado, en particular para la caracterización microbiana, que consiste en un sistema multi-celdas que presenta la capacidad de contener hasta 15 celdas ópticas de ZnSe (39). En esta clase de sistemas se preparan las suspensiones bacterianas a una concentración apropiada, se depositan las suspensiones sobre cada celda y se secan al vacío hasta obtener films homogéneos. Estos sistemas han sido aplicados, en los últimos 20 años en la identificación, caracterización y diferenciación de bacterias, levaduras y hongos, con importancia en el área de la medicina y en el sector industrial (40-41). Los sistemas más modernos disponen de un diseño de multi-celda que permite programar de 96 a 384 lecturas totalmente automatizadas (42). Si el material se agrupa se emplean otros métodos (43).

II.1.6.2- *Adquisición y análisis de espectros IR*

La espectroscopía IR es una técnica sensible a cambios en la composición química de la muestra, por lo que pequeñas modificaciones en la composición de las células asociadas a condiciones de cultivo se traducen en importantes efectos en el espectro resultante (43). La estandarización de los procedimientos de cultivo, la toma de muestra y los parámetros de adquisición de los espectros son algunos de los puntos cruciales a tener en cuenta para obtener reproducibilidad en los resultados. Actualmente la tendencia es emplear procedimientos estandarizados de manera de poder compartir los espectros entre instituciones y construir bases de datos para la identificación de microorganismos aislados en diferentes laboratorios (23, 44).

No siempre resulta sencillo extraer y analizar información espectral. La quemometría es la aplicación de métodos estadísticos y/o matemáticos a los espectros para interpretar de

manera eficiente la información contenida en los mismos. Los métodos estadísticos multivariantes no supervisados, conocidos también como métodos exploratorios o de clasificación objetiva, describen los datos espectrales sin un conocimiento previo de la identidad de las muestras. Entre los métodos multivariantes no supervisados están incluidos el Análisis Jerárquico de Clusters (AJC) y el Análisis de Componente Principal (ACP) (Fig. 5). Los métodos estadísticos no supervisados han sido aplicados en la diferenciación de géneros, especies y cepas, como así también en la clasificación de organismos Gram +/- y en la discriminación acorde a la susceptibilidad a antibióticos. Específicamente, podrían ser aplicados en el análisis de heterogeneidad de una población de microorganismos (32, 45-46).

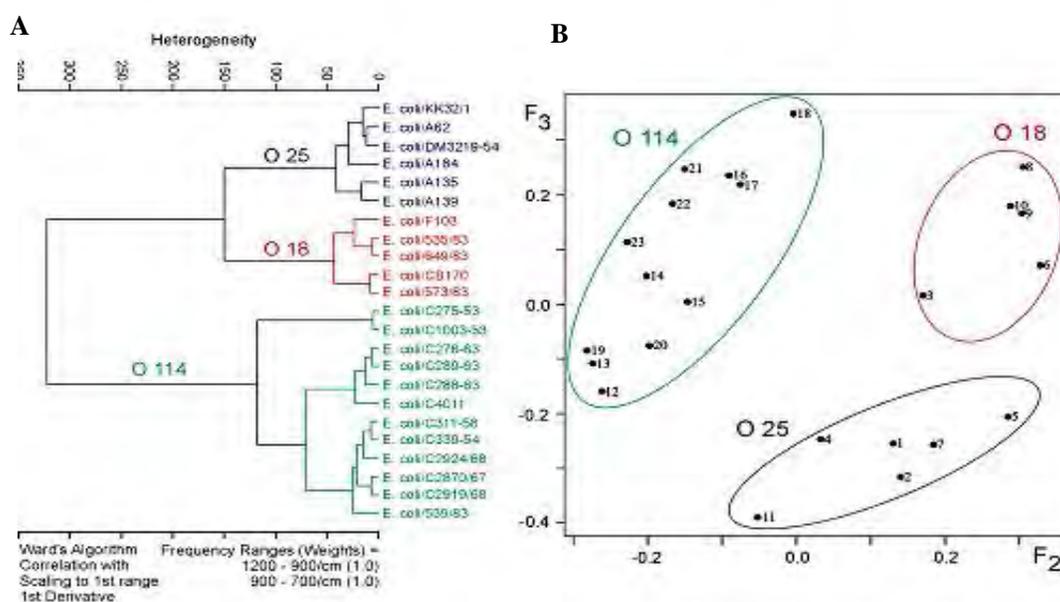


Fig. 5. Tipificación de aislados de *E. coli* utilizando métodos estadísticos multivariantes no supervisados: A) Método estadístico Análisis Jerárquico de Clusters (AJC) y B) Método estadístico Análisis de Componente Principal (ACP). Imagen adquirida de Naumann, D.: *Vibrational Spectroscopy in Microbiology: Concepts and Overview. Applied to Microbiol Biomed Res*, 2004.

Una forma de establecer similitudes y diferencias entre organismos, es exhibirlas mediante un dendrograma que agrupa en *clusters* los organismos más semejantes. Este método de clasificación utiliza algoritmos de agregación basados en la medición de distancias espectrales construyendo una matriz que describe las diferencias o similitudes entre los espectros particionándolos en clases o clusters (46-47). El procedimiento para realizar un análisis de clusters consiste en establecer las principales regiones espectrales que permitan diferenciar los grupos de espectros a ser analizados.

II.1.7- Objetivos del capítulo

Teniendo en cuenta que la cepa de referencia Tohama I de *B. pertussis* ha sido aislada hace más de 50 años, y que la misma, tal como se ha reportado recientemente, presenta grandes diferencias genéticas con los organismos circulantes (4-6), decidimos emplear una herramienta como la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) junto con el método estadístico multivariante Análisis Jerárquico de Clusters (AJC) para estudiar si desde el punto de vista fenotípico se detectaban diferencias entre cepas de referencia adaptadas a laboratorio y aislados clínicos circulantes de *B. pertussis*. Asimismo, se decidió utilizar esta metodología para analizar las diferencias fenotípicas entre *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*.

Ha sido previamente descrito que la espectroscopía IR puede ser empleada para describir y comparar la composición bioquímica de distintas muestras biológicas (43, 48). En este contexto es importante destacar que la espectroscopía FT-IR en combinación con el Análisis de Clusters ha sido aplicada por numerosos grupos de investigación en estudios de discriminación y clasificación fenotípica de diferentes bacterias a nivel intra e interespecie como así también intergénero (23-24, 26-28, 30). Para cumplir con los objetivos mencionados se planteó llevar a cabo los siguientes estudios:

- i) Determinar la cantidad de biomasa apropiada para realizar una adecuada adquisición de espectros IR.
- ii) Analizar la reproducibilidad espectral de poblaciones obtenidas de cultivos independientes.
- iii) Analizar las disimilitudes fenotípicas entre *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* mediante espectroscopía FT-IR y AJC, con el objetivo de establecer el nivel de heterogeneidad entre ambas poblaciones.
- iv) Estudiar diferencias fenotípicas entre aislados clínicos circulantes y las cepas de referencia *B. pertussis* Tohama I y Bp 134 empleando espectroscopía FT-IR y AJC, con el fin de analizar el grado de disimilitud fenotípica entre las mismas.

II.2- MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1- Microorganismos y condiciones de cultivo

II.2.1.1- Cepas de referencia y aislados clínicos

Para llevar a cabo los estudios se utilizaron las cepas de referencia de *B. pertussis* Tohama I, proveniente de la Colección del Instituto Pasteur (CIP, Paris, Francia), y la cepa Bp 134 cedida por el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular de La Plata. Asimismo se emplearon 18 aislados clínicos de *B. pertussis* provenientes del Hospital de Niños “Sor María Ludovica” de La Plata. Los aislados fueron identificados por el Servicio de Bacteriología del mencionado hospital mediante pruebas bioquímicas, ensayos de aglutinación con suero de conejo y por biología molecular. En las Tablas 1 y 2 se detallan el origen, la fecha del aislamiento y el tipo de factor de virulencia (Pertactina, Toxina Pertussis y Fimbria) de las cepas de referencia y aislados clínicos de *B. pertussis*, respectivamente. Asimismo, en la Tabla 2 se especifica la edad de los pacientes de los cuales se obtuvieron dichos aislamientos. En este trabajo se utilizaron también aislados clínicos de *B. bronchiseptica*, los cuales fueron provistos e identificados por el Servicio de Bacteriología del referido Hospital de Niños.

II.2.1.2- Condiciones de cultivo

Las cepas de referencia y aislados clínicos de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* se mantuvieron a -80°C en el medio líquido de Stainer-Scholte (SS) (49) con el agregado de 20% (v v⁻¹) de glicerol. Dicho medio está compuesto por componentes esterilizables por vapor (g L⁻¹): Glutamato monosódico 10,70; L-Prolina 0,24; KH₂PO₄ 0,50; KCl 0,20; MgCl₂.6 H₂O 0,10; CaCl₂.H₂O 0,02; Tris-HCl 1,52; NaCl 2,50 y otros esterilizables por filtración. En este caso se emplean membranas (Osmonics Inc., Massachussets, EUA) de 0,22 μm. La composición del suplemento esterilizable por filtración es la siguiente (mg L⁻¹): SO₄Fe-4 H₂O 10; L-Cistina 40; HCl 0,10; ácido ascórbico 20; ácido nicotínico 4 y L-glutation reducido 100. Los cultivos en medio sólido se realizaron con medio Agar Bordet-Gengou (Difco, Detroit, USA) suplementado (ABGs) con 1% (m v⁻¹) de Bactopeptona (Difco) y 14% (v v⁻¹) de sangre de carnero desfibrinada (Instituto Biológico, La Plata, Argentina)

Tabla 1. Cepas de referencia de *B. pertussis* utilizadas en este estudio

Cepa	Origen	Año de aislamiento	Tipo de Factor de Virulencia			Cita
			Prn	PTxA	Fim	
Bp Tohama I	Francia	1954	1	2	2	(50)
Bp 134	Japón	1950	1	2	2,3	(21)

La cepa Tohama I fue provista por el Instituto Pasteur (CIP, Paris, Francia), y la cepa Bp 134 fue cedida por el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular de La Plata. Prn: Pertactina, PTx A: Toxina Pertussis subunidad A, Fim: Fimbria.

Tabla 2. Aislados clínicos de *B. pertussis* empleados en este trabajo

Código	Año de aislamiento	Edad del Paciente (Meses)	Tipo de Factor de Virulencia		
			Prn	PTx A	Fim
Bp 953	2001	2	2	1	3
Bp 955	2001	4	2	1	3
Bp 2723	2001	2	1	1	3
Bp 2770	2001	1,5	1	1	3
Bp 1938	2003	3	2	1	3
Bp 2930	2004	4	2	1	3
Bp 3495	2004	1	2	1	3
Bp 2751	2004	2	2	1	3
Bp 2524	2004	1	2	1	3
Bp 7470	2005	2	2	1	3
Bp 162	2006	2	2	1	3
Bp 462	2006	1,5	2	1	3
Bp 849	2007	1	2	1	3
Bp 892	2007	3	2	1	3
Bp 479	2007	3	2	1	3
Bp 350	2008	2	2	1	3
Bp 302	2008	3	2	1	3
Bp 612	2008	4	2	1	3

Los aislados clínicos de *B. pertussis* fueron identificados y cedidos por el Servicio de Bacteriología del Hospital de Niños de La Plata. Prn: Pertactina, PTx A: Toxina Pertussis subunidad A, Fim: Fimbria.

II.2.2- Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

II.2.2.1- Ajuste de la cantidad de biomasa a analizar por espectroscopía FT-IR

Se llevó a cabo en primer lugar la calibración de la cantidad de biomasa requerida para el estudio de los aislados clínicos y cepas de referencia mediante espectroscopía FT-IR.

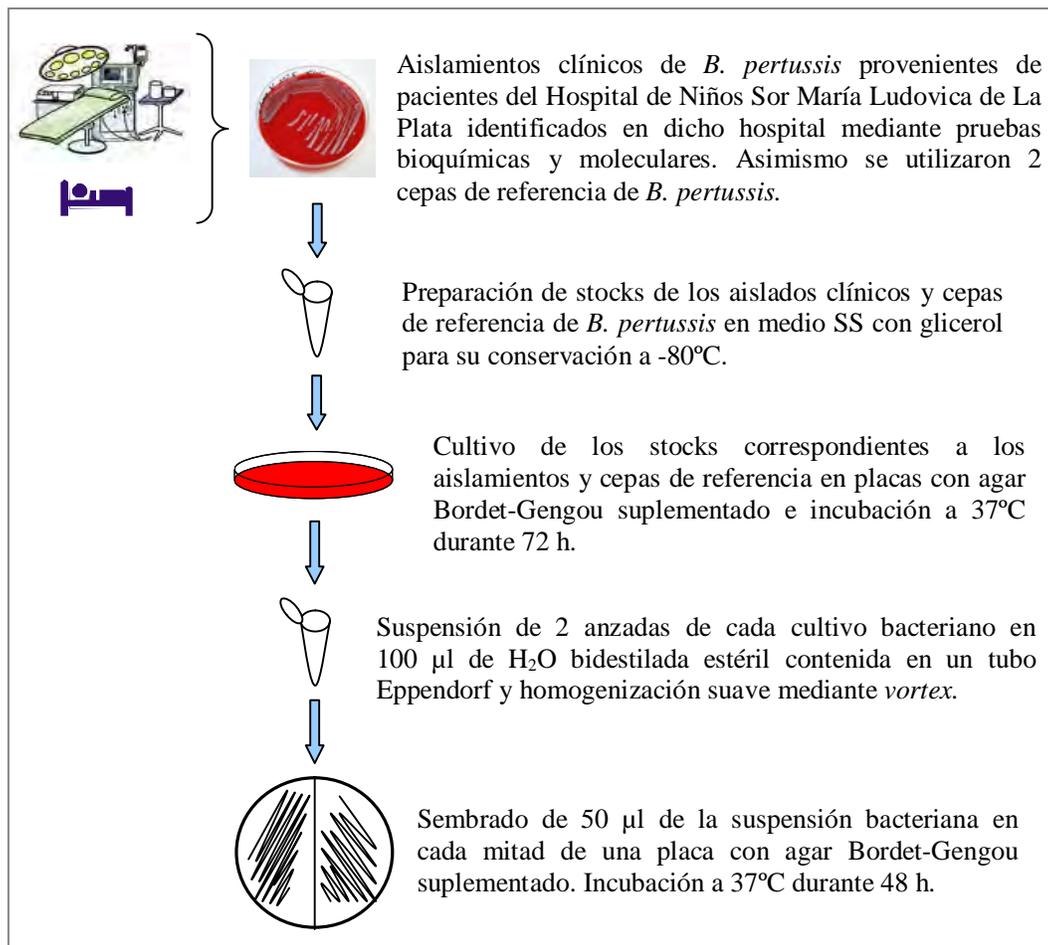
Partiendo de un cultivo de *B. pertussis* Tohama I y utilizando un anza de platino calibrada se transfirieron distintas cantidades de biomasa a tubos Eppendorf conteniendo 120 μl de H_2O bidestilada. Luego de una suave homogenización se midió la densidad óptica de las distintas suspensiones bacterianas a una longitud de onda de 650 nm (DO_{650}). Seguidamente las suspensiones fueron transferidas a celdas ópticas y analizadas por espectroscopía FT-IR. A partir de los espectros obtenidos se determinó la absorbancia (Abs) del pico con mayor valor de Abs, el cual corresponde a Amida I (1658 cm^{-1}), para luego construir una curva de calibración de biomasa (DO_{650}) en función de la Abs de Amida I (DO_{650} vs Abs Amida I). A través de esta curva de calibración se estimó la cantidad de biomasa apropiada para trabajar en el intervalo donde la regresión fuera lineal asegurando así el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer.

II.2.2.2- Preparación de muestras

A partir de cultivos stocks de *B. pertussis* se inocularon placas con ABGs las cuales se incubaron a 37°C durante 72 h, en tanto que para *B. bronchiseptica* se incubaron 48 h. A partir de estos cultivos y utilizando un anza de platino calibrada (1 mm de diámetro) se transfirieron células a tubos Eppendorf conteniendo 120 μl de H_2O bidestilada estéril, homogeneizándose suavemente mediante agitación mecánica. Las suspensiones de bacterias se utilizaron para inocular placas con medio ABGs disponiendo 50 μl de dicha suspensión por cada mitad de placa. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h (el tiempo de incubación para *B. bronchiseptica* fue de 24 h). De esta manera se consiguieron cultivos activos y homogéneos. La Figura 6 describe el proceso completo para la obtención de cultivos activos de *B. pertussis*, para su posterior análisis por espectroscopía FT-IR.

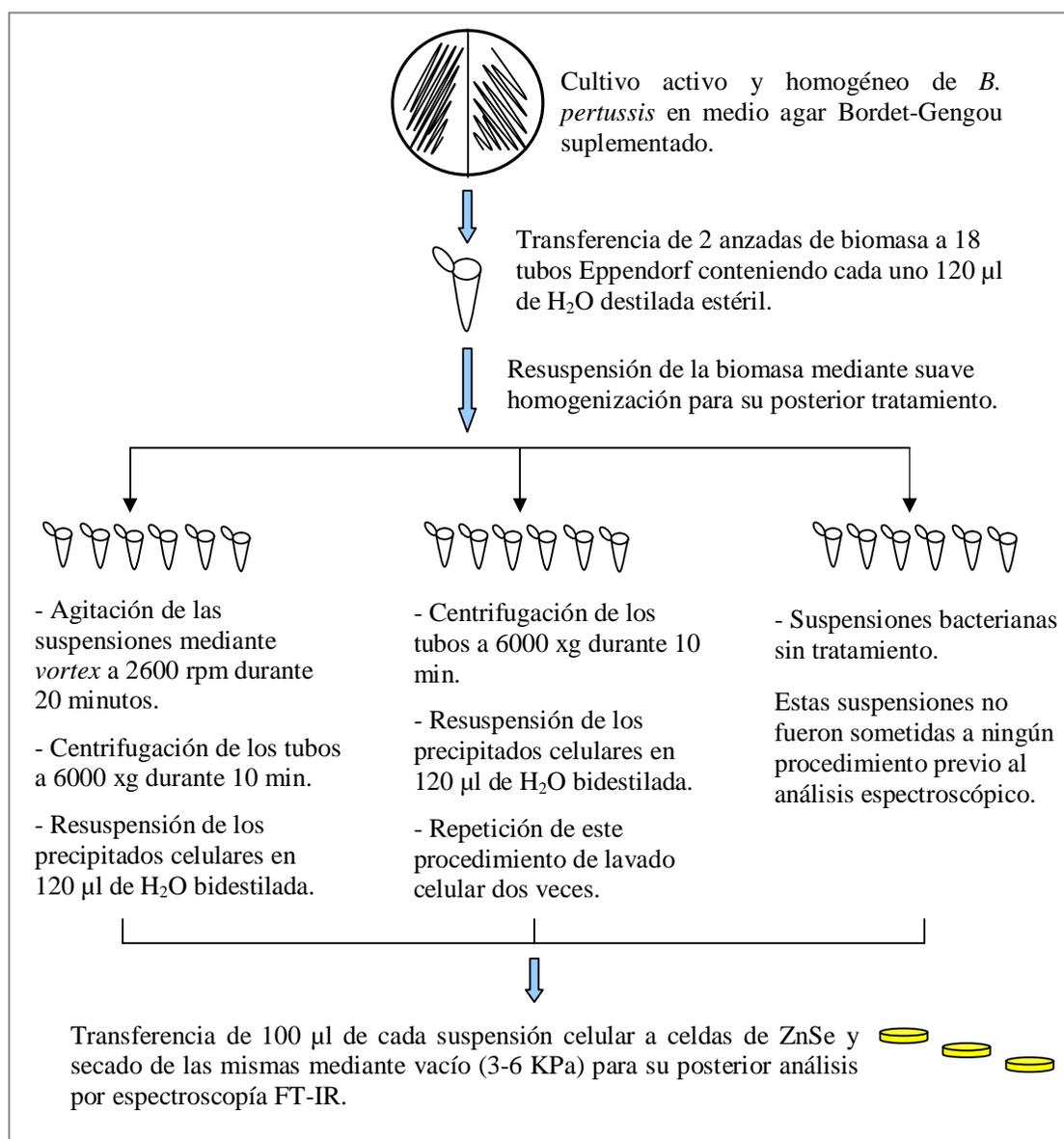
II.2.2.3- Tratamiento de las muestras

A partir de un cultivo activo de *B. pertussis* se transfirieron, mediante anza de platino, células a tubos Eppendorf conteniendo 120 μl de H_2O destilada, resuspendiendo por medio de una suave homogenización. Seis de los tubos conteniendo suspensión celular fueron agitados empleando un vortex (IKA Works, Inc., Wilmington, EUA) a 2600 rpm durante 20 minutos y luego centrifugados a 6000 xg durante 10 min. Seguidamente los pelets fueron resuspendidos en 120 μl de H_2O destilada. Otros 6 tubos conteniendo suspensión celular fueron directamente centrifugados a 6000 xg durante 10 min para luego resuspender el precipitado en 120 μl de H_2O destilada, repitiendo el procedimiento de lavado por dos

Fig. 6. Procedimiento para la obtención de cultivos activos y homogéneos de *B. pertussis*

oportunidades. Los 6 tubos Eppendorf restantes no fueron sometidos a ningún tratamiento. Posteriormente, $100\ \mu\text{l}$ de cada suspensión de bacterias fueron transferidos a celdas de Seleniuro de Zinc (ZnSe) ($13 \times 2\ \text{mm}$, Korth Kristalle GmbH, Alemania). Las suspensiones se secaron al vacío (3-6 KPa) a temperatura ambiente en desecador hasta obtener una delgada película transparente sobre la superficie de las celdas, las cuales fueron luego analizadas por espectroscopía IR.

El proceso de preparación y tratamiento de las muestras se realizó, en un principio, empleando la cepa referencia Tohama I y 2 aislados clínicos de *B. pertussis* (Bp 2723 y Bp 350) con 4 experimentos independientes para cada muestra. Luego de seleccionar el adecuado procedimiento para el tratamiento de las muestras, se procesaron el resto de los aislados clínicos. La Figura 7 describe el procedimiento para llevar a cabo los distintos tratamientos sobre las muestras de *B. pertussis*.

Fig. 7. Tratamientos de muestras de *B. pertussis* para su análisis por espectroscopía FT-IR

II.2.2.4- Espectrómetro

El análisis por espectroscopía FT-IR de células enteras se llevó a cabo utilizando un espectrómetro Spectrum One (Perkin-Elmer Instruments, USA) siguiendo el procedimiento descrito por Naumann y col (43) y por Bosch y col (48, 51). Las celdas de ZnSe conteniendo las muestras de *B. pertussis* fueron colocadas en una rueda multi-celda del espectrómetro. Las lecturas se hicieron bajo una purga continua de aire seco a fin de evitar interferencias debido al vapor de agua. En la Figura 8 se observa el espectrómetro Spectrum One el cual permite la medición de 15 muestras de manera consecutiva.



Fig. 8. Espectrómetro FT-IR. Imagen del espectrómetro Spectrum One de Perkin-Elmer, empleado para el análisis de las suspensiones bacterianas.

II.2.2.5- Adquisición de espectros

La adquisición de espectros IR se llevó a cabo en base a parámetros utilizados en trabajos previos (48, 51). Los espectros IR fueron obtenidos mediante 64 escaneos a una velocidad de 1 cm seg^{-1} y una resolución de 6 cm^{-1} , en el intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} . El ajuste de los parámetros velocidad de medición, resolución e intervalo de lectura se realizó mediante el programa Spectrum 3.0 (Perkin-Elmer Instruments). Se obtuvieron espectros (entre 12 y 15 replicados) a partir de 3 cultivos independientes, para cada muestra analizada.

II.2.2.6- Eliminación del vapor de agua

El agua en su estado vapor genera interferencias en los espectros IR debido a la absorción de estados rotacionales de sus moléculas. Las bandas más intensas generadas por la rotación de las moléculas del vapor de agua se presentan en la región espectral de Amida I, por lo que es necesario eliminarlas cuando uno estudia y compara espectros de sistemas biológicos. Esta interferencia se evita realizando la adquisición de espectros bajo una corriente de aire seco, empleando un sistema de filtros que retienen H_2O , conectados a la línea de aire que llega a la cámara del espectrómetro.

II.2.3- Análisis y pre-tratamiento de espectros

II.2.3.1- Prueba de Calidad Espectral

Todos los espectros IR fueron sometidos a una prueba de calidad espectral y solo los que aprobaron dicho test fueron tenidos en cuenta para análisis posteriores (43, 51). La Prueba de Calidad Espectral analiza:

Intensidad de la señal: La región de Amida I del espectro ($1800-1600\text{ cm}^{-1}$) corresponde a la zona espectral donde la mayoría de las muestras biológicas presentan su valor máximo de absorbancia. Esta región fue considerada para determinar si la cantidad de biomasa de cada muestra resultaba adecuada para la adquisición de su correspondiente espectro IR. Para tal fin se calculó la diferencia entre la absorbancia máxima y mínima en la mencionada región. El valor de dicha amplitud (intensidad de la señal) debe ubicarse entre los valores de absorbancia mínima y máxima, correspondientes a los extremos de la zona de linealidad de la curva de calibración (DO_{650} vs Abs IR), para cumplir con la ley de Lambert-Beer.

Ruido (R): El valor del ruido se calculó mediante la diferencia entre la absorbancia máxima y mínima en la derivada primera de los espectros en la región 2100 a 2000 cm^{-1} , donde no se registran bandas de absorción asociadas a componentes de microorganismos. El valor de la amplitud del ruido debe ser menor a $1,5 \times 10^{-4}$ unidades.

Relación señal/ruido: Se calcularon 2 valores de intensidades ($S1$ y $S2$), en las regiones $1800-1600\text{ cm}^{-1}$ (Amida I) para $S1$ y $1200-960\text{ cm}^{-1}$ para $S2$ (región asociada a la absorción de carbohidratos). Dichos valores se obtuvieron mediante el cálculo de la diferencia entre la absorbancia máxima y mínima en la derivada primera de los espectros en ambos intervalos. Estos valores fueron luego divididos por el ruido (R) para obtener los parámetros $S1/R$ y $S2/R$. Los valores admitidos por el test de calidad son $S1/R > 200$, y $S2/R > 40$.

Vapor de agua (va): Las bandas más intensas y características de los estados rotacionales del vapor de agua se presentan en la región de Amida I. No obstante en dicha región se encuentran las principales absorciones de las moléculas componentes de microorganismos. Sin embargo, existe una banda en 1844 cm^{-1} que no se superpone con otras absorciones, la cual es tomada para la evaluación del vapor de agua en los espectros registrados. El parámetro que caracteriza el vapor de agua se calcula como la amplitud de la derivada primera del espectro del aire circulante por la cámara de lectura en el intervalo $1847-1837\text{ cm}^{-1}$. Dicho valor debe ser menor a 10^{-5} unidades.

Relaciones señal/vapor de agua (S/va): A través de estos parámetros se comparan las señales debidas a la intensidad de la banda de absorción de Amida I ($S1$) y a la intensidad de la banda de absorción de carbohidratos ($S2$) en relación con la absorbancia generada por el vapor de agua (va). Los valores de las relaciones $S1/va$ y $S2/va$ deben ser superiores a 100 y 20, respectivamente.

El análisis de los parámetros que conforman la prueba de calidad de los espectros se llevó a cabo mediante la utilización del programa OPUS 4.2 (Bruker Optics, GmbH, Ettlingen,

Alemania). La Tabla 3 resume los valores exigidos para los parámetros evaluados por medio de la Prueba de Calidad Espectral.

Tabla 3. Parámetros tolerados en la Prueba de Calidad Espectral para la evaluación de espectros IR

Región \ Parámetro	1800-1600 cm ⁻¹ (Amida I)	1200-960 cm ⁻¹ (Carbohidratos)	2100-2000 cm ⁻¹	1847-1837 cm ⁻¹
Abs mínima	0.35			
Abs máxima	1			
Ruido			< 1,5 x 10 ⁻⁴	
Señal/ruido	> 200	> 40		
Vapor agua				< 10 ⁻⁵
Señal/vapor agua	> 100	> 20		

II.2.3.2- Pre-tratamiento de espectros

Los espectros IR que pasaron el Test de Calidad fueron sometidos a un pre-tratamiento que consistió en el aumento de resolución, la normalización vectorial y el estudio de la reproducibilidad espectral (23, 43, 52). Estos procedimientos, fueron llevados a cabo por medio de la aplicación del programa OPUS 4.2 (Bruker Optics).

Aumento de Resolución: El aumento de resolución se logró mediante la obtención de las derivadas primera y/o segunda de los correspondientes espectros. En este caso se empleó la derivada primera debido a que su aplicación es suficiente para determinar las diferencias entre los espectros replicados o entre grupos de espectros. Las derivadas primeras fueron obtenidas mediante el algoritmo de Savitzky-Golay. En la Figura 9 se exhibe un espectro IR y su correspondiente derivada primera. La muestra corresponde a un aislado clínico de *B. pertussis*.

Normalización Vectorial: Si bien los espectros son adquiridos a partir de una determinada cantidad de biomasa, debido a pequeñas variaciones que pudieran existir se debe realizar una normalización espectral. En este estudio se eligió la normalización vectorial que se realizó sobre la derivada primera de los espectros en el rango 4000-650 cm⁻¹.

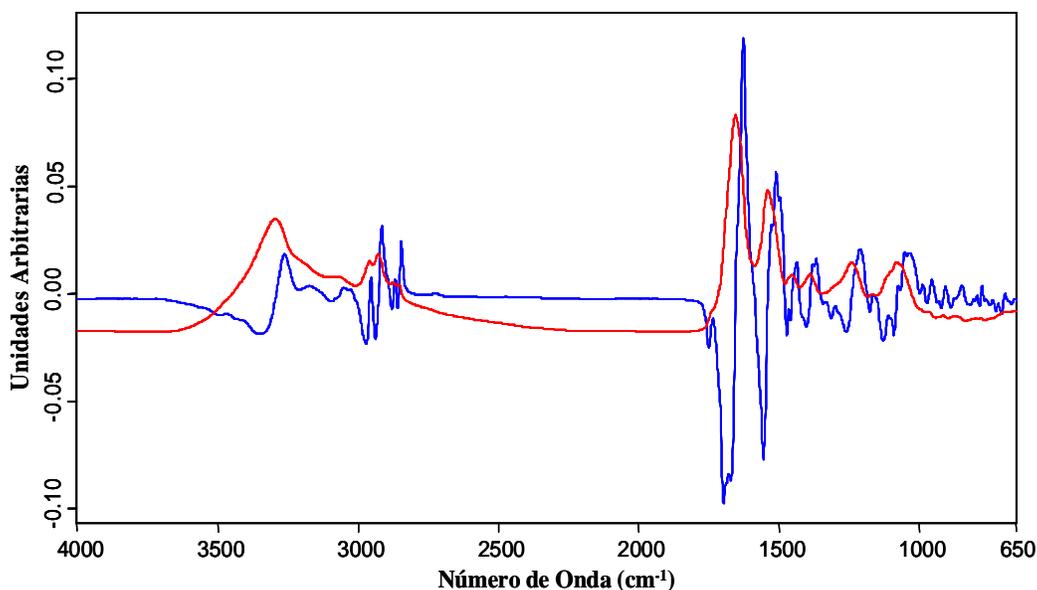
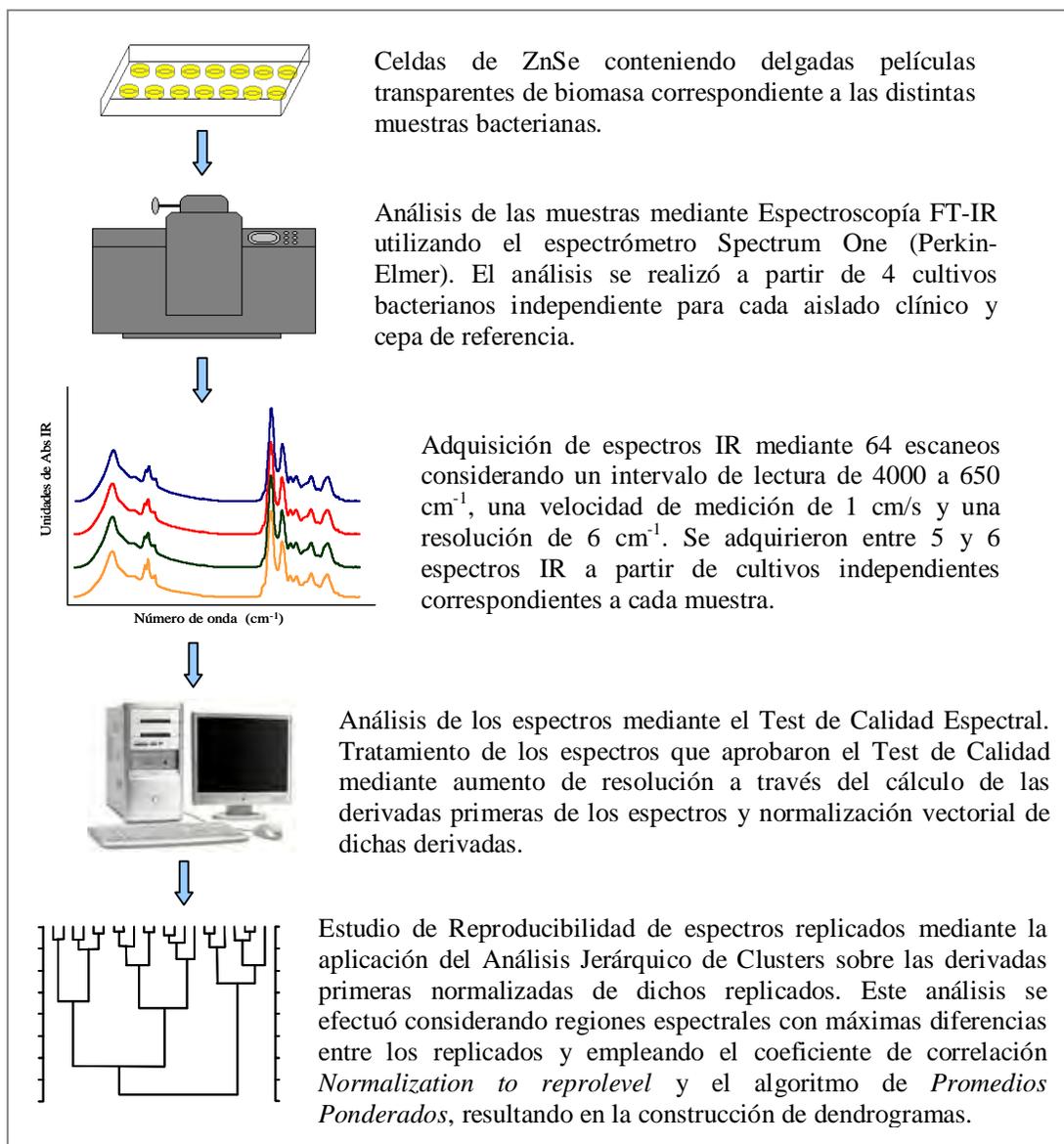


Fig. 9. Espectro IR y su correspondiente derivada primera. El espectro IR (línea roja) y su correspondiente derivada primera (línea azul) fueron obtenidos a partir de un aislado clínico de *B. pertussis*. Rango espectral: 4000-650 cm^{-1} .

Análisis de Reproducibilidad Espectral: El estudio de reproducibilidad se realizó mediante el Análisis Jerárquico de Clusters (AJC) el cual es un método estadístico multivariante que permite distinguir similitudes y diferencias entre los espectros, las cuales pueden ser expresadas mediante dendrogramas. Dicho análisis se llevó a cabo sobre las derivadas primeras vectorialmente normalizadas de los espectros IR replicados, adquiridos a partir de cada muestra. Se aplicó la ecuación de correlación *Normalization to Replevel* y se consideró las regiones espectrales con mayores diferencias entre los espectros replicados. La aplicación de la mencionada ecuación permitió obtener una matriz de disimilitud espectral basada en distancias espectrales las cuales fueron introducidas en el algoritmo de promedios ponderados (*Average Linkage*), dando origen a un dendrograma que permitió visualizar el nivel de reproducibilidad o varianza de cada muestra (53). El análisis de reproducibilidad se aplicó en no menos de 12 espectros replicados de cada uno de los aislados clínicos y cepas de referencia en estudio. El nivel de reproducibilidad entre espectros replicados fue determinado por el valor de la Distancia Espectral (D). Este valor se obtiene a partir de los dendrogramas y es igual a $(1-r) \times 1000$ siendo r el coeficiente de correlación de Pearson. Por definición, cuanto menor es el valor D , mayor es la reproducibilidad entre replicados espectrales. La Figura 10 resume los procedimientos descritos para la adquisición, análisis y pre-tratamiento de los espectros IR mediante el empleo de los programas Spectrum 3.0 (Perkin-Elmer) y OPUS 4.2 (Bruker Optics).

Fig. 10. Adquisición, análisis y pre-tratamiento de espectros IR

II.2.4- Estudios de discriminación fenotípica

II.2.4.1- Diferenciación fenotípica entre organismos del género *Bordetella*

Con el objeto de analizar la heterogeneidad entre muestras de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*, se llevó a cabo un estudio de discriminación fenotípica incluyendo espectros IR correspondientes a dichas especies. Para tal fin, se registraron espectros replicados de 9 muestras de *B. pertussis* y 7 de *B. bronchiseptica*. Se seleccionaron las ventanas espectrales con mayores diferencias entre el conjunto de espectros de *B. pertussis* y de *B.*

bronchiseptica. De este modo, se analizaron las derivadas primeras en todo el rango espectral, de espectros pertenecientes a cepas de referencia y aislados clínicos de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*. Finalmente, se aplicó el método AJC sobre las derivadas primeras de los espectros considerando las regiones espectrales con máxima discriminación y empleando el coeficiente de Pearson y el algoritmo de Ward para la construcción del dendrograma.

II.2.4.2- Diferenciación fenotípica entre muestras de *B. pertussis*

El estudio de diferenciación fenotípica entre aislados clínicos y cepas de referencia de *B. pertussis* fue realizado con el fin de analizar el grado de disimilitud fenotípica entre los mismos. Para tal fin se utilizaron los espectros IR adquiridos a partir de los aislados clínicos y cepas de referencia de *B. pertussis*. Se seleccionaron las ventanas espectrales con las mayores diferencias entre espectros de distintas muestras de *B. pertussis*. La selección se efectuó analizando en todo el rango espectral, las derivadas primeras de espectros de la cepa Tohama I y de 3 aislados clínicos de *B. pertussis*. Asimismo, dentro de las regiones espectrales seleccionadas se determinaron subregiones que presentaban las máximas diferencias entre los espectros replicados. La totalidad de los espectros replicados adquiridos fueron empleados para el análisis de diferenciación espectral. A tal fin se aplicó el método AJC a las derivadas primeras vectorialmente normalizadas considerando las subregiones espectrales establecidas y utilizando el coeficiente de Pearson y el algoritmo de Ward para la obtención del dendrograma.

II.3- RESULTADOS

II.3.1- Ajuste de la cantidad de biomasa a analizar mediante FT-IR

Se determinó la cantidad de biomasa a ser empleada para llevar a cabo la adquisición de espectros IR. Distintas cantidades de biomasa de un cultivo de la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I fueron transferidas, mediante ansa de platino calibrada, a tubos Eppendorf conteniendo H₂O bidestilada. Las suspensiones fueron analizadas para determinar su densidad óptica a 650 nm (DO₆₅₀) y luego se obtuvieron los correspondientes espectros IR. En la Figura 11 se observan los espectros obtenidos a los que se les determinaron las absorbancias de Amida I (Abs IR Amida I). Estos valores junto con los valores de DO₆₅₀ de las suspensiones de biomasa fueron utilizados para la construcción de la curva de calibración Abs IR Amida I vs DO₆₅₀ que se muestra en la Figura 12. A través de esta curva se consiguió determinar que una biomasa con una DO₆₅₀ entre 8 y 14 constituye una cantidad adecuada para la adquisición de espectros IR, ya que la absorbancia correspondiente a dicho rango es suficientemente alta para asegurar una óptima relación señal/ruido sin producir la saturación del detector del espectrómetro. Dicho rango de DO₆₅₀ se ubica en la zona de regresión lineal de la curva de calibración, donde se cumple la ley de Lambert-Beer. La cantidad de biomasa

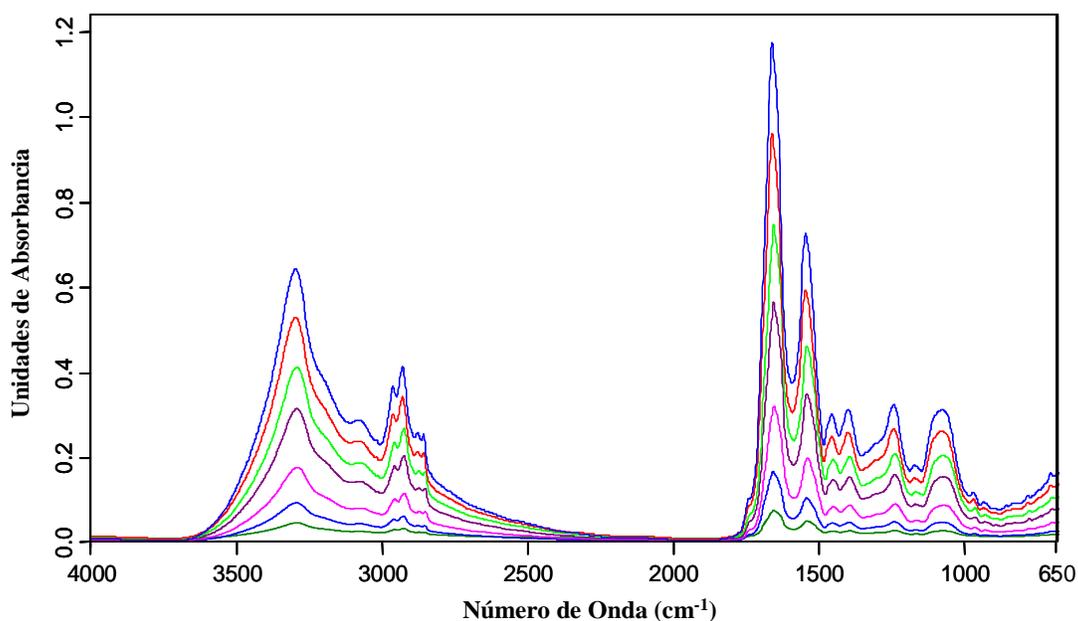


Fig. 11. Espectros de *B. pertussis* Tohama I obtenidos por espectroscopía FT-IR. A partir de un cultivo de la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I se prepararon suspensiones con distintas cantidades de biomasa. Dichas suspensiones fueron transferidas a celdas ópticas de ZnSe para ser analizadas mediante espectroscopía FT-IR. A partir de los espectros IR adquiridos se determinaron las absorbancias IR correspondientes al pico de Amida I (Abs IR Amida I). Los espectros IR de colores corresponden a suspensiones con valores crecientes de biomasa.

seleccionada se obtuvo a partir de la utilización de dos anzadas de muestra. A través de la curva de calibración se consiguió determinar los valores de absorbancia máxima (Abs max) y mínima (Abs min) óptimos para asegurar la calidad de los espectros IR, parámetros que conforman la Prueba de Calidad Espectral tal como se describió en la sección II.2.3.1. Se estableció que el valor de Abs max debía ser de 1 y el de Abs min de 0,35.

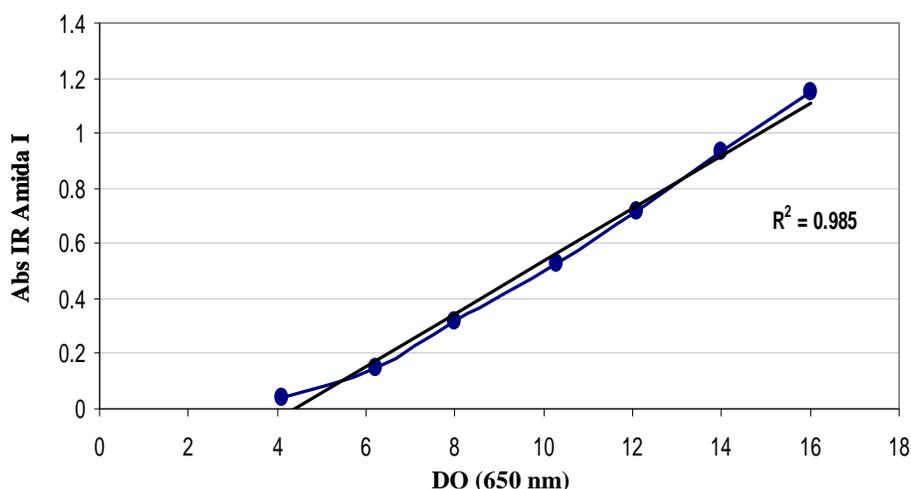


Fig. 12. Curva de calibración de absorbancia IR de Amida I vs biomasa. Los valores de absorbancia IR de Amida I (Abs IR Amida I), determinados de los espectros IR, conjuntamente con los de densidad óptica a 650 nm (DO_{650}), obtenidos todos a partir de suspensiones con distintas cantidades de biomasa, fueron empleados para la construcción de una curva de calibración de Abs IR de Amida I vs Biomasa (DO_{650}). Por medio de esta curva se consiguió determinar que la cantidad de biomasa apropiada para la adquisición de espectros por espectroscopía FT-IR corresponde a una DO_{650} entre 8 y 14. Asimismo, mediante esta curva se establecieron los valores de absorbancia máxima (Abs max = 1) y mínima (Abs min = 0,35) que forman parte del Test de Calidad Espectral.

II.3.2- Análisis de variabilidad o varianza espectral

Se analizó la varianza existente entre 24 espectros de la cepa de referencia Tohama I obtenidos a partir de 4 cultivos independientes (6 replicados por cada cultivo independiente). Los espectros IR fueron sometidos a la Prueba de Calidad Espectral. De la totalidad de espectros examinados, solo dos de ellos no pasaron el test de calidad debido a que su absorbancia máxima fue mayor a 1. Los espectros que superaron la mencionada prueba fueron normalizados vectorialmente en todo el rango espectral ($4000-600\text{ cm}^{-1}$). La comparación entre los 22 espectros replicados de la cepa Tohama I mostró que las mayores diferencias entre los mismos se presentaban en las regiones espectrales asignadas a polisacáridos ($1200-900\text{ cm}^{-1}$) y a la Zona Mixta ($1500-1250\text{ cm}^{-1}$) (Fig. 13). A través de dicha figura se observa que en las restantes regiones espectrales los replicados presentan

mínimas diferencias. De igual modo fueron analizados los espectros IR adquiridos a partir de los aislados clínicos Bp 2723 y Bp 350 de *B. pertussis*. La totalidad de los espectros correspondientes a dichos aislados clínicos aprobaron el test de calidad. La comparación realizada entre espectros replicados de cada aislado clínico permitió determinar que la mayor variabilidad se presenta en las regiones espectrales asignadas a polisacáridos y a la Zona Mixta, al igual que lo observado para la cepa de referencia Tohama I (datos no mostrados). Como se indicó en la sección II. 2.3.2, las diferencias entre replicados espectrales pueden ser identificadas con mayor precisión a través de las derivadas primeras de los espectros. Por tal motivo se obtuvieron las derivadas primeras de todos los espectros para luego ser utilizadas en el examen de reproducibilidad. En la próxima sección se explica como las diferencias encontradas fueron procesadas para los estudios de reproducibilidad.

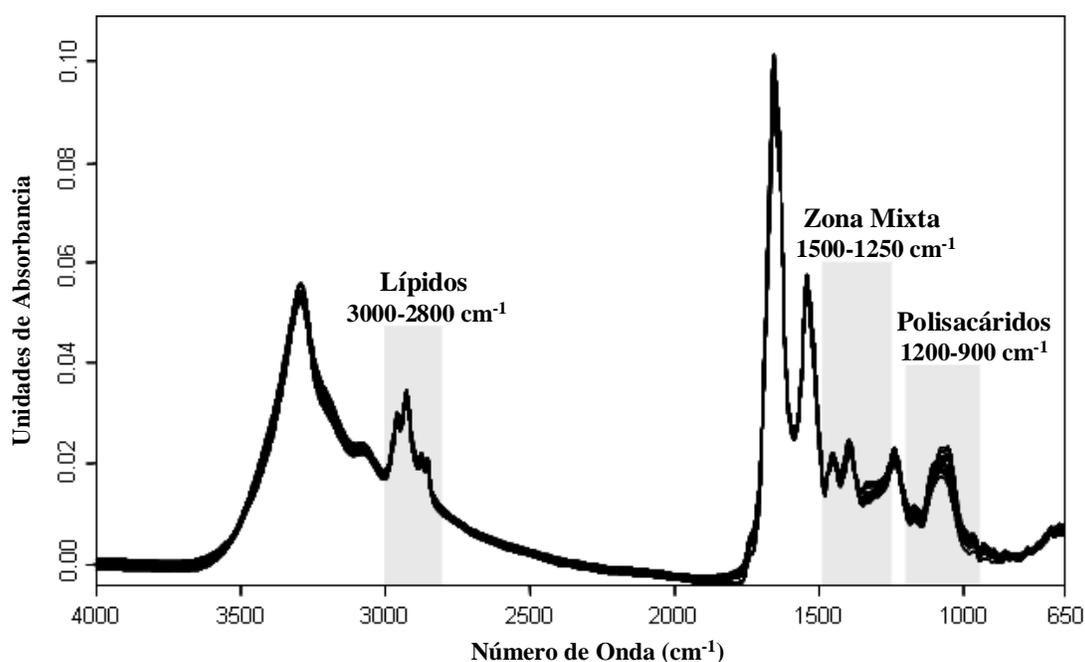


Fig. 13. Espectros IR correspondientes a 22 replicados de *B. pertussis* Tohama I. A través de esta imagen se pueden observar las diferencias y similitudes existentes entre 22 espectros replicados de la cepa Tohama I. Estas diferencias son principalmente notorias en las regiones asignadas a polisacáridos ($1200-900\text{ cm}^{-1}$) y a la Zona Mixta ($1500-1250\text{ cm}^{-1}$). Se indica la zona de lípidos ($3000-2800\text{ cm}^{-1}$) por ser una de las regiones en que no se observan diferencias significativas.

II.3.3- Análisis de reproducibilidad espectral

Los replicados de espectros de la cepa *B. pertussis* Tohama I, correspondientes a cultivos independientes, que superaron la Prueba de Calidad Espectral fueron analizados mediante el Estudio de Reproducibilidad con el fin de determinar el nivel de varianza entre los mismos

como se indicó en la sección de metodología. El nivel de reproducibilidad entre los espectros IR fue determinado a través del valor de la Distancia Espectral (D), el cual se obtiene a partir de la construcción de los dendrogramas como se indicó previamente. Las derivadas primeras normalizadas de los 22 espectros replicados correspondientes a la cepa Tohama I mostraron una notoria heterogeneidad en la región espectral asignada a polisacáridos (Fig. 14 A). La heterogeneidad en esta región se corroboró a través del dendrograma correspondiente (Fig. 14 A). El nivel de reproducibilidad, expresado como valor D , en la mencionada región espectral fue de $24,8 \pm 23,4$. Por otro lado, las derivadas primeras de los replicados de Tohama I revelaron una moderada variabilidad en la ventana espectral de la Zona Mixta (Fig. 14 B). Este resultado se confirmó con el dendrograma basado en dicha ventana (Fig. 14 B), el cual exhibió un valor D igual a $8,42 \pm 7,64$. Finalmente, el análisis del set de derivadas en la región espectral asociada a los lípidos manifestó una reducida heterogeneidad (Fig. 14 C). Este resultado fue corroborado mediante el correspondiente dendrograma (Fig. 14 C), el cual presentó un valor D de $4,38 \pm 3,55$. Los valores de Distancia Espectral obtenidos a partir de la información conferida por los dendrogramas se resumen en la Tabla 4.

Un análisis de reproducibilidad similar fue llevado a cabo sobre los espectros de los 2 aislados clínicos de *B. pertussis* (Bp 2723 y Bp 350). Como resultado de este análisis, se obtuvieron niveles de reproducibilidad semejantes a los obtenidos con la cepa de referencia, para cada ventana espectral. La mayor varianza entre los replicados de cada aislamiento se observó nuevamente en la región asignada a polisacáridos. Los valores de Distancia Espectral para los aislados Bp 2723 y Bp 350 se detallan en las Tablas 5 y 6, respectivamente.

El alto grado de heterogeneidad detectado principalmente en la región de absorción de grupos funcionales de carbohidratos imposibilita realizar un correcto estudio de diferenciación fenotípica entre muestras microbianas. Con el objeto de determinar la causa de esta falta de reproducibilidad se hipotetizó inicialmente que la presencia de restos de agar provenientes del medio de cultivo podría constituir una posible fuente de interferencia. Para lograr eliminar la fuente de varianza entre replicados y de este modo conseguir un aumento en la reproducibilidad espectral, las muestras a analizar fueron sometidas a dos tratamientos diferentes. Uno de los tratamientos se basó en la realización de una serie de lavados de la biomasa con H₂O bidestilada. El otro tratamiento consistió en la agitación o *shereado* vigoroso de la biomasa y posterior centrifugación para luego suspender el pelet celular en H₂O bidestilada. Estos tratamientos fueron aplicados a la biomasa de Tohama I, Bp 2723 y Bp 350, para luego realizar la adquisición y análisis de los espectros.

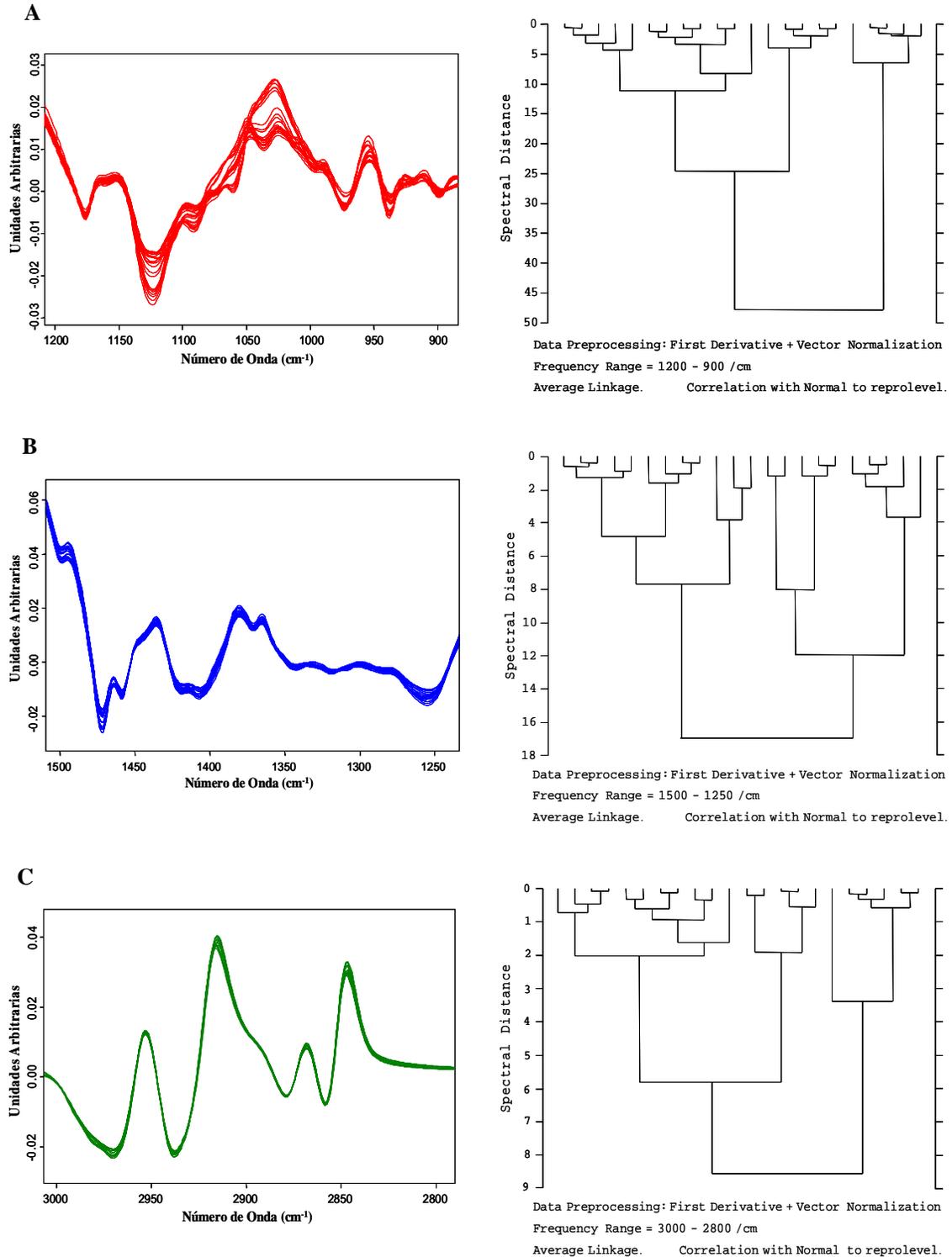
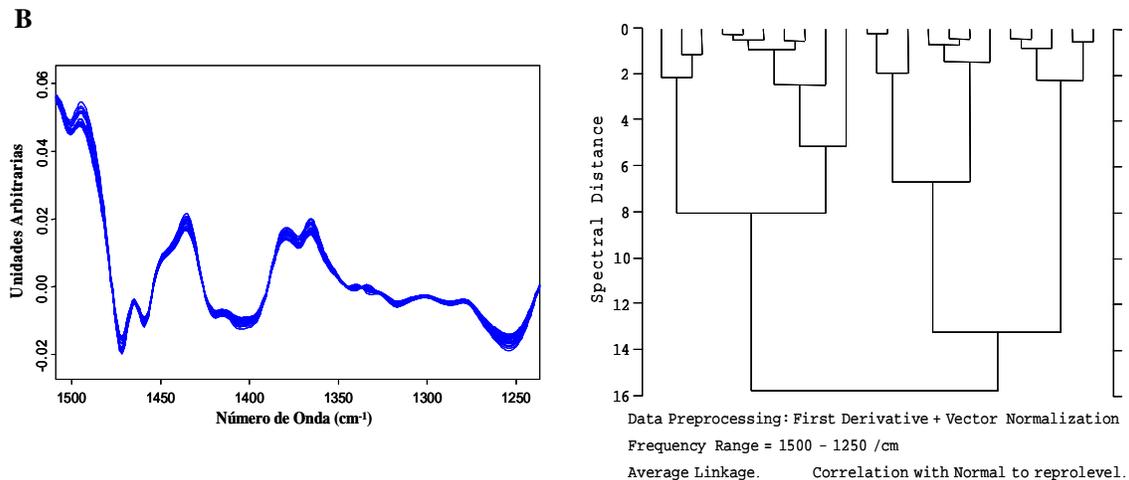
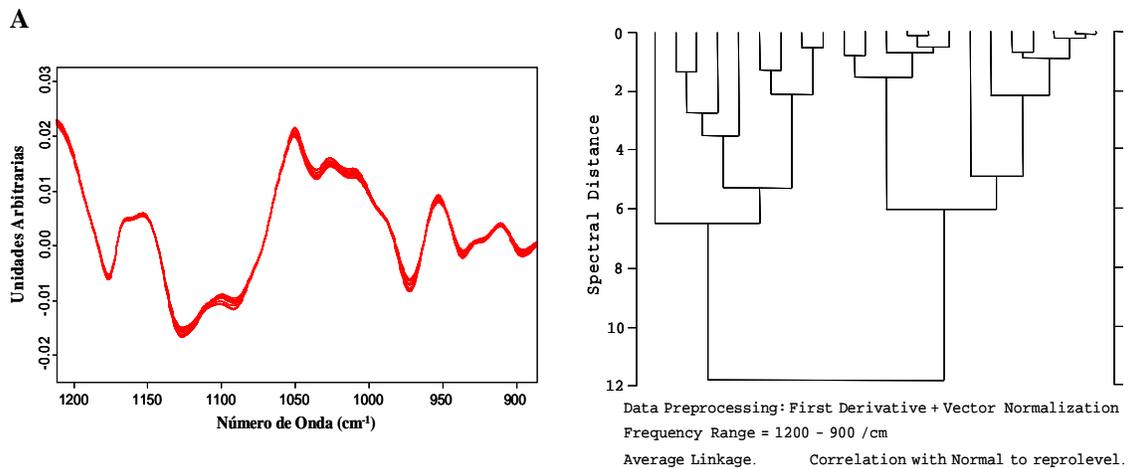


Fig. 14. Reproducibilidad de espectros IR de *B. pertussis* Tohama I. La heterogeneidad entre replicados de espectros IR, adquiridos a partir de *B. pertussis* Tohama I, fue analizada mediante el Estudio de Reproducibilidad. Las derivadas primeras de 22 espectros replicados fueron examinadas en la regiones asignadas a: **A)** Polisacáridos ($1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$), **B)** Zona Mixta ($1500\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$) y **C)** Lípidos ($3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$). Para cada región se pueden observar las diferencias y similitudes entre las derivadas primeras normalizadas y el correspondiente dendrograma obtenido mediante Análisis Jerárquico de Cluster.

En la Figura 15 A se observa que las derivadas primeras normalizadas de espectros de Tohama I, adquiridos a partir de biomasa tratada mediante lavados, exhibieron una evidente reducción de la heterogeneidad en la ventana espectral de polisacáridos, en comparación con el resultado obtenido a partir de la biomasa sin tratamiento. Esta disminución de heterogeneidad se evidenció también a través del dendrograma construido como resultado del análisis de variabilidad en la mencionada región (Fig. 15 A), el cual presentó un valor de Distancia Espectral de $6,21 \pm 5,30$. Por otro lado, el análisis de reproducibilidad considerando la Zona Mixta (Fig. 15 B) y la región de los lípidos (Fig.15 C) mostró una heterogeneidad equivalente a la revelada a partir del análisis de la biomasa sin tratamiento. Los valores de Distancia Espectral obtenidos como resultado de la construcción de los dendrogramas mediante este análisis de reproducibilidad se incluyen en la Tabla 4, juntos con los valores D obtenidos del análisis de espectros adquiridos de las biomazas no tratadas.



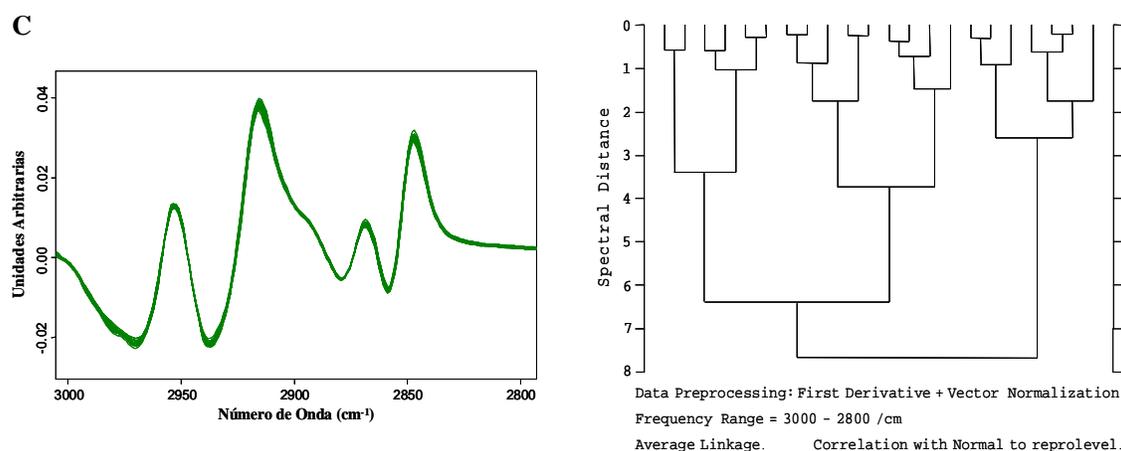


Fig. 15. Reproducibilidad de espectros IR obtenidos a partir de biomasa de *B. pertussis* Tohama I tratada mediante lavados. La variabilidad entre replicados de espectros IR, adquiridos a partir de biomasa de la cepa Tohama I sometida al tratamiento de lavados, fue analizada en las regiones espectrales asignadas a: **A)** Polisacáridos ($1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$), **B)** Zona Mixta ($1500\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$) y **C)** Lípidos ($3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$). Para cada región se pueden observar las derivadas primeras normalizadas y el dendrograma obtenido al aplicar el Análisis Jerárquico de Clusters.

Los espectros replicados adquiridos a partir de la biomasa tratada mediante lavados, correspondiente a los aislados clínicos Bp 2723 y Bp 350, fueron analizados de igual forma mediante el estudio de reproducibilidad en las mismas regiones espectrales. Como resultado de dicho análisis, se obtuvieron niveles de reproducibilidad similares a los conseguidos con la cepa de referencia para cada ventana espectral (Tablas 5 y 6).

Cuando se empleó el procedimiento de *shereado* se obtuvo una abrupta reducción de la heterogeneidad entre espectros de la cepa de referencia Tohama I en la región espectral asignada a polisacáridos (Fig. 16 A). La disminución de heterogeneidad fue de 24 veces con respecto al resultado conseguido al no aplicar tratamientos. Asimismo, este procedimiento generó la disminución de la varianza espectral en la Zona Mixta (Fig. 16 B) y en la región de los lípidos (Fig. 16 C). Los valores de Distancia Espectral obtenidos por medio de este análisis de reproducibilidad se incluyen en la Tabla 4.

El análisis de reproducibilidad aplicado a espectros de Bp 2723 y Bp 350, adquiridos a partir de biomasa sometida al tratamiento de *shereado*, mostró una reducción de heterogeneidad semejante a la obtenida con los espectros de Tohama I (Tablas 5 y 6). Este tratamiento si bien proporciona homogeneidad entre espectros replicados mejorando su reproducibilidad, podría provocar la pérdida de estructuras celulares específicas que podrían ser importantes en la diferenciación a nivel de cepa, tal como se reportó para el caso de los pilis en *Moraxella bovis* (54).

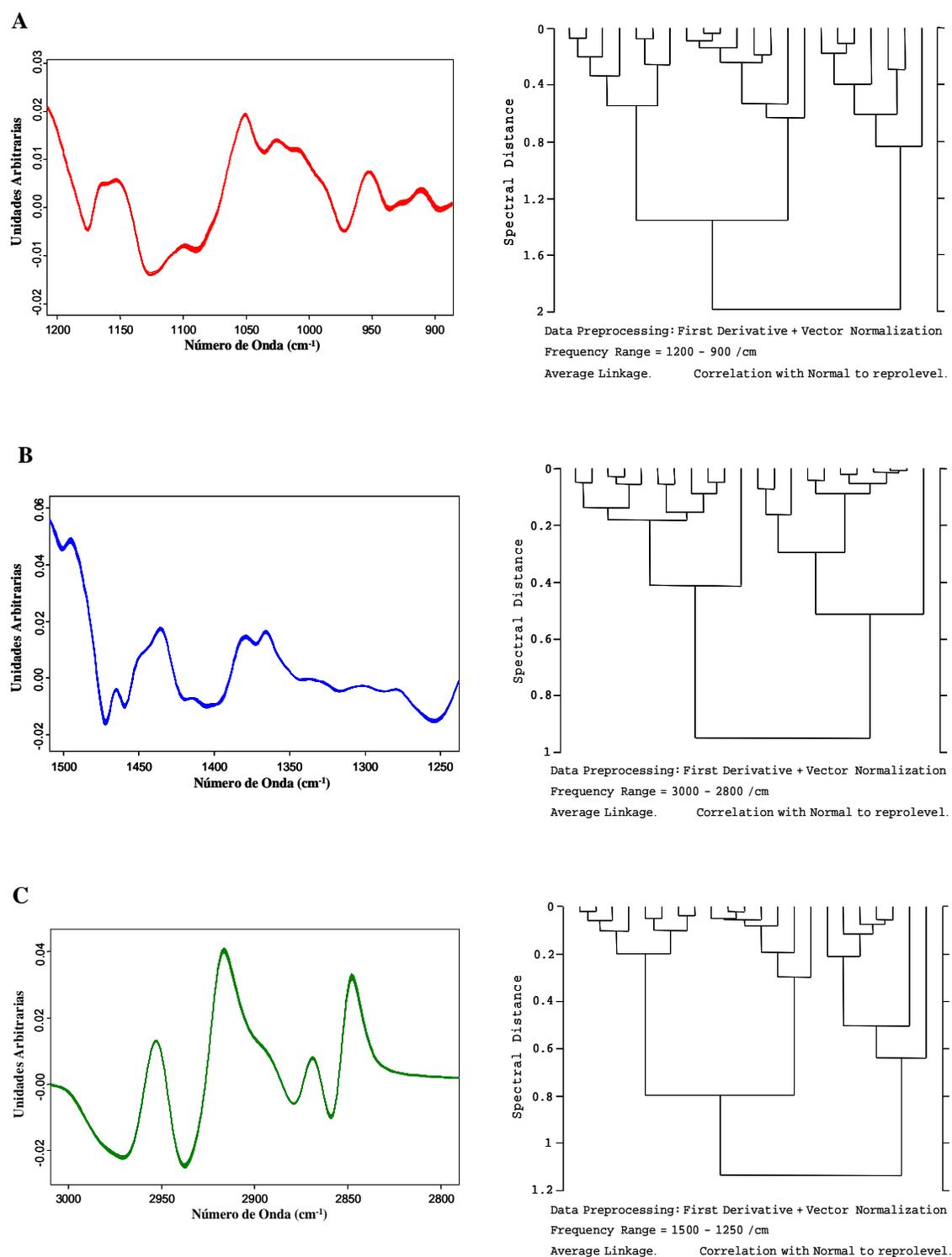


Fig. 16. Reproducibilidad de espectros IR obtenidos a partir de biomasa de *B. pertussis* Tohama I tratada mediante *shereado*. La variabilidad entre replicados de espectros IR, adquiridos a partir de biomasa de la cepa Tohama I sometida al tratamiento de *shereado*, fue examinada en las ventanas espectrales asignadas a: **A)** Polisacáridos ($1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$), **B)** Zona Mixta ($1500\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$) y **C)** Lípidos ($3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$). Para cada región se pueden observar las derivadas primeras normalizadas y el dendrograma obtenido como resultado del Analisis de Clusters.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el tratamiento de lavado de biomasa fue seleccionado como el más adecuado para obtener una apropiada reproducibilidad espectral porque no causaría la pérdida de componentes de superficie, permitiendo realizar el estudio de diferenciación fenotípica entre las muestras de *B. pertussis* sin interferencias. Este simple tratamiento garantizó un grado de reproducibilidad adecuado entre replicados espectrales.

Tabla 4. Niveles de reproducibilidad de espectros IR de *B. pertussis* Tohama I obtenidos a partir de biomasa no tratada, y sometida al tratamiento de lavado y de shereado

Biomasa Tohama I	Valores <i>D</i> para las regiones espectrales:		
	Polisacáridos (1200-900 cm ⁻¹)	Zona Mixta (1500-1250 cm ⁻¹)	Lípidos (3000-2800 cm ⁻¹)
Sin Tratamiento	24,8 ± 23,4	8,42 ± 7,64	4,38 ± 3,55
Lavado	6,21 ± 5,30	7,83 ± 6,92	3,59 ± 2,81
Shereado	0,98 ± 0,67	0,56 ± 0,49	0,47 ± 0,38

Los valores de Distancia Espectral (*D*) fueron obtenidos a partir de los dendrogramas construidos considerando las ventanas espectrales asignadas a polisacáridos, zona mixta y lípidos.

Tabla 5. Niveles de reproducibilidad para espectros IR del aislado clínico Bp 2723 obtenidos a partir de biomasa no tratada, y sometida al tratamiento de lavado y de shereado

Biomasa Bp 2723	Valores <i>D</i> para las regiones espectrales:		
	Polisacáridos (1200-900 cm ⁻¹)	Zona Mixta (1500-1250 cm ⁻¹)	Lípidos (3000-2800 cm ⁻¹)
Sin Tratamiento	27,8 ± 26,3	9,86 ± 8,97	3,92 ± 2,76
Lavado	7,53 ± 6,79	8,25 ± 7,36	3,12 ± 2,38
Shereado	1,45 ± 1,84	1,27 ± 1,50	0,91 ± 0,53

Los valores de Distancia Espectral (*D*) fueron determinados a partir de los dendrogramas construidos en base a las ventanas espectrales correspondientes a polisacáridos, zona mixta y lípidos.

Tabla 6. Niveles de reproducibilidad para espectros IR del aislado clínico Bp 350 obtenidos a partir de biomasa no tratada, y sometida al tratamiento de lavado y de shereado

Biomasa Bp 350	Valores <i>D</i> para las regiones espectrales:		
	Polisacáridos (1200-900 cm ⁻¹)	Zona Mixta (1500-1250 cm ⁻¹)	Lípidos (3000-2800 cm ⁻¹)
Sin Tratamiento	21,4 ± 20,3	6,54 ± 5,37	4,02 ± 3,31
Lavado	5,29 ± 4,38	5,73 ± 4,62	3,94 ± 2,60
Shereado	0,73 ± 0,51	0,54 ± 0,35	0,38 ± 0,25

Los valores de Distancia Espectral (*D*) se obtuvieron a partir de los dendrogramas construidos considerando las regiones espectrales asignadas a polisacáridos, zona mixta y lípidos.

II.3.4- Estudios de discriminación fenotípica

II.3.4.1- Diferenciación fenotípica entre *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*

El nivel de heterogeneidad entre muestras de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*, se analizó mediante un estudio de discriminación fenotípica incluyendo espectros IR pertenecientes a dichas especies. Espectros correspondientes a cepas de referencia y aislados clínicos de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* fueron analizados. A través de la superposición de las derivadas primeras se determinaron las regiones con mayores diferencias entre el conjunto de espectros de *B. pertussis* y el de *B. bronchiseptica*, las cuales corresponden a la regiones asignadas a carbohidratos (1200-900 cm^{-1}) (Fig. 17 A), zona mixta (1510-1250 cm^{-1}) (Fig. 17 B), proteínas (1800-1500 cm^{-1}) (Fig. 17 C), y lípidos (3000-2800 cm^{-1}) (Fig. 17 D). Esta última fue la región espectral con menor discriminación entre las muestras analizadas.

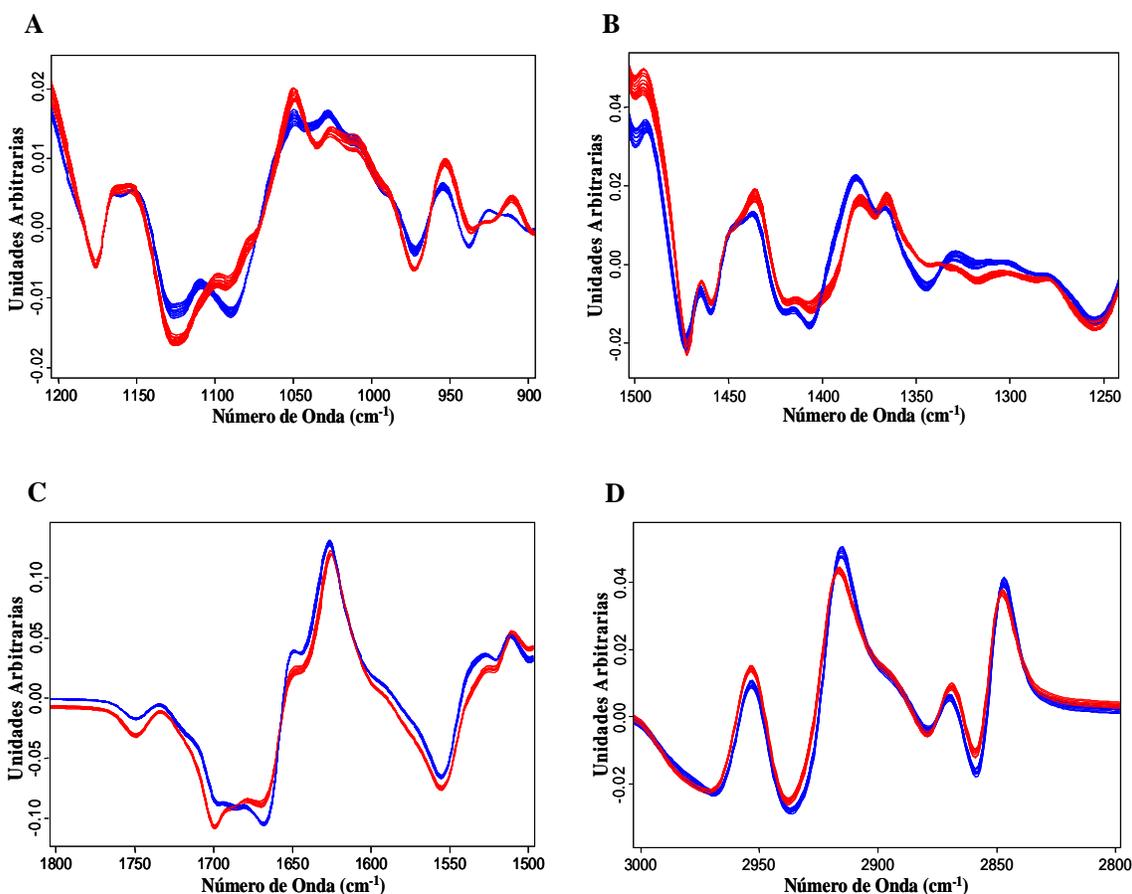
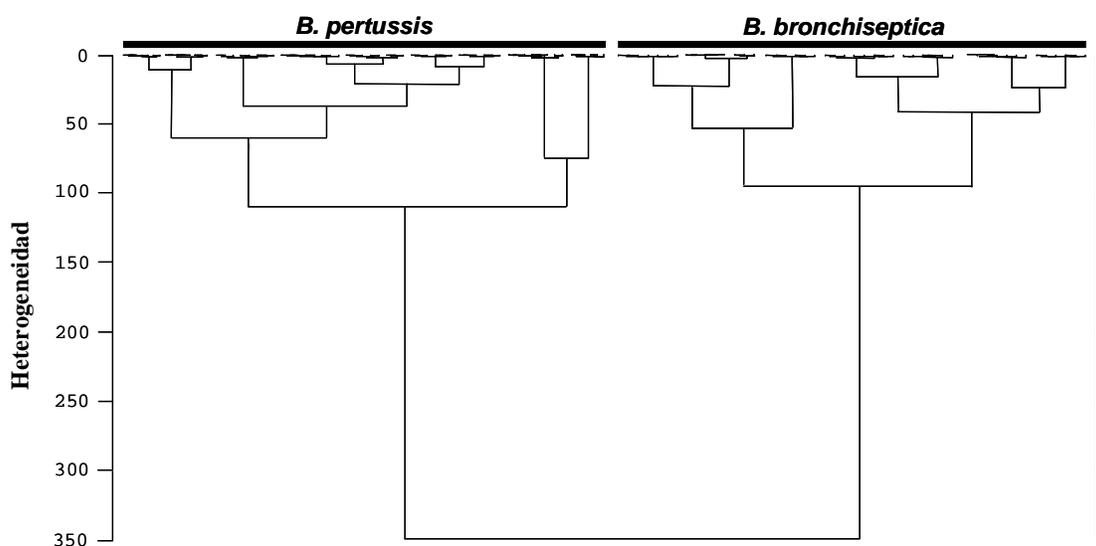


Fig. 17. Heterogeneidad entre espectros IR de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*. Las imágenes exhiben las regiones espectrales con máximas diferencias entre las derivadas primeras de espectros adquiridos a partir de muestras lavadas de *B. pertussis* (rojo) y *B. bronchiseptica* (azul). Dichas regiones corresponden a: **A)** polisacáridos (1200-900 cm^{-1}), **B)** Zona Mixta (1500-1250 cm^{-1}), **C)** proteínas (1800-1500 cm^{-1}) y **D)** lípidos (3000-2800 cm^{-1}).

Para este estudio se aplicó el método AJC sobre las derivadas primeras normalizadas de los espectros considerando las regiones espectrales seleccionadas y empleando el coeficiente de Pearson y el algoritmo de Ward. En la Figura 18 se muestra el dendrograma obtenido, a través del cual se consiguió diferenciar el conjunto de muestras pertenecientes a *B. pertussis* del correspondiente a *B. bronchiseptica*. Esta diferenciación entre las dos especies se observa como 2 grandes clusters marcadamente distanciados. La heterogeneidad observada entre ambos clusters fue cercana a 350, siendo este resultado el esperado para clusters pertenecientes a distintas especies dentro del mismo género bacteriano (24, 26, 30). Asimismo, por medio del dendrograma obtenido se pudo comprobar que las muestras de *B. bronchiseptica* analizadas presentaban una heterogeneidad de 20 a 100, la cual es similar a la observada para las muestras de *B. pertussis*. Mediante la aplicación de espectroscopía FT-IR y AJC se consiguió establecer en este análisis, el grado de disimilitud fenotípica existente entre *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*. El Análisis Jerárquico de Clusters empleando el algoritmo de Ward, fue aplicado por numerosos grupos de investigación para la clasificación y discriminación de bacterias y levaduras a nivel interespecie (26-27, 30, 55-56).



Data Preprocessing: First Derivative + Vector Normalization
 Ward's Algorithm
 Correlation with Scaling to 1st range
 Frequency Ranges (Weights) = 1200 - 900 /cm (1.0), 1500 - 1250 /cm (1.0)
 1800 - 1500 /cm (1.0), 3000 - 2800 /cm (1.0)

Fig. 18. Dendrograma obtenido a partir del Análisis Jerárquico de Clusters de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*. Derivadas primeras normalizadas correspondientes a espectros de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* fueron procesadas mediante Análisis de Clusters considerando las regiones espectrales 1200-900 cm^{-1} , 1500-1250 cm^{-1} , 1800-1500 cm^{-1} y 3000-2800 cm^{-1} . Se empleó el coeficiente de Pearson y el algoritmo de Ward para la construcción del dendrograma.

II.3.4.2- Diferenciación fenotípica entre aislados clínicos de *B. pertussis*

Para llevar a cabo el estudio de diferenciación fenotípica entre distintos aislados clínicos y cepas de referencia de *B. pertussis* se determinó en primer lugar las ventanas o regiones espectrales donde se observaron las mayores diferencias espectrales. La búsqueda de dichas regiones se realizó mediante la examinación, en todo el rango espectral ($4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$), de las derivadas primeras normalizadas correspondientes a espectros de la cepa Tohama I y 3 aislados clínicos de *B. pertussis* (Bp 2723, Bp 350 y Bp 7470). De esta manera se logró seleccionar cuatro ventanas espectrales. En la Figura 19 se detallan dichas regiones las cuales corresponden a las ventanas asignadas a carbohidratos ($1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$), Zona Mixta ($1500\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$), proteínas ($1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$) y lípidos ($3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$). La contribución aportada por esta última región a la diferenciación fue menor en comparación con las restantes ventanas espectrales. Asimismo, dentro de las mencionadas regiones espectrales se encontraron subregiones conteniendo la máxima discriminación entre los espectros de las

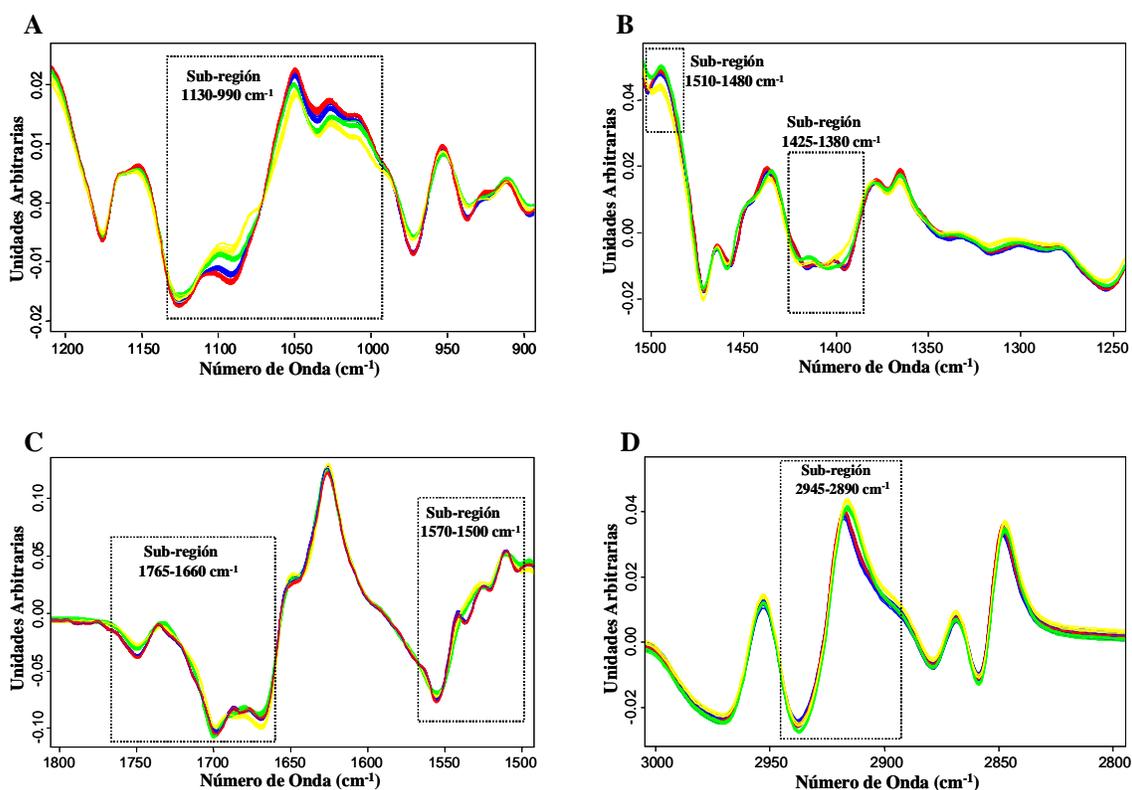


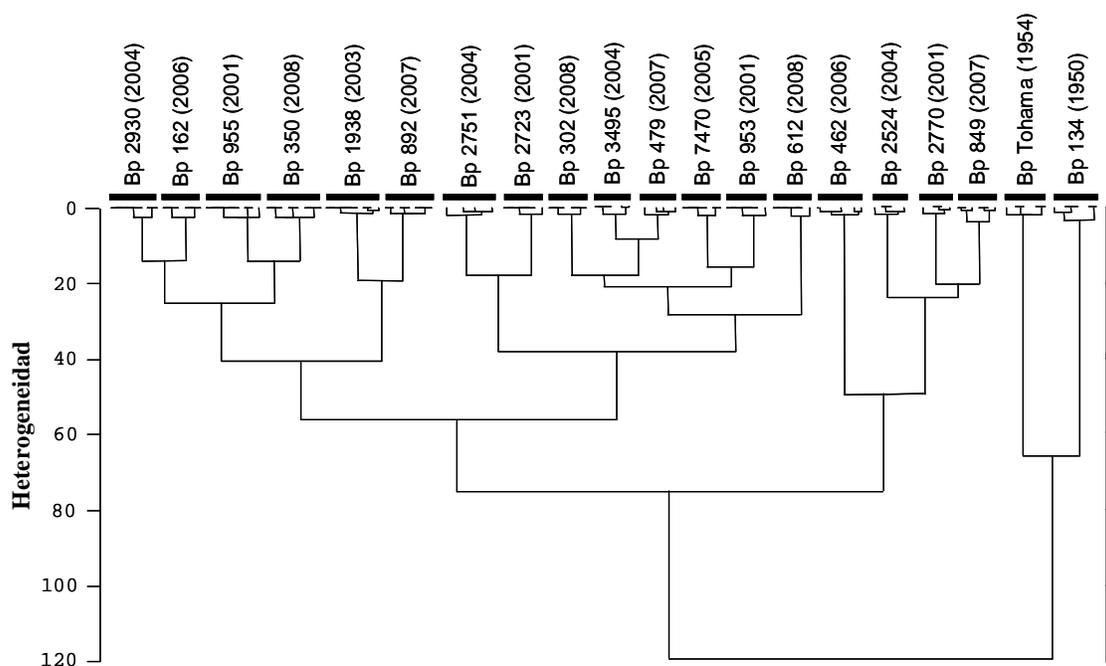
Fig. 19. Heterogeneidad entre espectros IR de la cepa de referencia Tohama I y 3 aislados clínicos de *B. pertussis*. Las imágenes muestran las regiones espectrales con mayores diferencias entre las derivadas primeras de espectros obtenidos a partir de muestras lavadas de la cepa Tohama I (amarillo), y de los aislados clínicos Bp 2723 (rojo), Bp 350 (azul) y Bp 7470 (verde) de *B. pertussis*. Dichas regiones corresponden a: **A)** polisacáridos ($1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$), **B)** Zona Mixta ($1500\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$), **C)** proteínas ($1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$) y **D)** lípidos ($3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$). Se indican las subregiones espectrales con máxima discriminación entre las derivadas.

distintas muestras. En la región perteneciente a polisacáridos (Fig. 19 A) las máximas diferencias fueron ubicadas en la subregión de 1130-990 cm^{-1} , en la Zona mixta (Fig. 19 B) se localizaron en las subregiones 1425-1380 cm^{-1} y 1510-1480 cm^{-1} . Asimismo, en la región de proteínas (Fig. 19 C) las máximas disimilitudes fueron halladas en las subregiones 1570-1500 cm^{-1} y 1765-1660 cm^{-1} , mientras que para la ventana de lípidos (Fig. 19 D) se ubicaron en el rango 2945-2890 cm^{-1} .

Luego de establecer las subregiones espectrales con máxima discriminación, se llevó a cabo el análisis de diferenciación fenotípica entre 18 aislados clínicos y 2 cepas de referencia de *B. pertussis*, con el objeto de estudiar la heterogeneidad entre las mismas. Para este análisis se emplearon los espectros replicados de todas las muestras de *B. pertussis* que superaron el test de calidad y que presentaron apropiados niveles de reproducibilidad espectral. Este estudio de diferenciación fenotípica se realizó considerando las 6 subregiones espectrales establecidas previamente (1130-990 cm^{-1} , 1425-1380 cm^{-1} , 1510-1480 cm^{-1} , 1570-1500 cm^{-1} , 1765-1660 cm^{-1} y 2945-2890 cm^{-1}).

En la Figura 20 se muestra el dendrograma correspondiente a 18 aislados clínicos y 2 cepas de referencia de *B. pertussis* (Tohama I y Bp 134), construido como resultado de la utilización del Análisis Jerárquico de Clusters. La aplicación del algoritmo de Ward y el coeficiente de Pearson sobre las derivadas primeras de los espectros IR, considerando las subregiones espectrales seleccionadas, permitió el agrupamiento de los espectros replicados, correspondientes a cada muestra analizada, en clusters distanciados entre sí. Asimismo a través de dicho dendrograma se logró determinar que la heterogeneidad máxima entre las distintas muestras de *B. pertussis* incluyendo las 2 cepas de referencia fue de 120. Las muestras correspondientes a los aislados clínicos se agruparon en un gran cluster que exhibió una heterogeneidad de 10 a 75, sugiriendo que entre dichos aislados existirían diferencias fenotípicas. Dicho cluster se presentó distanciado del cluster conformado por las 2 cepas de referencia, con una heterogeneidad entre ambos clusters cercana a 120. El distanciamiento entre estos clusters estaría sugiriendo una marcada diferencia fenotípica entre los aislamientos clínicos y ambas cepas de referencia de *B. pertussis*.

Cabe indicar que el Análisis Jerárquico de Clusters como método estadístico multivariante, fue utilizado en diferentes trabajos de investigación para la discriminación y clasificación a nivel intraespecie de bacterias, como así también de levaduras (25, 28-30, 57-58). A través del presente estudio se consiguió discriminar fenotípicamente muestras correspondientes a aislados clínicos y cepas de referencia de *B. pertussis* por medio de sus espectros infrarrojos.



Data Preprocessing: First Derivative + Vector Normalization

Ward's Algorithm

Correlation with Scaling to 1st range

Frequency Ranges (Weights) = 1130 - 990 /cm (1.0), 1425 - 1380 /cm (1.0)

1510 - 1480/cm(1.0), 1570 - 1500/cm(1.0), 1765 - 1660/cm(1.0), 2945 - 2890/cm(1.0)

Fig. 20. Dendrograma obtenido a partir del Análisis Jerárquico de Clusters de muestras de *B. pertussis*. Las derivadas primeras normalizadas correspondientes a los espectros IR de 18 aislados clínicos y 2 cepas de referencia de *B. pertussis*, fueron estudiadas mediante el Análisis de Clusters considerando las subregiones espectrales 1130-990 cm^{-1} , 1425-1380 cm^{-1} , 1510-1480 cm^{-1} , 1570-1500 cm^{-1} , 1765-1660 cm^{-1} y 2945-2890 cm^{-1} y empleando el coeficiente de Pearson y el algoritmo de Ward para la construcción del dendrograma.

II.4- DISCUSIÓN

Las diferencias genéticas entre cepas circulantes y vacunales de *B. pertussis*, registradas en los últimos años tanto en Argentina como en el resto del mundo, nos llevó a analizar las diferencias fenotípicas entre aislados clínicos locales y cepas de referencia de *B. pertussis* aplicando espectroscopía FT-IR y un método de análisis estadístico multivariante. Previo a este estudio, se realizó la discriminación fenotípica entre *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*. Para llevar a cabo estos estudios se debió, en primer lugar, estandarizar un procedimiento de análisis que incluyó: i) determinar la cantidad de biomasa necesaria para la adquisición de espectros IR, ii) llevar a cabo estudios de reproducibilidad espectral, iii) eliminar interferencias espectrales propias de las muestras y iv) definir que metodología emplear para encontrar diferencias espectrales.

Las interferencias espectrales que afectan el análisis de los espectros IR fueron eliminadas mediante un procedimiento de lavado de las suspensiones celulares. De esta manera se consiguieron niveles de reproducibilidad apropiados entre replicados espectrales. Una vez estandarizado el procedimiento de lectura y la reproducibilidad espectral para una misma muestra, se analizaron espectros IR adquiridos a partir de los distintos aislados clínicos y cepas de referencia de *B. pertussis*, como así también de los aislados clínicos de *B. bronchiseptica*. Este análisis mostró diferencias en determinadas zonas espectrales, las cuales adquirieron mayor significación al aplicar sobre los espectros la derivada primera, aumentando así la resolución espectral. A partir del análisis en todo el rango espectral del perfil de las derivadas primeras normalizadas, se seleccionaron regiones o ventanas espectrales con mayores diferencias entre los conjuntos de espectros IR.

Para el estudio de discriminación fenotípica entre las distintas muestras bacterianas se empleó el Análisis Jerárquico de Clusters. Este es uno de los métodos estadísticos multivariantes más utilizados no solo para estudios de diferenciación sino también en trabajos de clasificación e identificación microbiana, ya sea con bacterias como con algas y hongos, tanto a nivel de género, especie como así también subtipos (46). La ejecución de dicho análisis se efectuó empleando las derivadas primeras vectorialmente normalizadas de los espectros IR y aplicando el coeficiente de Pearson, como medida de distancia espectral, y el algoritmo de Ward para la construcción de los dendrogramas.

La metodología optimizada permitió establecer que la espectroscopía FT-IR puede ser empleada para discriminar aislados clínicos de *Bordetella* a nivel de especie. Por medio de un modelo multivariante construido a partir de las derivadas primeras de los espectros fue posible separar al conjunto de muestras pertenecientes a *B. pertussis* de aquel

correspondiente a *B. bronchiseptica*. La variación fenotípica detectada en los espectros IR permitió definir 2 grandes clusters con una heterogeneidad entre los mismos de 350 (Figura 18).

Finalmente mediante el estudio de diferenciación fenotípica aplicado a las muestras correspondientes a 18 aislados clínicos circulantes y 2 cepas de referencia de *B. pertussis* (análisis intraespecie), se consiguió agrupar a los espectros replicados de cada muestra en clusters suficientemente separados entre sí dentro del dendrograma construido (Figura 20). El total de aislados clínicos analizados se agruparon en un gran cluster distanciado de las cepas de referencia, sugiriendo que los aislados circulantes estudiados presentarían importantes diferencias fenotípicas con dichas cepas. Asimismo, la heterogeneidad obtenida dentro del cluster que agrupó a los aislados clínicos sugiere que entre los mismos habría diferencias fenotípicas. Es decir que, por medio de este estudio de discriminación fenotípica se determinó que existe un marcado nivel de heterogeneidad entre el conjunto de muestras correspondientes a los aislados clínicos circulantes y las cepas de referencia de *B. pertussis*, determinando también un grado de varianza entre aislados clínicos de *B. pertussis*.

Diferencias fenotípicas han sido estudiadas entre otros por Helm y col (23), Van Der Mei y col (24) y Curk y col (25), tanto a nivel intra e interespecie como así también a nivel intergénero bacteriano, aplicando espectroscopía FT-IR junto con el Análisis Jerárquico de Clusters, el coeficiente de Pearson y el algoritmo de Ward. En el presente trabajo, la aplicación del método Análisis Jerárquico de Clusters en conjunto con el coeficiente de Pearson y algoritmo de Ward demostraron ser eficientes para comprobar diferenciación fenotípica.

II.5- REFERENCIAS

1. Vitek, C., Pascual, F., Baughman, A., and Murphy, T. (2003) Increase in deaths from pertussis among young infants in the United States in the 1990s, *Pediatr Infect Dis J* 22, 628-634.
2. Davis, S., Strebel, P., Cochi, S., Zell, E., and Hadler, S. *Pertussis surveillance-United States, 1989-1991. MMWR* 1992;41(No. SS-8):11-19.
3. Sintchenko, V. (2008) The re-emergence of pertussis: implications for diagnosis and surveillance, *N S W Public Health Bull.* 19, 143-145.
4. Fingermann, M., Fernandez, J., Sisti, F., Rodriguez, M. E., Gatti, B., Bottero, D., Graieb, A., Gaillard, M. E., Ayala, S. G., Mooi, F. R., Lopardo, H., and Hozbor, D. (2006) Differences of circulating Bordetella pertussis population in Argentina from the strain used in vaccine production, *Vaccine.* 24, 3513-3521. Epub 2006 Feb 3528.
5. Weber, C., Boursaux-Eude, C., Coralie, G., Caro, V., and Guiso, N. (2001) Polymorphism of Bordetella pertussis isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years, *J Clin Microbiol.* 39, 4396-4403.
6. Mooi, F. R. (2010) Bordetella pertussis and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen, *Infect Genet Evol.* 10, 36-49. Epub 2009 Oct 2030.
7. Elomaa, A., Advani, A., Donnelly, D., Antila, M., Mertsola, J., Hallander, H., and He, Q. (2005) Strain variation among Bordetella pertussis isolates in Finland, where the whole-cell pertussis vaccine has been used for 50 years, *J Clin Microbiol.* 43, 3681-3687.
8. Mastrantonio, P., Spigaglia, P., van Oirschot, H., van der Heide, H. G., Heuvelman, K., Stefanelli, P., and Mooi, F. R. (1999) Antigenic variants in Bordetella pertussis strains isolated from vaccinated and unvaccinated children, *Microbiology.* 145, 2069-2075.
9. Van Loo, I. H., Heuvelman, K. J., King, A. J., and Mooi, F. R. (2002) Multilocus sequence typing of Bordetella pertussis based on surface protein genes, *J Clin Microbiol.* 40, 1994-2001.
10. Mooi, F. R., van Oirschot, H., Heuvelman, K., van der Heide, H. G., Gaastra, W., and Willems, R. J. (1998) Polymorphism in the Bordetella pertussis virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution, *Infect Immun.* 66, 670-675.
11. Cassiday, P., Sanden, G., Heuvelman, K., Mooi, F., Bisgard, K. M., and Popovic, T. (2000) Polymorphism in Bordetella pertussis pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935-1999, *J Infect Dis.* 182, 1402-1408. Epub 2000 Oct 1409.
12. Tsang, R. S., Lau, A. K., Sill, M. L., Halperin, S. A., Van Caesele, P., Jamieson, F., and Martin, I. E. (2004) Polymorphisms of the fimbria fim3 gene of Bordetella pertussis strains isolated in Canada, *J Clin Microbiol.* 42, 5364-5367.
13. Fry, N. K., Neal, S., Harrison, T. G., Miller, E., Matthews, R., and George, R. C. (2001) Genotypic variation in the Bordetella pertussis virulence factors pertactin and pertussis toxin in historical and recent clinical isolates in the United Kingdom, *Infect Immun.* 69, 5520-5528.
14. Mooi, F. R., van Loo, I. H., van Gent, M., He, Q., Bart, M. J., Heuvelman, K. J., de Greeff, S. C., Diavatopoulos, D., Teunis, P., Nagelkerke, N., and Mertsola, J. (2009) Bordetella pertussis strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence, *Emerg Infect Dis.* 15, 1206-1213.

15. Van Loo, I. H., and Mooi, F. R. (2002) Changes in the Dutch *Bordetella pertussis* population in the first 20 years after the introduction of whole-cell vaccines, *Microbiology*. *148*, 2011-2018.
16. Heikkinen, E., Kallonen, T., Saarinen, L., Sara, R., King, A. J., Mooi, F. R., Soini, J. T., Mertsola, J., and He, Q. (2007) Comparative genomics of *Bordetella pertussis* reveals progressive gene loss in Finnish strains, *PLoS One*. *2*, e904.
17. Heikkinen, E., Xing, D. K., Olander, R. M., Hytonen, J., Viljanen, M. K., Mertsola, J., and He, Q. (2008) *Bordetella pertussis* isolates in Finland: serotype and fimbrial expression, *BMC Microbiol*. *8*, 162.
18. Ntezayabo, B., De Serres, G., and Duval, B. (2003) Pertussis resurgence in Canada largely caused by a cohort effect, *Pediatr Infect Dis J*. *22*, 22-27.
19. Poynten, M., McIntyre, P. B., Mooi, F. R., Heuvelman, K. J., and Gilbert, G. L. (2004) Temporal trends in circulating *Bordetella pertussis* strains in Australia, *Epidemiol Infect*. *132*, 185-193.
20. Celentano, L. P., Massari, M., Paramatti, D., Salmaso, S., and Tozzi, A. E. (2005) Resurgence of pertussis in Europe, *Pediatr Infect Dis J*. *24*, 761-765.
21. Botero, D., Gaillard, M., Fingerman, M., Weltman, G., Fernandez, J., Sisti, F., Graieb, A., Roberts, R., Rico, O., Rios, G., Regueira, M., Binztein, N., and Hozbor, D. (2007) Pulsed-Field gel electrophoresis, Pertactin, Pertussis Toxin S1 subunit polymorphisms and surface analysis of vaccine and chemical *Bordetella pertussis* strains, *Clin Vacc immunol* *14*, 1490-1498.
22. Caro, V., Bouchez, V., Guiso, N., Gatti, B., Agosti, M. R., and Ayala, S. E. (2007) Pertussis in Argentina and France, *Vaccine*. *25*, 4335-4339. Epub 2006 Aug 4331.
23. Helm, D., Labischinsky, H., Schallehn, G., and Naumann, D. (1991) Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy, *J Gen Microbiol* *137*, 69-79.
24. Van der Mei, H., Naumann, D., and Busscher, H. (1993) Grouping of oral streptococcal species using Fourier-transform infrared spectroscopy in comparison with classical microbiological identification, *Arch Oral Biol* *38*, 1013-1019.
25. Curk, M., Peladan, F., and Hubert, J. (1994) Fourier transform infrared spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species, *FEMS Microbiol Lett* *123*, 241-248.
26. Johnsen, K., and Nielsen, P. (1999) Diversity of *Pseudomonas* strains isolated with King's B and Gould's S1 agar determined by repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction, 16S rDNA sequencing and Fourier transform infrared spectroscopy characterisation, *FEMS Microbiol Lett* *173*, 155-162.
27. Gomez, J., Sockalingum, G., Aubert, D., Toubas, D., Pinon, J., Witthum, F., and Manfait, M. (1999) Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions, Kluwer, Dordrecht, 469-470.
28. Bastert, J., Korting, H., Traenkle, A., and Schmalreck, A. (1999) Identification of dermatophytes by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), *Mycoses* *42*, 525-528.
29. Irmscher, H., Fischer, R., Beer, W., and Seltsmann, G. (1999) Characterization of nosocomial *Serratia marcescens* isolates: comparison of Fourier-transform infrared spectroscopy with pulsed-field gel electrophoresis of genomic DNA fragments and multilocus enzyme electrophoresis, *Zentralbl Bacteriol* *289*, 249-263.
30. Amiel, C., Mariey, L., Curk-Daubie, M., Pichon, P., and Travert, J. (2000) Potentiality of Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) for discrimination and identification of dairy lactic acid bacteria, *Lait* *80*, 445-459.
31. Smith, B. (1999) Infrared Spectral Interpretation. A Systematic Approach, USA. CRC Press LLC.

32. Naumann, D. (2000) Infrared Spectroscopy in Microbiology. In Encyclopedia of analytical chemistry. R. A. Meyers. pp: 102-131.
33. Tu, A. (1982) Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications, *New York: Jhon Wilwy & Sons*.
34. Li-Vien, D., Colthup, N., Fateley, W., and Grasselli, J. (1991) The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules. Boston: Academic Press.
35. Stuart, B., and Ando, D. (1997) Biological Applications of Infrared Spectroscopy.
36. Maquelin, K., Choo-Smith, L., Kirschner, C., Ngo Thi, N., Naumann, D., and Puppels, G. (2002) Vibrational Spectroscopic Studies of Microorganisms. In: Chalmers JM, Griffiths PR, editors. Handbook of Vibrational Spectroscopy. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. pp: 1-27.
37. Naumann, D. (2001) FT-IR and FT-NIR Raman Spectroscopy in Biomedical Research. Gremlich, Hans-Ulrich and Yang, Bing. USA, Marcel Dekker, Inc. Practical Spectroscopy., 24, 323-377.
38. Bruker. Sample Preparation, Measurement and Evaluation of the FT-IR Spectra of Microorganisms. 1993. Ettlingen, Germany: Bruker Optik GmbH.
39. Bruker. (1999) Identification of Bacteria by FT-IR Spectroscopy. Bio-Medical. FT-IR/NIR/Raman, 2, 1-15.
40. Amiel, C., Mariey, L., Denis, C., Pichon, P., and Travert, J. (2001) FT-IR spectroscopy and taxonomic purpose: Contribution to the classification of lactic acid bacteria, *Lait* 81, 249-255.
41. Guibet, F., Amiel, C., Cadot, P., Cordevant, C., Desmonts, M., Lange, M., Marecat, A., Travert, J., Denis, C., and Mariey, L. (2003) Discrimination and classification of Enterococci by Fourier Transform infrared (FT-IR) spectroscopy, *Vibrational Spectrosc* 33, 133-142.
42. Bruker Optics. (2004) Identification Yeast and Bacteria in Food, *Bruker Optics, Billerica MA 01821, USA*.
43. Naumann, D., Helm, D., and Labischinski, H. (1991) Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy, *Nature* 351, 81-82.
44. Maquelin, K., Choo-Smith, L. P., van Vreeswijk, T., Endtz, H. P., Smith, B., Bennett, R., Bruining, H. A., and Puppels, G. J. (2000) Raman spectroscopic method for identification of clinically relevant microorganisms growing on solid culture medium, *Anal Chem.* 72, 12-19.
45. Schmitt, J., and Udelhoven, T. (2001) Use of Artificial Neural Networks in Biomedical Diagnosis. In: Gremlich H-U, Yang B, editors. Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Material. New York: Marcel Dekker, Inc. 379-419.
46. Mariey, L., Signolle, J., Amiel, C., and Travert, J. (2001) Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics, *Vibrational Spectrosc* 26, 151-159.
47. Kansiz, M., Heraud, P., Wood, B., Burden, F., Beardell, J., and McNaughton, D. (1999) Fourier Transform Infrared spectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains., *Photochemistry* 52, 407-417.
48. Bosch, A., Miñan, A., Vescina, C., Degrossi, J., Gatti, B., Monttano, P., Messina, M., Franco, M., Vay, C., Schmitt, J., Naumann, D., and Yantorno, O. (2008) Fourier transform infrared spectroscopy for rapid identification of nonfermenting Gram negative bacteria isolated from sputum samples from cystic patients, *J Clin Microbiol* 46, 2535-2546.
49. Stainer, D., and Scholte, M. (1971) A simple chemically defined medium for production of phase I Bordetella pertussis, *J Gen Microbiol* 63, 211-220.

50. Sato, Y., and Arai, H. (1972) Leucocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis*. Purification and characterization, *Infect Immun* 6, 899-904.
51. Bosch, A., Golowczyc, M., Abraham, A., Garrote, G., De Antoni, G., and Yantorno, O. (2006) Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy, *Int J Food Microbiol* 111, 280-287.
52. Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L., Ngo-Thi, N., van Vreeswijk, T., Stammler, M., Endtz, H., Bruining, H., Naumann, D., and Puppels, G. (2003) Prospective study of the performance of vibrational spectroscopy for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures, *J Clin Microbiol* 41, 324-329.
53. Spath, H. (1980) Cluster Analysis Algorithms for Data Reduction and Classification of Objects. England, UK: Chichester.
54. Bosch, A., Prieto, C., Serra, D. O., Martina, P., Stammbl, M., Naumann, D., Schmitt, J., and Yantorno, O. (2010) Type-IV pili spectroscopic markers: applications in the quantification of piliation levels in *Moraxella bovis* cells by a FT-IR ANN-based model, *J Biophotonics*. 3, 522-533.
55. Kummerle, M., Scherer, S., and Seiler, H. (1998) Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy, *Appl Environ Microbiol*. 64, 2207-2214.
56. Tintelnot, K., Haase, G., Seibold, M., Bergmann, F., Staemmler, M., Franz, T., and Naumann, D. (2000) Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*, *J Clin Microbiol* 38, 1599- 1608.
57. Seltmann, G., Voigt, W., and Beer, W. (1994) Application of physico-chemical typing methods for the epidemiological analysis of *Salmonella enteritis* strains of phage type 25/17, *Epidemiol Infect* 113, 411-424.
58. Timmins, E., Quain, D., and Goodacre, R. (1998) Differentiation of brewing yeast strains by pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy, *Yeast* 14, 885-893.

CAPÍTULO III

Crecimiento en biofilm de aislados clínicos y de la cepa de referencia *Bordetella pertussis* Tohama I

ÍNDICE DEL CAPÍTULO III	Página
III.1- INTRODUCCIÓN	85
III.1.1- Conceptos y definición de biofilms microbianos	85
III.1.2- Etapas del proceso de formación de biofilms.....	86
III.1.3- Características estructurales de los biofilms.....	89
III.1.4- Regulación del desarrollo de biofilms.....	91
III.1.5- Impacto de los biofilms en el sector de salud.....	92
III.1.6- Antecedentes del desarrollo en biofilm de <i>B. pertussis</i>	94
III.1.6.1- <i>Formación de biofilm por B. pertussis</i>	95
III.1.6.2- <i>Fenotipo distintivo de B. pertussis en biofilm</i>	95
III.1.7- Objetivos del capítulo	96
III.2- MATERIALES Y MÉTODOS	97
III.2.1- Microorganismos y condiciones de cultivo.....	97
III.2.1.1- <i>Cepas bacterianas</i>	97
III.2.1.2- <i>Condiciones de crecimiento</i>	97
III.2.2- Cinética de crecimiento	97
III.2.3- Ensayos para análisis de adhesión	98
III.2.3.1- <i>Cinética de adhesión a superficie abiótica</i>	98
III.2.3.2- <i>Análisis comparativo de adhesión</i>	99
III.2.3.3- <i>Adhesión bajo condiciones de no crecimiento</i>	99
III.2.3.4- <i>Adhesión bajo condiciones de modulación</i>	99
III.2.4- Ensayos para el análisis de la formación de biofilm	100
III.2.4.1- <i>Sistema de cultivo batch con recambio de medio</i>	100
III.2.4.2- <i>Sistema de cultivo con flujo continuo de nutrientes</i>	102
III.2.5- Electroforesis SDS-PAGE de células enteras.....	103
III.2.5.1- <i>Obtención de células sésiles</i>	103
III.2.5.2- <i>Obtención de células planctónicas</i>	104
III.2.5.3- <i>Análisis por SDS-PAGE</i>	105

III.2.6- Análisis por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier	105
III.2.6.1- <i>Preparación de muestras de células sésiles</i>	105
III.2.6.2- <i>Preparación de muestras de células planctónicas</i>	106
III.2.6.3- <i>Espectroscopía FT-IR de células planctónicas y sésiles</i>	106
III.2.6.4- <i>Método estadístico multivariado aplicado al análisis de espectros IR</i>	106
III.2.6.5- <i>Estudio de la composición macromolecular de células planctónicas y sésiles</i>	107
III.3- RESULTADOS	108
III.3.1- Cinética de crecimiento en cultivo líquido.....	108
III.3.2- Análisis de la adhesión a superficie	109
III.3.2.1- <i>Cinética de adhesión a superficie abiótica</i>	109
III.3.2.2- <i>Análisis de la adhesión a una superficie abiótica por aislados clínicos de B. pertussis</i>	111
III.3.2.3- <i>Adhesión bajo condiciones de no crecimiento</i>	113
III.3.2.4- <i>Efecto de la modulación sobre la adhesión a soportes abióticos</i>	114
III.3.3- Formación de biofilm sobre superficie abiótica	115
III.3.3.1- <i>Sistema de cultivo batch con recambio de medio</i>	115
III.3.3.2- <i>Sistema de cultivo con flujo continuo de nutrientes</i>	116
III.3.4- Análisis de células enteras por SDS-PAGE	117
III.3.5- Estudio comparativo de la expresión fenotípica de células planctónicas y sésiles mediante FT-IR.....	118
III.3.5.1- <i>Análisis de espectros IR de células planctónicas y sésiles mediante un método estadístico multivariado</i>	119
III.3.5.2- Estudio comparativo entre espectros IR de células planctónicas y sésiles.....	119
III.3.5.3- <i>Estudio semi-cuantitativo de la composición macromolecular de células planctónicas y sésiles de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953</i>	121
III.4- DISCUSIÓN	124
III.5- REFERENCIAS	126

III.1- INTRODUCCIÓN

III.1.1- Conceptos y definición de biofilms microbianos

Durante muchos años los cultivos líquidos han constituido la forma de estudiar las características fisiológicas de las bacterias. Sin embargo este tipo de crecimiento dista considerablemente de representar el modo de vida que dichos microorganismos exhiben en la naturaleza. A través de estudios microscópicos y metodologías recuperativas, llevadas a cabo en una gran variedad de hábitats naturales, se ha establecido que la mayoría de los microorganismos se desarrollan y persisten adheridos a superficies (células sésiles) dentro de ecosistemas estructurales denominados biofilms y no como organismos flotando o nadando libremente en soluciones acuosas (células planctónicas) (1-3).

A partir de principios del siglo XX, Zobell y otros autores describieron la capacidad que poseen las bacterias acuáticas de adherirse a distintos tipos de superficie (4-5). Sin embargo recién en 1978 comienza a difundirse el concepto de biofilm debido a las descripciones que Costerton, Geesey y Cheng realizaron sobre los efectos de organizaciones microbianas en variados ambientes naturales (6). Una de las definiciones de biofilm con más aceptación en la actualidad establece que es una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células adheridas irreversiblemente a un sustrato o interfase, o unas con otras, las cuales están contenidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares producidas por ellas mismas y que expresan un fenotipo propio (3). La Figura 1 muestra imágenes de un biofilm del patógeno *Vibrio cholerae* donde se puede observar la matriz polimérica extracelular. La mencionada definición de biofilm incluye a todas aquellas comunidades o consorcios compuestos por múltiples especies bacterianas o por diferentes grupos de microorganismos

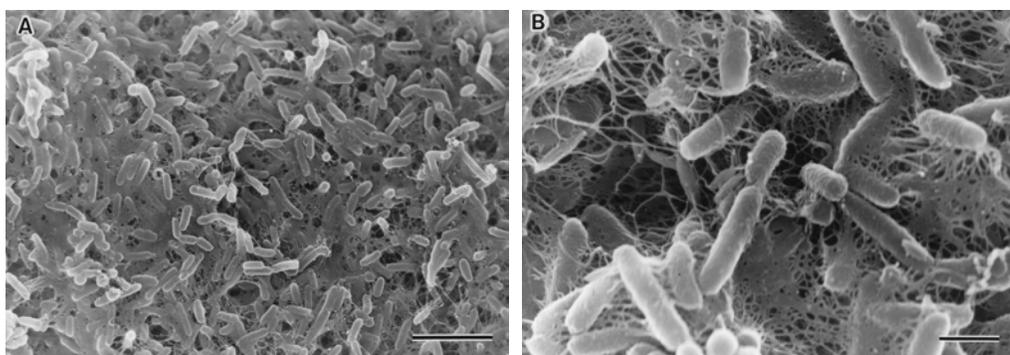


Fig. 1. Imágenes de un biofilm de *V. cholerae* obtenidas por microscopía de escaneo electrónico. A) Superficie colonizada por bacterias en división formando un biofilm robusto. Barra: 5 µm. B) Mediante mayor aumento se puede observar la presencia de material polimérico extracelular condensado el cual constituye la matriz del biofilm. Barra: 1 µm. (Imágenes adquiridas del trabajo publicado por Wai y col (1998).

(hongos, algas y protozoos), que son las comunidades que habitualmente predominan sobre substratos bióticos y abióticos de ambientes naturales (1). Las células sésiles presentan un amplio rango de estadios fisiológicos. Es decir que en un biofilm conviven células con diversos genotipos y fenotipos que expresan distintas vías metabólicas, respuestas a estrés y actividades biológicas específicas. Los mecanismos que contribuyen a esta heterogeneidad genética y fisiológica incluyen a los gradientes químicos, la adaptación a las condiciones ambientales locales y la variación genotípica (7).

Profesionales de diversas áreas industriales, en especial aquellos relacionados con el tratamiento industrial del agua y con la elaboración de alimentos, fueron los primeros en aceptar esta forma de crecimiento microbiano, como así también en desarrollar métodos de muestreo de microorganismos adheridos a cañerías y técnicas para controlar sus onerosas consecuencias (8-9).

En el área biomédica concretamente en microbiología clínica, los profesionales se han resistido a aceptar el concepto de biofilm hasta la última década. Sin embargo en este ámbito la situación ha cambiado notoriamente en los últimos años, haciéndose evidente debido al aumento del número de publicaciones internacionales referidas al tema. Asimismo, son las investigaciones en el área de microbiología clínica las que están consiguiendo los principales avances sobre el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la formación de biofilm, en especial aquellos generados por patógenos bacterianos (10-11). En este sentido, el patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa*, surgió como el microorganismo cuya capacidad para desarrollar biofilm esta siendo más intensamente investigada, aunque también otras bacterias patógenas Gram negativas como *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas fluorescens* están siendo investigadas en relación a su capacidad de formación de biofilm (12). Los patógenos Gram positivos formadores de biofilm más estudiados incluyen *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, y enterococos (12).

III.1.2- Etapas del proceso de formación de biofilms

El desarrollo de un biofilm microbiano tiene lugar mediante una serie de etapas perfectamente reguladas. Mientras que el mecanismo molecular involucrado en este proceso de desarrollo puede diferir de un organismo a otro, las etapas de construcción de un biofilm estarían conservadas en un amplio rango de microorganismos. Dichas etapas son: 1) adhesión de células a una superficie biótica o abiótica; 2) crecimiento y agregación de células formando microcolonias; 3) maduración y mantenimiento de la estructura del

biofilm; 4) desprendimiento de células de la estructura para colonizar otros ambientes (12-13).

Los biofilms bacterianos comienzan a formarse cuando células individuales se adhieren a una superficie. La capacidad de las bacterias para ejecutar esta etapa depende de la presencia de ciertos factores de adherencia cuya expresión depende de factores ambientales como son la temperatura, el pH, la fuerza iónica y las condiciones nutricionales, como así también de las propiedades del sustrato (14).

Se ha demostrado que las características fisicoquímicas del ambiente y del sustrato son importantes en la absorción reversible de la bacteria (15), mientras que los factores de adhesión propios de las bacterias son generalmente necesarios para conseguir la adherencia irreversible al soporte (12). En este contexto se verificó que en bacterias Gram negativas, como ser *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *E. coli* y *Salmonella entérica*, las fimbrias de tipo I, IV, los pili y los lipopolisacáridos son importantes para la etapa de adhesión irreversible (Figura 2, etapa 1) (12-13). Por otro lado, la movilidad mediada por flagelos parece ayudar a la bacteria a alcanzar la superficie y así contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas (16). Sin embargo, aunque esta característica colabora con el proceso de formación de biofilm no parece ser fundamental, ya que muchas bacterias Gram-positivas inmóviles como estafilococos, estreptococos y micobacterias son capaces de desarrollar biofilms. Para las bacterias Gram-positivas se ha descrito la intervención de ciertas proteínas de superficie (AtlE, Bap, Esp) en esta primera fase de adhesión al sustrato (14, 17).

En el caso de *P. aeruginosa* se ha descrito que la adhesión inicial provoca cambios importantes en la expresión de factores vinculados con la conformación de microcolonias. Por ejemplo, se determinó que luego de la adhesión, la expresión de flagelos disminuye, mientras que la expresión de fimbrias tipo IV se incrementa, por lo cual las bacterias se desplazarían sobre el soporte, favoreciéndose de este modo el reclutamiento e interacción entre ellas (Figura 2, etapa 2) (13). Estos sucesos serían esenciales para el desarrollo de microcolonias. En otros casos la formación de microcolonias ocurre por medio de eventos de división bacteriana donde las células hijas se extienden cerca del sitio de adhesión inicial (18).

La síntesis de las sustancias poliméricas extracelulares (polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) que conforman la matriz resulta primordial durante la etapa de maduración de la mayoría de los biofilms microbianos (Figura 2, etapa 3) (19). En dicha etapa la producción y secreción de exopolisacáridos es esencial para la construcción y el mantenimiento de las estructuras tridimensionales tipo hongo que caracterizan a ciertos tipos

de biofilms bacterianos. Estas estructuras delimitan, en los biofilms maduros la formación de canales a través de los cuales circulan nutrientes como así también desechos generados a partir del metabolismo de la comunidad microbiana (18).

Estudios realizados indican que la composición del exopolisacárido difiere entre las especies bacterianas, variando desde alginato en *P. aeruginosa* (20), celulosa en *Salmonella typhimurium* (21), un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *Vibrio cholerae* (22) y poli-*N* acetilglucosamina en *S. aureus* (23), entre otros.

Por último, algunas bacterias inmersas en la matriz extracelular del biofilm son liberadas para lograr alcanzar y colonizar nuevas superficies, cerrando de este modo el proceso de desarrollo del biofilm (Figura 2, etapa 4) (12-13). Ciertos estudios indican que en *P. aeruginosa* la disponibilidad de nutrientes cumpliría un rol substancial en la liberación de bacterias de la matriz y por ende en la dispersión del biofilm, a través de la regulación de la expresión del flagelo y fimbria tipo IV (24). Justamente, cambios nutricionales provocarían un aumento de la síntesis de flagelos y una disminución de la expresión de fimbria tipo IV, contrariamente a lo que sucede durante la formación de microcolonias, causando una disminución de la adherencia de las células entre sí y con la superficie como así también un aumento de su movilidad, lo que favorecería en consecuencia el desprendimiento de bacterias de la estructura del biofilm (25).

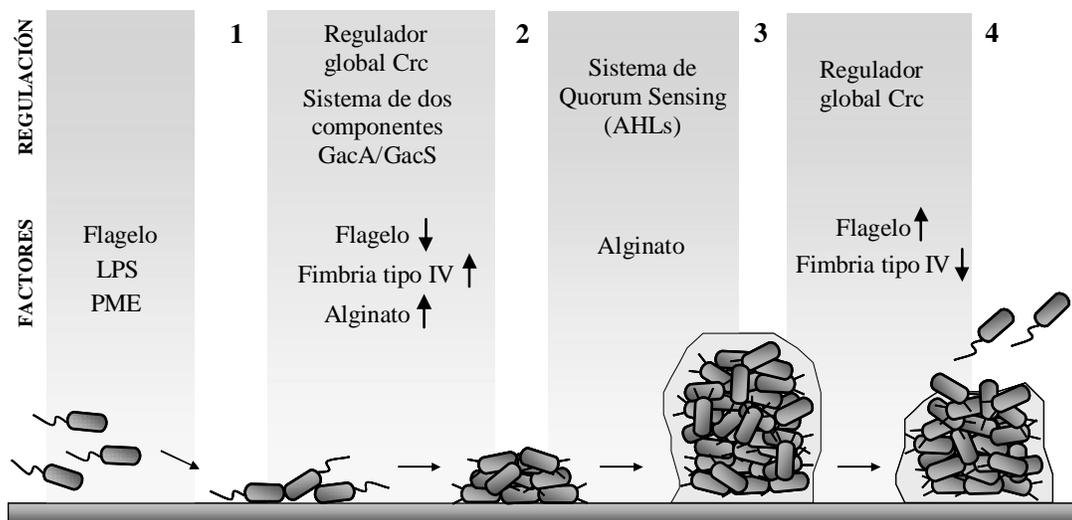


Fig. 2. Etapas de la formación de un biofilm. Elementos regulatorios y factores de virulencia involucrados en el desarrollo de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*. **1)** Adhesión de células a una superficie; **2)** crecimiento y agregación de células formando microcolonias; **3)** maduración y mantenimiento de la arquitectura del biofilm; **4)** desprendimiento de bacterias de la estructura del biofilm para colonizar otros ambientes.

III.1.3- Características estructurales de los biofilms

Estudios llevados a cabo mediante la aplicación de técnicas microscópicas permitieron determinar que la mayoría de los biofilms exhiben arquitecturas complejas y muy heterogéneas. Dependiendo especialmente de la bacteria y de las condiciones de crecimiento, ha sido factible detectar mediante microscopía de escaneo láser confocal la formación de estructuras tridimensionales constituidas por distintos arreglos celulares en permanente interacción con las sustancias poliméricas extracelulares que los mismos microorganismos sintetizan y liberan (3). Por lo general, estas estructuras tipo hongo, observadas en biofilms formados por *P. aeruginosa*, se intercalan con zonas abiertas en las cuales se forman canales de flujo que permiten la incorporación de nutrientes a las células como asimismo la liberación al medio de productos metabólicos y desechos. Tanto los nutrientes como los compuestos producidos por las células difunden dentro y fuera de las microcolonias a través de distintas capas o estratos que las componen.

En la Figura 3 se muestra conceptualmente la estructura de un biofilm bacteriano en su estadio maduro. La matriz polimérica extracelular constituye una red conformada esencialmente por polisacáridos y también otros componentes, en la cual quedan retenidos múltiples productos celulares, incluyendo factores de virulencia. La matriz así constituida puede actuar como una barrera de difusión física y química, pudiendo prevenir la penetración de antibióticos, o de los anticuerpos producidos por el hospedador, como así también evitar la captura de las bacterias por parte de las células fagocíticas del sistema inmune (19).

En los biofilm microbianos maduros generalmente se producen gradientes nutricionales que causarían la formación de microentornos con elevada disimilitud dentro de la misma estructura del biofilm (26). Las diferencias más evidentes entre estos microentornos se generan entre las capas celulares localizadas en la base de la microcolonias, es decir cerca de la superficie, y aquellas expuestas a la fase líquida o a la interfase líquida/gaseosa. En las capas próximas a la superficie es donde las células podrían encontrar las mayores limitaciones nutricionales y las propiedades fisicoquímicas más desfavorables, conduciéndolas a una grave situación de estrés (26). Gracias al desarrollo de microelectrodos que permiten estudiar la concentración de oxígeno a distintos niveles de profundidad dentro de las microcolonias, se ha logrado determinar notorias limitación de oxígeno en la zona cercana a la base de las mismas (27). Los biofilms constituyen entonces un ambiente muy heterogéneo donde el comportamiento de la población varía pronunciadamente en el tiempo y en el espacio (28). En este sentido se ha reportado que en los biofilms se puede encontrar

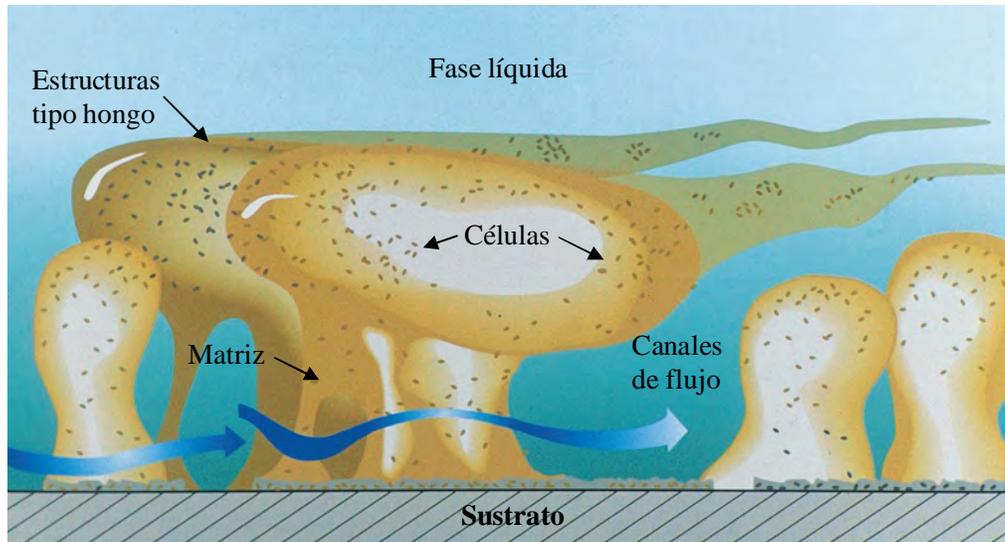


Fig. 3. Ilustración conceptual de un biofilm bacteriano en su estadio maduro. Se observan microcolonias que emergen desde la superficie del sustrato hacia el seno de la fase líquida. Estas microcolonias se componen de agregados celulares que se encuentran inmersos en una matriz extracelular que las mismas bacterias producen y secretan. Las microcolonias se encuentran delimitadas por canales de flujo a través de los cuales circulan nutrientes y productos metabólicos. (Ilustración adquirida del sitio web correspondiente al Centro de Ingeniería en Biofilms (Montana, EUA: <http://www.biofilm.montana.edu>).

una gran heterogeneidad de microambientes o microentornos: desde zonas bien aireadas y nutridas pero más expuestas a condiciones o agentes adversos, hasta otras escasamente nutridas y drenadas, con un metabolismo lento y fundamentalmente anaerobio, que se multiplican a muy baja velocidad (28-29). Se ha planteado que la diversidad de microentornos induce el surgimiento de diversos fenotipos dentro de una misma población bacteriana (30).

Se ha reportado que tanto la formación de estratos como los fenómenos de difusión están directamente relacionados con el espesor de los biofilms. Dicha propiedad se modifica con las condiciones de crecimiento como con el tipo y número de especies que componen la comunidad (31). Cultivos puros e independientes en biofilm de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* bajo condiciones de laboratorio mostraron un menor espesor que cuando ambas especies fueron cocultivadas, lo cual indica que entre ambas especies se genera un efecto sinérgico debido posiblemente a que una especie acrecienta la estabilidad de la otra (31).

El modo de organización en estratos que presentan las microcolonias es esencialmente la causa del nivel de heterogeneidad en las poblaciones sésiles. De igual manera se propuso que sería una de las razones por las cuales células en biofilm exhibirían un fenotipo diferencial respecto de células crecidas de manera planctónica (7). No obstante, en la actualidad existen

trabajos que cuestionan este concepto de la fisiología microbiana en biofilm y proponen la existencia de un fenotipo característico y exclusivo en células de biofilm, el cual dependería de la expresión de un conjunto específico de genes o de la activación de vías metabólicas particulares (32).

III.1.4- Regulación del desarrollo de biofilms

Muchos estudios experimentales plantean que el proceso de formación del biofilm está controlado por complejos sistemas o cascadas de reguladores. Posiblemente, el mecanismo de regulación más ampliamente conocido vinculado a la construcción y maduración de biofilms es el sistema de Quorum Sensing. Este es un mecanismo de comunicación celular dependiente de la densidad poblacional a través del cual las bacterias regulan la expresión de una gran variedad de genes relacionados con el control de diferentes procesos celulares. Este sistema de regulación bacteriano censa la densidad poblacional celular mediante la acumulación de moléculas señal. Cuando estas moléculas alcanzan una concentración umbral se desencadenan diversos procesos fisiológicos (33-34).

Además del mecanismo de Quórum Sensing, se ha demostrado que otros componentes regulatorios conocidos como *reguladores globales* son importantes para el desarrollo de biofilms bacterianos. Por ejemplo, en *P. aeruginosa* la proteína de represión de catabolito (Crc), que desempeña una función reguladora de importancia en el metabolismo de carbono, participaría también en la regulación del desarrollo de biofilm a través de la activación de la producción de fimbria tipo IV, que como se describió anteriormente participa en el desarrollo de microcolonias (35).

Por otro lado, *E. coli* produce el regulador de reserva de carbono, CsrA, el cual actúa tanto como un represor de la construcción de biofilms como un activador de la dispersión en una variedad de condiciones de cultivo (36). Asimismo, en este microorganismo otras moléculas como la proteína de membrana externa OmpR y el regulador maestro RpoS estarían implicadas en la formación de biofilm (37-38).

Diversos estudios han demostrado que el proceso de desarrollo de un biofilm se genera en respuesta a condiciones ambientales y por lo tanto que existen sistemas de fosfotransferencia de dos componentes que transfieren las señales ambientales al interior de las bacterias para regular de esta manera la expresión génica y adecuarla a la nueva situación ambiental. El sistema de dos componentes global GacA/GacS, que está bien conservado en una gran variedad de bacterias Gram negativas y regula metabolitos secundarios y factores de

virulencia en *Pseudomonas*, también participaría activamente en el desarrollo en biofilm de este género bacteriano (39).

En particular, se ha descrito que *P. aeruginosa* presenta un sistema denominado de tres componentes SadARS que participa tanto en la maduración del biofilm como en la virulencia de la bacteria a través del control de la expresión de genes que codifican componentes del sistema de secreción tipo III (40).

III.1.5- Impacto de los biofilms en el sector de salud

El reconocimiento por parte de microbiólogos clínicos que los biofilms son ubicuos en la naturaleza condujo al estudio e investigación de una gran cantidad de enfermedades infecciosas bajo la perspectiva de dicho modo de crecimiento. Según la Organización Mundial de la Salud las enfermedades infecciosas representan la segunda causa de mortalidad, después de las enfermedades cardiovasculares y generan el doble de muertes que el cáncer. Para el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos más del 60% de las infecciones son causadas por biofilms microbianos, asimismo se les atribuye un similar porcentaje de las infecciones hospitalarias (41), provocando un incremento de la permanencia en los nosocomios, la mortalidad y los costos de la atención. En la Tabla 1 se describen algunas infecciones humanas en las cuales están involucradas bacterias que se desarrollan formando biofilms.

Los biofilms son el origen de infecciones usualmente repetitivas del tracto urinario (causadas por *E. coli* y otros patógenos) (42), infecciones del oído medio en niños (provocadas por *Haemophilus influenzae*) (43), la formación de la placa bacteriana, la gingivitis y la periodontitis (causadas por *Streptococcus*, *Fusobacterium* y *Porphyromona*) que son capaces de generar la pérdida de los dientes (44-45) y la infección pulmonar en pacientes con fibrosis quística (causada por *P. aeruginosa* y *Burkholderia cepacia*) que puede destruir la función pulmonar adelantando la muerte del paciente (46-47). Asimismo, a las mencionadas infecciones se le agregan otras tantas generadas a partir de la contaminación microbiana de implantes quirúrgico u otros tipos de dispositivos médicos, como ser catéteres, colocados a los pacientes en ámbitos medico-asistenciales (Tabla 1) (48-49).

Varios estudios han indicado que entre los aspectos más destacados de los biofilms vinculados con el desarrollo de infecciones sobresalen su capacidad de alterar la respuesta inmune mediada por células y la respuesta humoral del hospedador, como también su resistencia a los tratamientos antibióticos convencionales (2-3). Esta última característica es la que mejor distingue a las infecciones crónicas asociadas con biofilms respecto a las

Tabla 1. Infecciones humanas en las que están implicados biofilms bacterianos

Infección o enfermedad	Especie microbiana formadora de biofilm
Caries dentales	Cocos Gram positivos (ej. <i>Streptococcus</i>)
Periodonitis	Bacterias anaeróbicas orales Gram negativas
Otitis media	Cepas de <i>Haemophilus influenzae</i>
Infecciones del músculo-esqueleto	Cocos Gram positivos (ej. <i>Staphylococcus</i>)
Fascitis necrotizante	<i>Streptococcus</i> Grupo A
Osteomielitis	Varias especies bacterianas y fúngicas
Prostatitis bacteriana	<i>E. coli</i> y otras bacterias Gram negativas
Endocarditis de la válvula nativa	<i>Streptococcus</i> del grupo viridans
Neumonía por fibrosis quística	<i>P. aeruginosa</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>
Mieloidosis	<i>P. pseudomallei</i>
<i>Infecciones hospitalarias</i>	
Neumonía (cuidados intensivos)	Bacilos Gram negativos
Suturas	<i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>S. Aureus</i>
Orificios de salida	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Vías arteriovenosas	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Lentes de contacto	<i>P. aeruginosa</i> y cocos Gram positivos
Cistitis por catéteres urinarios	<i>E. coli</i> y otros bacilos Gram negativos
Peritonitis por diálisis peritoneal	Variedad de bacterias y hongos
Dispositivo intra-uterino	<i>Actinomyces israeli</i> y muchos otros
Tubos endotraqueales	Variedad de bacterias y hongos
Catéteres centrales venosos	<i>S. epidermidis</i> y otros
Válvulas mecánicas del corazón	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Injertos vasculares	Cocos Gram positivos
Dispositivos ortopédicos	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>

Tabla adaptada del trabajo publicado por Lasa y col (2005).

infecciones agudas. Mientras que las infecciones agudas pueden ser eliminadas por medio de tratamientos con antibióticos, las infecciones por biofilms normalmente no consiguen ser completamente eliminadas, persistiendo en el hospedador y produciéndose episodios recurrentes. Esto ocurre probablemente debido a que las bacterias del biofilm pueden ser hasta 1000 veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en cultivos líquidos (50).

A continuación se detallan algunas hipótesis que han sido planteadas para explicar la resistencia bacteriana en biofilms:

1) La matriz producida y secretada por las bacterias sésiles actuaría como una barrera de difusión física y química previniendo la penetración de los antibióticos (41, 50). Asimismo, las matrices que generalmente se encuentran cargadas, funcionarían como resinas de

intercambio iónico las cuales serían capaces de unir a las moléculas grandes y con cargas correspondientes a los antibióticos que intentan alcanzar las células contenidas en ellas.

2) Enzimas capaces de degradar antibióticos como las β -lactamasas quedarían inmovilizadas en la matriz del biofilm, de manera tal que al difundir los antibióticos encontrarían en su camino a las enzimas atrapadas que los inactivarían con mayor efectividad (51).

3) El crecimiento de las bacterias, dentro de la estructura del biofilm, estaría disminuido debido a la limitación de nutrientes. Como consecuencia, los antibióticos serían menos efectivos ya que su actividad es mayor en células que se dividen rápidamente (41).

En ciertos casos el crecimiento lentificado estaría asociado a la expresión de factores de resistencia (50). Por ejemplo, en *E. coli* el lento crecimiento estaría relacionado con la inhibición de la síntesis de ciertos procesos anabólicos (52) y con el aumento de la resistencia a la autólisis (53).

4) Cambios fisiológicos asociados con la transición de las bacterias desde un estilo de vida planctónico a sésil y la aparición de un fenotipo específico de biofilm podrían promover el desarrollo de nuevos mecanismos de resistencia a los antibióticos. Por ejemplo, las células sésiles serían capaces de producir bombas con la especificidad de expulsar los antibióticos antes de que estos actúen, o incluso podrían dejar de expresar las moléculas blanco de los antibióticos (50).

5) Dentro de una población bacteriana surgen subpoblaciones con distintos genes que no son operativos mientras no se produce una eventualidad, la cual es superada luego de la activación de estos genes. Dichas eventualidades incluyen la aparición de un nuevo producto tóxico o la desaparición de un nutriente habitual. A los individuos de las subpoblaciones que en determinadas condiciones se convierten en únicos supervivientes, se les denomina persistores (54). El surgimiento de individuos persistores en una población bacteriana actúa como un mecanismo alternativo de resistencia bacteriana en biofilms (55).

III.1.6- Antecedentes del desarrollo en biofilm de *B. pertussis*

En nuestro grupo de trabajo se han llevado a cabo, desde hace varios años, diferentes investigaciones sobre el desarrollo en biofilm de *B. pertussis* empleando la cepa de referencia Tohama I y mutantes de dicha cepa deficientes en la expresión de factores de virulencia. A continuación se describen las principales características del crecimiento en biofilm de la mencionada cepa de referencia de *B. pertussis*.

III.1.6.1- Formación de biofilm por *B. pertussis*

A través de ensayos de adhesión realizados sobre soportes abióticos y sobre células epiteliales alveolares se logró determinar la capacidad de adhesión que presenta la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I (56). Estudios sobre la formación de biofilm de *B. pertussis* Tohama I, utilizando biorreactores tipo columna, rellenos con perlas de polipropileno, determinaron el desarrollo de biomasa sobre la superficie abiótica. Con el uso de estos sistemas de cultivo se comprobó la importancia de una apropiada provisión de aire, debido a que *B. pertussis* requiere de oxígeno para su crecimiento (56). Mediante técnicas de microscopía -óptica y de fluorescencia- se estudió el crecimiento de *B. pertussis* Tohama I en biofilms bajo condiciones de flujo continuo de nutrientes, comprobando que esta cepa es capaz de formar biofilms robustos siguiendo un patrón en etapas similar al que presenta la mayoría de los microorganismos. Este proceso se describe esquemáticamente en la Fig.4. En nuestras condiciones experimentales se ha establecido que una adhesión de 4 -5 horas es suficiente para alcanzar una adecuada adhesión. Recientemente se demostró que la adhesina FHA, desempeña una importante función en los procesos de adhesión inicial a superficie como así también en la formación de micro y macrocolonias durante la maduración del biofilm (57).

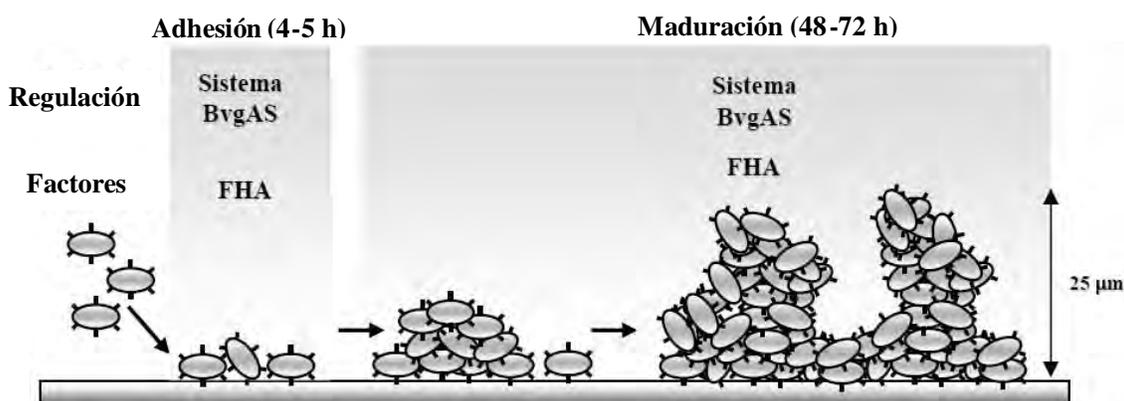


Fig. 4. Esquema del modelo de formación de biofilm sobre superficie abiótica para *B. pertussis* Tohama I. El proceso se inicia con la adhesión de células de *B. pertussis* a la superficie, y continúa con el desarrollo de agregados celulares con forma irregular, los cuales emergen de la superficie aumentando de tamaño con el tiempo. El sistema de dos componentes BvgAS estaría involucrado en la regulación de estos eventos, destacándose la función de la adhesina FHA en la etapa de adhesión como así también en la maduración del biofilm.

III.1.6.2- Fenotipo distintivo de *B. pertussis* en biofilm

Por medio de la combinación de la espectroscopía infrarroja y técnicas de proteómica se consiguió discriminar entre células sésiles y planctónicas de la cepa de referencia de *B.*

pertussis, determinando que las células sésiles presentan una fisiología distintiva en el biofilm maduro (57-58). Estos resultados son coincidentes con los reportados para otras bacterias formadoras de biofilm (59-61). Asimismo, se determinó que las células sésiles de *B. pertussis* Tohama I presentan respecto de las planctónicas, un aumento en su contenido de polisacáridos, lo cual podría asociarse con la formación de la matriz polimérica extracelular (57-58). Esta matriz estaría compuesta, además de polisacáridos, por proteínas, LPS y DNA, constituyendo así un importante factor para la virulencia de este patógeno. Cabe mencionar que la relación entre la formación de biofilm, el incremento en la síntesis de polisacáridos y el desarrollo de una matriz de componentes extracelulares ha sido demostrada para una gran variedad de bacterias (19, 62).

III.1.7- Objetivos del capítulo

Teniendo en cuenta que en estos últimos años se han determinado diferencias genéticas entre aislados clínicos y cepas vacunales de *B. pertussis* (63-64) y que mediante espectroscopía FT-IR hemos logrado diferenciar fenotípicamente aislados clínicos circulantes respecto de cepas de referencia de *B. pertussis*, decidimos analizar si los aislados circulantes locales se comportaban diferencialmente en cuanto a adhesión y formación de biofilm respecto de cepas de referencia. Con este objetivo nos propusimos:

- i) Analizar la cinética de crecimiento de la cepa de referencia Tohama I y de aislados clínicos de *B. pertussis* bajo condiciones de cultivo *batch*.
- ii) Determinar la cinética de adhesión a superficies abióticas por parte de la cepa Tohama I y aislados circulantes de *B. pertussis*.
- iii) Estudiar comparativamente la adhesión de la cepa Tohama I y aislados circulantes de *B. pertussis*, examinando también el efecto de la modulación fenotípica.
- iv) Analizar la formación de biofilms para la cepa de referencia y 3 aislados clínicos de *B. pertussis*, empleando un sistema de cultivo *batch* con recambio de medio y un sistema de cultivo con flujo continuo de nutrientes.
- v) Analizar los perfiles electroforéticos proteicos, de células crecidas bajo condiciones planctónicas y en biofilm, correspondientes a la cepa de referencia Tohama I y a un aislado clínico de *B. pertussis*.
- vi) Estudiar la composición macromolecular de las células planctónicas y sésiles pertenecientes a la cepa Tohama I y a un aislado clínico de *B. pertussis*, mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier.

III.2- MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1- Microorganismos y condiciones de cultivo

III.2.1.1- *Cepas bacterianas*

En estos trabajos se utilizaron la cepa de referencia de *Bordetella pertussis* Tohama I (Instituto Pasteur, Paris, Francia) y 18 aislados clínicos de *B. pertussis* provenientes del Hospital de Niños Sor María Ludovica (La Plata). Los aislados fueron identificados por el mencionado hospital tal como se indicó en la sección II.2.1.1. En algunos casos la identificación fue confirmada por el grupo del Laboratorio Bordetelles del Instituto Pasteur de Paris, Francia.

III.2.1.2- *Condiciones de crecimiento*

Cultivos stocks de los distintos aislamientos clínicos y de la cepa de referencia de *B. pertussis* se mantuvieron a -80°C en medio líquido sintético Stainer-Scholte (SS) suplementado con 20% (v v⁻¹) de glicerol. Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas con agar Bordet-Gengou suplementadas con 1% (p v⁻¹) de Bactopeptona y 14% (v v⁻¹) de sangre de carnero desfibrinada (ABGs) e incubando durante 72 h a 37°C . Con el objeto de activar los cultivos se llevaron a cabo repiques en placas con ABGs incubando a 37°C durante 48 h. Los cultivos planctónicos se iniciaron a partir de células cosechadas de placas con ABGs, las cuales fueron transferidas a frascos Erlenmeyer conteniendo medio líquido SS (composición descrita en la sección II.2.1.2). Los frascos se incubaron a 37°C en agitación (160 rpm).

III.2.2- Cinética de crecimiento

Con el fin de estudiar y comparar las cinéticas de crecimiento en medio líquido de la cepa de referencia Tohama I y la de los aislados clínicos de *B. pertussis*, se analizaron las mismas bajo idénticas condiciones experimentales en cultivos *batch*. Cultivos de la cepa Tohama I y de 3 aislados clínicos fueron llevados a cabo en frascos Erlenmeyer de 1 L conteniendo 200 ml del medio SS, ajustando la densidad óptica inicial a 0,20. Los frascos se incubaron a 37°C en un *shaker* orbital con una agitación de 160 rpm. Alícuotas de 1 ml fueron tomadas de los cultivos a distintos tiempos durante un período de 48 h. Posteriormente se determinó la densidad óptica de las muestras a una longitud de onda de 650 nm (DO_{650}), con un espectrofotómetro Beckman DU 640 (California, EUA). A partir de los valores de densidad

óptica se construyeron las curvas de crecimiento de la cepa Tohama I y aislados clínicos analizados.

III.2.3- Ensayos para análisis de adhesión

III.2.3.1- *Cinética de adhesión a superficie abiótica*

A efectos de estudiar la adhesión a superficie abiótica de manera comparativa entre la cepa de referencia Tohama I y aislados clínicos de *B. pertussis*, fue necesario establecer en primer lugar la cinética de adhesión de estos organismos. Este análisis se efectuó con la cepa de referencia y un aislado clínico de *B. pertussis* empleando como soporte perlas de polipropileno (Petroken S.A., Argentina) de 4,2 mm de diámetro, 2 mm de altura y con una densidad promedio de 0,90. Dicho material fue utilizado como soporte por ser una apropiada alternativa a los sistemas biológicos como son las células, tal como se demostró previamente en el laboratorio. Cultivos líquidos en fase exponencial (18 h de crecimiento) de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953, a los cuales se les ajustó la DO_{650} a 1 con medio líquido SS, fueron utilizados para inocular asepticamente tubos de ensayo conteniendo perlas de polipropileno (2 g). Los tubos se incubaron en estufa a 37°C de manera estática durante 7 h para permitir de este modo la adhesión a la superficie del sustrato. A intervalos de 1 h de incubación se descartó el sobrenadante de los tubos y se procedió a lavar las perlas suavemente en 2 oportunidades con buffer fosfato salino (PBS), a fin de remover las células no adheridas. La biomasa de células adheridas sobre el soporte se fijó mediante incubación de los tubos en estufa a 60°C durante 1 h, para luego transferir las perlas a tubos limpios. La cantidad de biomasa adherida sobre las perlas se cuantificó de manera indirecta siguiendo el protocolo de tinción con el colorante Cristal Violeta (CV) descrito por O' Toole y col (65), con ciertas modificaciones. Brevemente, se agregó a cada tubo 4 ml de solución acuosa de CV 0,1% (p v⁻¹) (Merck, Darmstadt, Alemania) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente para permitir la coloración de las células adheridas. A continuación se removió el exceso de colorante a través de lavados con buffer PBS. Con el fin de eluir el colorante incorporado por las células se agregó a cada tubo 12 ml de solución decolorante compuesta por etanol/acetona (80:20 v v⁻¹). Luego de una incubación de 20 min a temperatura ambiente, se agitaron suavemente los tubos para lograr la homogenización del colorante removido y finalmente determinar su absorbancia mediante espectrofotometría a 590 nm (Abs₅₉₀). A través de los valores de Abs₅₉₀ se expresó la cantidad de biomasa adherida para las muestras en estudio.

III.2.3.2- Análisis comparativo de adhesión

El proceso de adhesión a superficie abiótica fue evaluado comparativamente entre la cepa de referencia Tohama I y 18 aislados clínicos de *B. pertussis*. Para esta determinación se utilizaron cultivos líquidos en fase exponencial (18 h de incubación) a los cuales se les ajustó la DO_{650} a 1 con medio SS. Estos cultivos se emplearon para inocular, de manera aséptica, tubos de ensayos conteniendo perlas de polipropileno (2 g) incubando de modo estático y en estufa a 37°C durante 5 h. Posteriormente se removió el sobrenadante, se lavaron suavemente las perlas con buffer PBS y se fijaron las células a las perlas mediante incubación a 60°C durante 1 h. Seguidamente se transfirieron las perlas a tubos de ensayo limpios para cuantificar la biomasa adherida por medio del método de tinción con CV.

III.2.3.3- Adhesión bajo condiciones de no crecimiento

La adhesión a superficie abiótica fue analizada asimismo bajo condiciones de no crecimiento celular, empleando la cepa de referencia Tohama I y 3 aislados clínicos. Cultivos líquidos en fase exponencial (18 h de crecimiento) de dicha cepa y aislados clínicos, a los cuales se les ajustó la DO_{650} a 1, fueron centrifugados a 6000 xg durante 20 min y sus células lavadas con PBS. Luego de repetir la etapa de centrifugación y lavado, los pelets celulares fueron resuspendidos en un volumen de PBS igual al volumen correspondiente del cultivo inicial. Dichas suspensiones de bacterias se utilizaron para la inoculación de perlas de polipropileno (2 g) contenidas en tubos de ensayos. Luego de 5 h de incubación de manera estática y a 37°C, se eliminó el sobrenadante y se lavaron las perlas con PBS. Las células adheridas a la superficie de las perlas se fijaron por calor para luego transferir las mismas a tubos limpios. Finalmente, la evaluación de la biomasa adherida se realizó indirectamente mediante el procedimiento de tinción con CV. La adhesión a superficie fue evaluada asimismo con la cepa Tohama I y los 3 aislados clínicos, bajo las condiciones de crecimiento detalladas en la sección anterior y de este modo realizar una comparación con los resultados derivados de ambas condiciones.

III.2.3.4- Adhesión bajo condiciones de modulación

El proceso de adhesión a superficie abiótica de la cepa Tohama I y aislados clínicos de *B. pertussis* fue estudiado bajo condiciones de modulación en fase avirulenta (fase Bvg-). Para tal fin, dicha cepa de referencia y 3 aislados clínicos fueron repicados sucesivamente en medio ABGs suplementado con 40 mM de $MgSO_4$, incubando las placas a 37°C durante

48 h. La modulación provoca en *B. pertussis* la inhibición de la expresión de factores de virulencia. La expresión de la enzima Adenilato Ciclasa-Hemolisina (el primer antígeno cuya expresión se inhibe en el cambio a fase avirulenta) fue utilizada como marcador de virulencia en el análisis de la presencia del halo de hemólisis en el medio ABGs. Bacterias moduladas fueron empleadas para inocular medio SS suplementado con 40 mM de MgSO₄, contenido en frascos Erlenmeyer, los cuales fueron incubados a 37°C durante 18 h. Luego, los cultivos líquidos, a los cuales se les ajustó la DO₆₅₀ a 1, se utilizaron para inocular tubos de ensayo conteniendo perlas de polipropileno (2 g), los que fueron incubados durante 5 h en forma estática a 37°C. Seguidamente se descartó el sobrenadante de los tubos para lavar las perlas con PBS. La biomasa adherida se fijó por calor para finalmente transferir las perlas a tubos limpios y evaluar la adhesión a través del método de tinción con CV. La adherencia a superficie fue evaluada asimismo con la cepa Tohama I y los 3 aislados clínicos, bajo las condiciones de crecimiento detalladas en la sección III.2.3.2 y de esta forma llevar a cabo una comparación con los resultados obtenidos a partir de ambas condiciones.

Todos los estudios de adhesión a superficie abiótica fueron realizados por triplicado y en 3 experimentos independientes.

III.2.4- Ensayos para el análisis de la formación de biofilm

La formación de biofilm por la cepa de referencia Tohama I y 3 aislados clínicos de *B. pertussis* fue analizada comparativamente por medio de 2 sistemas de cultivo en columna: el sistema de cultivo *batch* con recambio de medio y el sistema de cultivo con flujo continuo de nutrientes. En ambos sistemas de cultivo se utilizaron perlas de polipropileno como soporte abiótico para la formación de biofilm.

III.2.4.1- Sistema de cultivo *batch* con recambio de medio

El sistema de cultivo *batch* bajo condiciones de recambio de nutrientes (sistema semi-continuo) se basó en un dispositivo descrito previamente por Bosch y col (56), con algunas modificaciones. Brevemente, el sistema consistió en una columna de vidrio (IVA S.AC.I.F.I., Argentina) de 3 cm de diámetro y 20 cm de altura, conteniendo 15 g de perlas de polipropileno. La columna (biorreactor) se conectó a través de un tubo de silicona a un frasco Erlenmeyer de 0,5 L, el cual cumplió la función de reservorio del inóculo y del medio de cultivo fresco. Asimismo, la columna dispuso de un tubo de silicona acoplado a un filtro para ser conectada a un aireador, aportando de esta manera aire estéril al cultivo. El sistema

de cultivo completo incluyendo la columna, el frasco reservorio y las distintas conexiones, se esterilizó por vapor (120°C, 20 min). La Figura 5 muestra 4 biorreactores junto con sus accesorios, utilizados para el desarrollo de biofilms con recambio de medio de cultivo. Para la inoculación de cada columna se utilizaron 30 ml de cultivo planctónico en fase exponencial, al cual se le ajustó la DO_{650} a 1 con medio SS. A fin de permitir la adhesión de las bacterias al soporte, las columnas se incubaron de manera estática y en posición vertical en un cuarto estufa a 37°C durante 5 h. Seguidamente, se llevó a cabo el drenado de las suspensiones de bacterias no adheridas y se agregó de manera aséptica medio SS fresco. Los biorreactores se incubaron aeróbicamente ($0,1 \text{ L min}^{-1}$) a la misma temperatura, y cada período de 24 h el medio SS agotado fue reemplazado asépticamente por medio fresco. El biofilm desarrollado sobre las perlas fue cuantificado a las 24, 48, 72 y 96 h de incubación. Para tal objeto, luego de cada período de tiempo se procedió a descartar el medio de cultivo agotado de un biorreactor, drenando el mismo por el extremo inferior de la columna. Las perlas fueron lavadas, 2 veces, con buffer PBS con el objeto de eliminar las células no adheridas. A continuación se transfirieron 2 g de perlas a 5 tubos de ensayo para luego ser incubados a 60°C durante 1 h con el objeto de fijar el biofilm a la superficie. Finalmente se determinó la biomasa adherida mediante el procedimiento de tinción con CV, detallado en los ensayos anteriores. Este estudio se efectuó mediante 3 experimentos independientes utilizando la cepa de referencia Tohama I y 3 aislados clínicos.

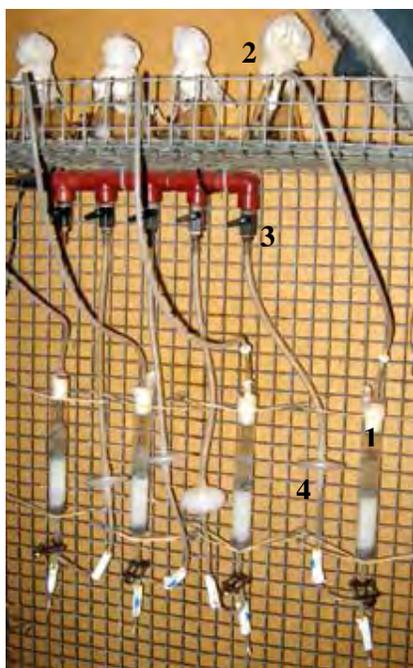


Fig. 5. Sistema de cultivo *batch* con recambio de nutrientes. Imagen de 4 biorreactores tipo columna rellenos con perlas de polipropileno, junto con sus accesorios, utilizados para el estudio de la formación de biofilm bajo condiciones de recambio del medio de cultivo. Las columnas de vidrio conteniendo el soporte abiótico (1) se conectan por medio de tubos de silicona a frascos Erlenmeyer (2), los cuales almacenan el inóculo y el medio de cultivo fresco. Un sistema de aireación (3) aportó aire a cada columna, a través de tubos de silicona acoplados a filtros estériles (4).

III.2.4.2- Sistema de cultivo con flujo continuo de nutrientes

El sistema de cultivo para el desarrollo de biofilm bajo condiciones de flujo continuo de nutrientes, consistió en una columna de vidrio (IVA S.A.C.I.F.I.) de 3 cm de diámetro y 20 cm de altura conteniendo 15 g de perlas de polipropileno. La columna (biorreactor) se conectó por un extremo y por medio de tubos de silicona, a un frasco Erlenmeyer de 250 ml, que cumplió la función de reservorio del inóculo, y a un recipiente de 1 L, el cual almacenó el medio de cultivo fresco. A su vez, este recipiente se conectó mediante un tubo de silicona acoplado a un filtro, a un aireador con el fin de aportar de este modo aire estéril al medio de cultivo fresco. Por el otro extremo el biorreactor fue conectado a un Erlenmeyer de 0,5 L utilizado como reservorio del medio de cultivo agotado (Figura 6). El sistema de cultivo completo fue esterilizado por vapor. Este sistema se completó con una bomba peristáltica (APEMA S.R.L., Argentina) para permitir la circulación del medio de cultivo a través de la columna. El biorreactor fue inoculado con 50 ml de un cultivo planctónico en fase exponencial, al cual se le ajustó la DO_{650} a 1 con medio SS. Luego el biorreactor fue incubado de manera estática y en posición horizontal en el cuarto estufa a 37°C durante 5 h, para permitir de esta manera la adhesión de las células a las perlas. Posteriormente se drenó

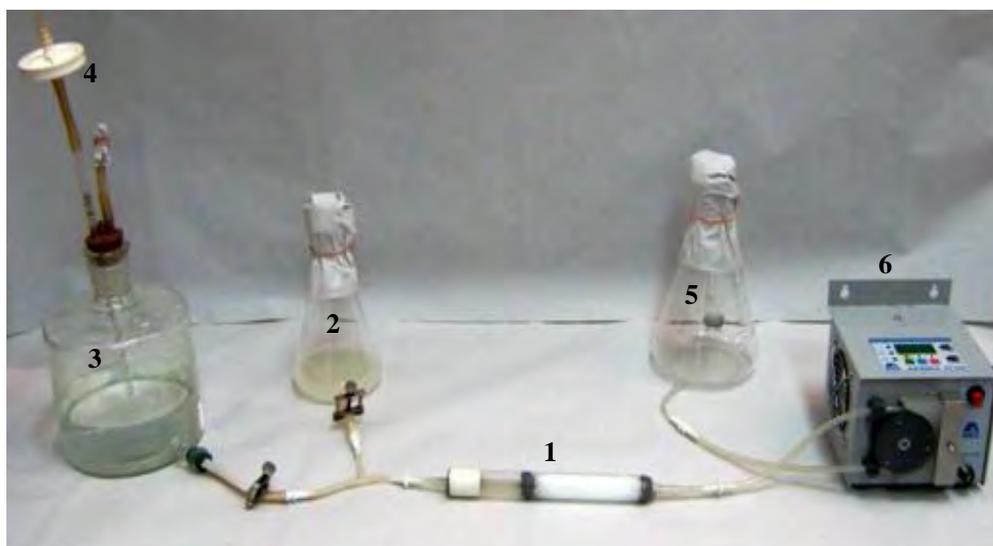


Fig. 6. Sistema de cultivo con flujo continuo de nutrientes. Biorreactor tipo columna, junto con sus accesorios, empleado para el desarrollo de biofilm con flujo constante de nutrientes. La columna de vidrio conteniendo perlas de polipropileno (1) se conectó por medio de un tubo de silicona a un frasco Erlenmeyer de 250 ml (2), cumpliendo la función de reservorio del inóculo, y a un recipiente de 1 L, para almacenar el medio de cultivo fresco (3). A este recipiente se le acopló un aireador, a través de un tubo de silicona con filtro (4), aportando aire estéril al medio fresco. Por el otro extremo la columna se conectó a un Erlenmeyer de 0,5 L utilizado como reservorio del medio de cultivo agotado (5). La bomba peristáltica (6) permitió la circulación de medio de cultivo a través de la columna.

la suspensión de células no adheridas y se inició la circulación de medio SS fresco a través de la columna, por acción de la bomba peristáltica a una velocidad constante de 1 ml h^{-1} . El medio de cultivo fresco contenido en el reservorio se mantuvo bajo condiciones de aireación estéril y constante ($0,1 \text{ L min}^{-1}$) mientras que el sistema completo de cultivo se conservó a 37°C . De este modo se consiguió un flujo continuo de nutrientes a través del relleno de la columna con el biofilm en crecimiento sobre las perlas de polipropileno. La cantidad de biomasa adherida al soporte abiótico fue determinada a las 36 y 72 h de iniciado el cultivo. Para tal objeto, luego de cada período de tiempo mencionado se detuvo la circulación del medio fresco, se drenó el medio de cultivo contenido en la columna y se procedió a lavar las perlas mediante circulación suave de PBS por acción de la bomba peristáltica. *A posteriori*, se transfirieron 2 g de perlas a 5 tubos de ensayo para luego fijar el biofilm adherido por calor. Finalmente se realizó la cuantificación del biofilm mediante el método de coloración con CV. Este estudio se realizó a través de 2 experimentos independientes con la cepa de referencia y 2 aislados clínicos.

III.2.5- Electroforesis SDS-PAGE de células enteras

Teniendo en cuenta el rol fundamental que desempeñan ciertas proteínas en el crecimiento en biofilm de la bacteria, se realizó un análisis comparativo de los perfiles proteicos de células enteras de la cepa de referencia Tohama I y del aislado clínico Bp 953 de *B. pertussis* crecidas en biofilm (células sésiles) y en forma planctónica, mediante electroforesis en geles de poliácridamida (SDS-PAGE) siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (66).

III.2.5.1- Obtención de células sésiles

Para el crecimiento de células en forma de biofilms se empleó un sistema de cultivo *batch* en columna con recambio de medio similar al descrito en la sección III.2.4.1, utilizando en este caso una columna de vidrio de 6 cm de diámetro y 25 cm de largo conteniendo 120 g de perlas de polipropileno. La Figura 7 muestra el biorreactor tipo columna empleado en la producción de biofilm para el posterior análisis de células sésiles. El biorreactor conteniendo el soporte abiótico fue inoculado con 200 ml de un cultivo planctónico en fase exponencial ($\text{DO}_{650}=1$), incubándose en posición vertical a 37°C durante 5 h, para permitir la adhesión de las bacterias al soporte. Luego, la suspensión fue drenada para remover las células no adheridas y se agregó asépticamente 200 ml de medio SS fresco. Seguidamente, el biorreactor se incubó de forma aeróbica ($0,1 \text{ L min}^{-1}$) durante 72 h y a la misma temperatura,

reemplazando el medio de cultivo cada 24 h por medio SS fresco. Luego del período de incubación, las perlas fueron suavemente lavadas 2 veces con H₂O destilada a fin de remover cualquier componente remanente del medio de cultivo. Posteriormente, las perlas lavadas se transfirieron a un Erlenmeyer de 0,5 L, conteniendo 100 ml de H₂O destilada, para ser agitadas durante 30 min a 150 rpm, logrando de este modo el desprendimiento del biofilm de la superficie del soporte. A continuación se separaron las perlas por medio de una gasa con el fin de disponer de la biomasa del biofilm desadherido. La suspensión con el biofilm fue centrifugada a 6000 xg durante 20 min a 15°C, para luego separar el pelet celular del sobrenadante. Seguidamente, el pelet celular fue lavado 2 veces con agua destilada y resuspendido en H₂O destilada ajustándose la DO₆₅₀ a un valor de 10. Este procedimiento de cultivo en biofilm se realizó en 3 experimentos independientes con la cepa de referencia Tohama I y el aislado clínico Bp 953, para obtener replicados de las células sésiles.



Fig. 7. Biorreactor tipo columna relleno con perlas de polipropileno junto con sus accesorios. El sistema de cultivo *batch* con recambio de nutrientes fue utilizado con el objeto de producir células sésiles para ser analizadas mediante espectroscopia FT-IR. El sistema de cultivo se conformó por una columna de vidrio conteniendo el soporte abiótico (1), conectada por medio de un tubo de silicona a un frasco Erlenmeyer (2), el cual almacenó el inóculo y el medio de cultivo fresco. Un aireador aportó aire fresco estéril a la columna, a través de un tubo de silicona acoplado a un filtro (3). El medio de cultivo agotado se eliminó a través de un desagote ubicado en el extremo inferior de la columna (4).

III.2.5.2- Obtención de células planctónicas

Cultivos líquidos se iniciaron a partir de células cosechadas de placas ABGs, las cuales fueron transferidas a frascos Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 30 ml de medio de cultivo

SS. Los frascos se incubaron a 37°C con agitación (160 rpm) durante 48 h para luego centrifugar los cultivos a 6000 xg durante 20 min a 15°C. Los pelets celulares fueron lavados 2 veces con agua destilada con el objeto de eliminar componentes remanentes del medio de cultivo. Las células planctónicas se resuspendieron en H₂O destilada ajustando la DO₆₅₀ a un valor de 10. Estos cultivos se realizaron en 2 experimentos independientes utilizando la cepa de referencia Tohama I y el aislado clínico Bp 953, con el objeto de obtener replicados de células planctónicas.

III.2.5.3- Análisis por SDS-PAGE

Las suspensiones de células planctónicas y sésiles de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953, fueron mezcladas en volúmenes iguales con buffer de siembra (2X) y con β-Mercaptoetanol 8% (v v⁻¹). Luego, las mezclas se sometieron a una temperatura de 100°C y se sonicaron en baño de agua a 35°C durante 10 min. Finalmente, las mezclas fueron centrifugadas para eliminar componentes insolubles y así facilitar la separación electroforética de las proteínas. Las muestras fueron analizadas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 12,5%, realizando las corrida electroforética con un amperaje constante de 0,04 amperes. Posteriormente a la corrida electroforética, las bandas en los geles fueron fijadas con una solución de etanol/acetona y luego teñidas con Coomassie blue R250 para su visualización. Una mezcla de estándares de proteínas fue sembrada en el gel de poliacrilamida para disponer de marcadores de peso molecular.

III.2.6- Análisis por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

Células sésiles y planctónicas correspondientes a la cepa de referencia y a un aislado clínico de *B. pertussis*, fueron analizadas comparativamente mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) siguiendo el procedimiento descripto por Naumann y col (67) y Serra y col (57), con algunas modificaciones.

III.2.6.1- Preparación de muestras de células sésiles

Células sésiles fueron obtenidas a partir de biofilms crecidos durante 72 h sobre polipropileno, utilizando el sistema de cultivo *batch* con recambio de medio descripto en la sección III.2.5.1. De esta manera, una suspensión de células sésiles desadheridas fue centrifugada a 6000 xg durante 20 min, para luego lavar el pelet celular y resuspenderlo en H₂O destilada ajustándose la DO₆₅₀ a un valor de 10. Cien microlitos de esta suspensión

celular fueron transferidos a celdas ópticas de ZnSe, para luego ser secadas por vacío (3-6 KPa) hasta obtener una fina película transparente sobre la superficie de las celdas. Este procedimiento de cultivo en biofilm, se realizó en 3 experimentos independientes utilizando la cepa Tohama I y el aislado clínico Bp 953 para obtener replicados de células sésiles.

III.2.6.2- Preparación de muestras de células planctónicas

Células planctónicas se obtuvieron a partir de cultivos líquidos tal como fue detallado en la sección III.2.5.2. De este modo, los cultivos líquidos fueron centrifugados a 6000 xg durante 20 min, para luego lavar y resuspender el pelet en H₂O destilada ajustándose la DO₆₅₀ a un valor de 10. Cien microlitos de esta suspensión fueron transferidos a celdas ópticas de ZnSe y posteriormente secados por vacío hasta obtener una delgada película sobre la superficie. Este procedimiento de cultivo se realizó en 3 experimentos independientes con Tohama I y Bp 953, obteniendo así replicados de células planctónicas.

III.2.6.3- Espectroscopía FT-IR de células planctónicas y sésiles

Los análisis por espectroscopía FT-IR de las células enteras crecidas bajo condiciones de cultivo planctónico y en biofilm se realizaron empleando el espectrofotómetro Spectrum One (Perkin-Elmer, EUA), siguiendo básicamente el procedimiento descrito por Naumann y col (67) y Serra y col (57). Brevemente, los espectros de absorbancia IR de las distintas muestras fueron adquiridos en el intervalo de lectura de 4000 a 650 cm⁻¹ y con una velocidad de medición de 1cm seg⁻¹, realizándose 64 escaneos por espectro y empleando una resolución de 6 cm⁻¹. Estos parámetros fueron ajustados por medio del programa Spectrum 3.0 (Perkin-Elmer, USA). Previo al análisis, los espectros IR fueron sometidos a la prueba de calidad, corrección de la línea de base, normalización vectorial en el rango completo de número de onda y obtención de las derivadas de los espectros empleando el programa OPUS 4.2 (Bruker Optics).

III.2.6.4- Método estadístico multivariado aplicado al análisis de espectros IR

Con el fin de diferenciar fenotípicamente células sésiles y planctónicas de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953, espectros infrarrojos de dichas poblaciones fueron sometidos a un análisis estadístico multivariado. Este estudio se llevó a cabo aplicando el método de Análisis Jerárquico de Cluster considerando las regiones espectrales comprendidas entre 3000-2820 y 1800-750 cm⁻¹. Cabe destacar que estas regiones incluyen las bandas de

absorción IR de las principales macromoléculas: proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. El Análisis de Cluster se llevó a cabo empleando el coeficiente de Pearson, como medida de distancia espectral, y el algoritmo de Ward para la construcción de los clusters que constituyen el dendrograma (67), a través de la utilización del programa OPUS 4.2. Por medio del dendrograma construido se examinó la heterogeneidad entre las muestras en estudio.

III.2.6.5- Estudio de la composición macromolecular de células planctónicas y sésiles

Se realizó un análisis cualitativo y semi-cuantitativo de la composición macromolecular de células de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953 cultivadas bajo condiciones de crecimiento planctónico y en biofilm, a partir de los espectros adquiridos por espectroscopía FT-IR. El estudio cualitativo se realizó mediante la examinación de los espectros FT-IR de las distintas poblaciones celulares, en las zonas de absorción correspondientes a proteínas, lípidos y carbohidratos. Para efectuar el estudio semi-cuantitativo, se llevó a cabo el cálculo de las áreas pertenecientes a las bandas de absorción de los lípidos ($3000-2820\text{ cm}^{-1}$), proteínas (Amida II: $1590-1485\text{ cm}^{-1}$), ácidos nucleicos ($1250-1220\text{ cm}^{-1}$) y carbohidratos ($1150-985\text{ cm}^{-1}$), obtenidas a partir de los espectros IR. Esta determinación se realizó a través de la aplicación del programa OPUS 4.2.

III.3- RESULTADOS

III.3.1- Cinética de crecimiento en cultivo líquido

Se evaluaron las diferencias de comportamiento en cuanto a cinética de crecimiento en cultivo líquido SS en sistema *batch* entre la cepa de referencia Tohama I y 3 aislados clínicos de *B. pertussis*, Bp 892, Bp 953 y Bp 2751 (Fig. 8). Por medio de las curvas de crecimiento obtenidas se determinó que, a partir de las 14 h de incubación, los 3 aislados clínicos analizados alcanzan valores de DO_{650} significativamente mayores a los obtenidos por la cepa Tohama I (Fig. 8). Esto indica que dichos aislamientos clínicos seleccionados de *B. pertussis* desarrollan niveles superiores de biomasa comparativamente a Tohama I, bajo las mismas condiciones experimentales. En la fase estacionaria del crecimiento los aislados clínicos examinados exhibieron valores de biomasa 1,5 a 1,7 veces superiores respecto al obtenido por la cepa de referencia. Asimismo, se calculó el logaritmo natural de los valores de DO_{650} para graficarlos en función del tiempo de incubación (gráficos no mostrados). A partir de estos gráficos se determinó la ecuación de la recta cuyo valor de la pendiente corresponde a la velocidad específica de crecimiento (μ). Este parámetro se utilizó para el cálculo del tiempo de duplicación o tiempo generacional de las muestras analizadas. De esta manera se determinó que los aislados clínicos ensayados crecen con una velocidad específica

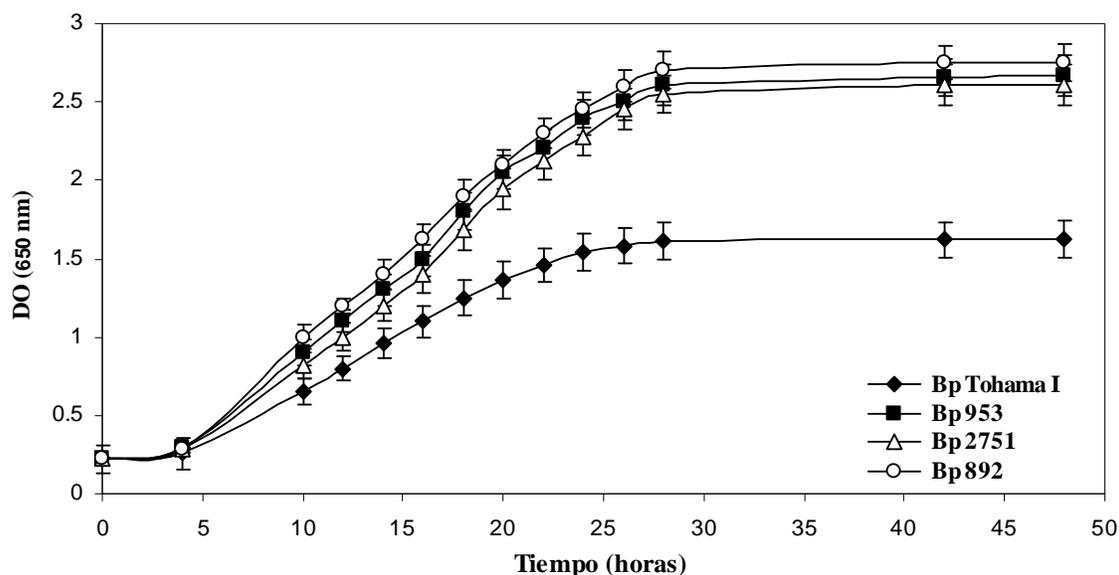


Fig. 8. Curvas de crecimiento de la cepa de referencia Tohama I y de 3 aislados clínicos de *B. pertussis*. Los valores de densidad óptica a 650 nm (DO_{650}) de las alícuotas obtenidas a distintos tiempos de incubación de cultivos líquidos pertenecientes a la cepa Tohama I y a los aislados clínicos de *B. pertussis* Bp 892, Bp 953 y Bp 2751, fueron utilizados para la construcción de las curvas de crecimiento: DO_{650} vs tiempo de incubación.

de crecimiento notoriamente superior que la correspondiente a la cepa Tohama I.

Los valores de μ permitieron establecer, en consecuencia, que los tiempos de duplicación de los aislamientos son inferiores al exhibido por la cepa de referencia, bajo las condiciones de cultivo líquido. En la Tabla 2 se detallan los valores de velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación para la cepa de referencia Tohama I y aislados clínicos mencionados.

Tabla 2. Valores de velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación de la cepa Tohama I y aislados clínicos de *B. pertussis* creciendo en el medio líquido Stainer-Scholte

Cepa o aislado clínico	Velocidad Específica de Crecimiento (h^{-1})	Tiempo de Duplicación (horas)
Bp Tohama I	0,052	13,3
Bp 953	0,091	7,6
Bp 2751	0,093	7,5
Bp 892	0,090	7,7

Los valores de velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación se determinaron por medio de los gráficos construidos a partir del logaritmo natural de las DO_{650} en función del tiempo de incubación de las alícuotas adquiridas para la cepa Tohama I y los aislados clínicos estudiados.

III.3.2- Análisis de la adhesión a superficie

III.3.2.1- Cinética de adhesión a superficie abiótica

Los estudios de adhesión a superficies abióticas llevados a cabo de modo comparativo entre la cepa de referencia Tohama I y aislados clínicos de *B. pertussis*, implicaron examinar previamente su cinética de adhesión durante las primeras horas de crecimiento en superficie. Este análisis se realizó con la mencionada cepa de referencia y un aislado clínico (Bp 953), utilizando perlas de polipropileno como soporte, tal como se explicó en la sección III.2.3.1. Como se observa en la Figura 9 el aislado clínico Bp 953 presentó una mayor adhesión sobre la superficie abiótica en comparación con el exhibido por la cepa Tohama I, durante las 7 h de incubación estática a 37°C. Este resultado se evidenció a través de la mayor cantidad de biomasa adherida por el aislado Bp 953 en cada punto analizado del período de incubación, comparativamente con la cepa de referencia.

Asimismo, el estudio de cinética de adhesión a superficie manifestó que tanto la cepa de referencia Tohama I como el aislado clínico Bp 953 alcanzan el máximo de biomasa adherida a las 5 h de incubación a 37°C (Fig. 9). Debido a que este período de tiempo es

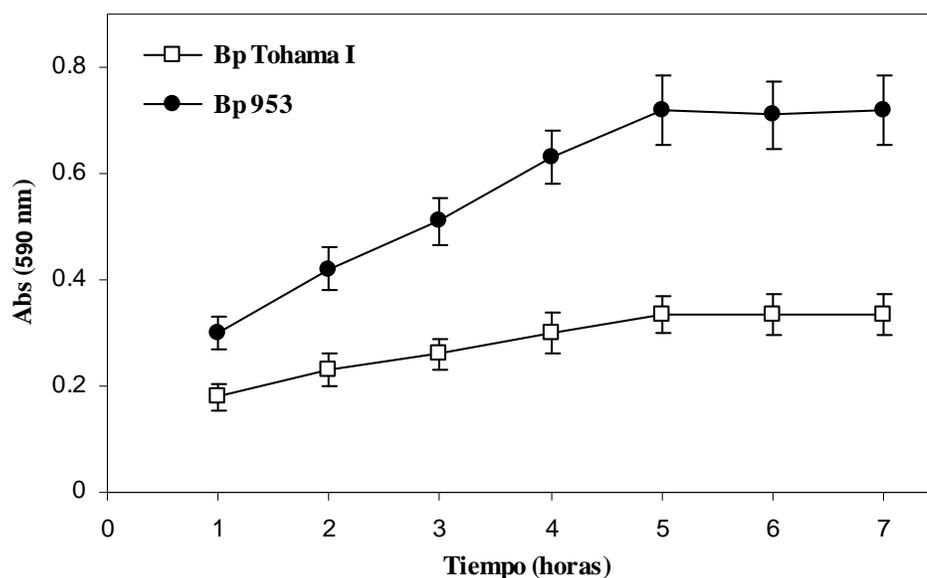


Fig. 9. Cinética de adhesión a superficie abiótica de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953 de *B. pertussis*. El estudio de cinética de adhesión fue realizado utilizando como soporte perlas de polipropileno. Este análisis permitió determinar que la cepa de referencia Tohama I y el aislado clínico Bp 953 consiguen el máximo de biomasa adherida a las 5 h de incubación. Los datos corresponden a promedios \pm desviaciones estándares de valores de Abs_{590} adquiridos a partir de tres experimentos independientes.

menor que el tiempo de duplicación determinado para la cepa Tohama I como así también para el aislado clínico analizado, se consiguió demostrar que la adhesión a superficie (primera etapa de la formación de biofilms) es independiente de la velocidad de crecimiento y por lo tanto dicho proceso no se vería influenciado por el crecimiento de las células sobre el soporte.

Del mismo modo, la Figura 9 muestra que a partir de las 3 h de iniciado el evento de adhesión, la cantidad de biomasa adherida para el aislado Bp 953 reveló valores entre 2 y 2,3 veces superiores a los correspondientes a la cepa Tohama I.

En la Figura 10 se puede observar la biomasa adherida, luego de 5 h de incubación, a perlas de polipropileno tanto para la cepa de referencia Tohama I como del aislado clínico Bp 953. La biomasa fue teñida con una solución de cristal violeta (0,1%). La absorbancia, calculada mediante espectrofotometría a 590 nm (Abs_{590}), del colorante adsorbido por la biomasa adherida de Tohama I y de Bp 953 reveló valores iguales a 0,32 y 0,72, respectivamente (Fig. 10). A partir de los resultados obtenidos se adoptó un tiempo de 5 h para la cuantificación de la biomasa adherida a soportes abióticos.

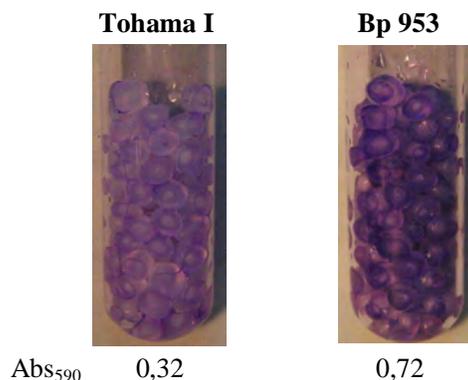


Fig. 10. Biomasa adherida a perlas de polipropileno y teñida con CV. Imagen de la biomasa adherida a perlas de polipropileno de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953, teñida con CV (0,1%), luego de 5 h de incubación de manera estática a 37°C. La absorbancia (Abs_{590}) determinada a partir del colorante adsorbido por la biomasa adherida de Tohama I y de Bp 953 reveló valores de 0,32 y 0,72, respectivamente.

III.3.2.2- Análisis de la adhesión a una superficie abiótica por aislados clínicos de *B. pertussis*

El proceso de adhesión sobre un soporte abiótico fue evaluado comparativamente entre la cepa Tohama I y 18 aislados clínicos de *B. pertussis*. Este estudio se realizó inoculando perlas de polipropileno con cultivos líquidos en fase exponencial y cuantificando espectrofotométricamente la biomasa adherida a las 5 h de iniciada la incubación.

En la Figura 11 se exhiben los valores de absorbancia a 590 nm (Abs_{590}), los cuales representan la biomasa adherida de la cepa Tohama I y aislados clínicos ensayados. A partir de estos resultados se consiguió determinar que el 78% de los aislados clínicos de *B. pertussis* analizados exhiben una adhesión al soporte abiótico significativamente mayor respecto a la cepa de referencia Tohama I. Asimismo, este análisis permitió demostrar que la cantidad de biomasa adherida para Tohama I y los aislados clínicos de *B. pertussis* resultó ser independiente del año de aislamiento.

Del mismo modo, a través de la Figura 11 se puede observar que ningún aislado clínico analizado presentó una adherencia significativamente menor que Tohama I. La mayor cantidad de biomasa adherida a polipropileno fue identificada para los aislados clínicos Bp 955, Bp 953 y Bp 892, cuyos valores resultaron ser entre 2 y 2,3 veces superiores al de la cepa de referencia. Estos resultados sugieren que las diferencias fenotípicas entre los aislados clínicos y la cepa de referencia Tohama I, que arrojaron los estudios de espectroscopía FT-IR (Capítulo II), podrían involucrar la mayor adhesión a superficie exhibida por un gran número de aislados clínicos en comparación con la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I.

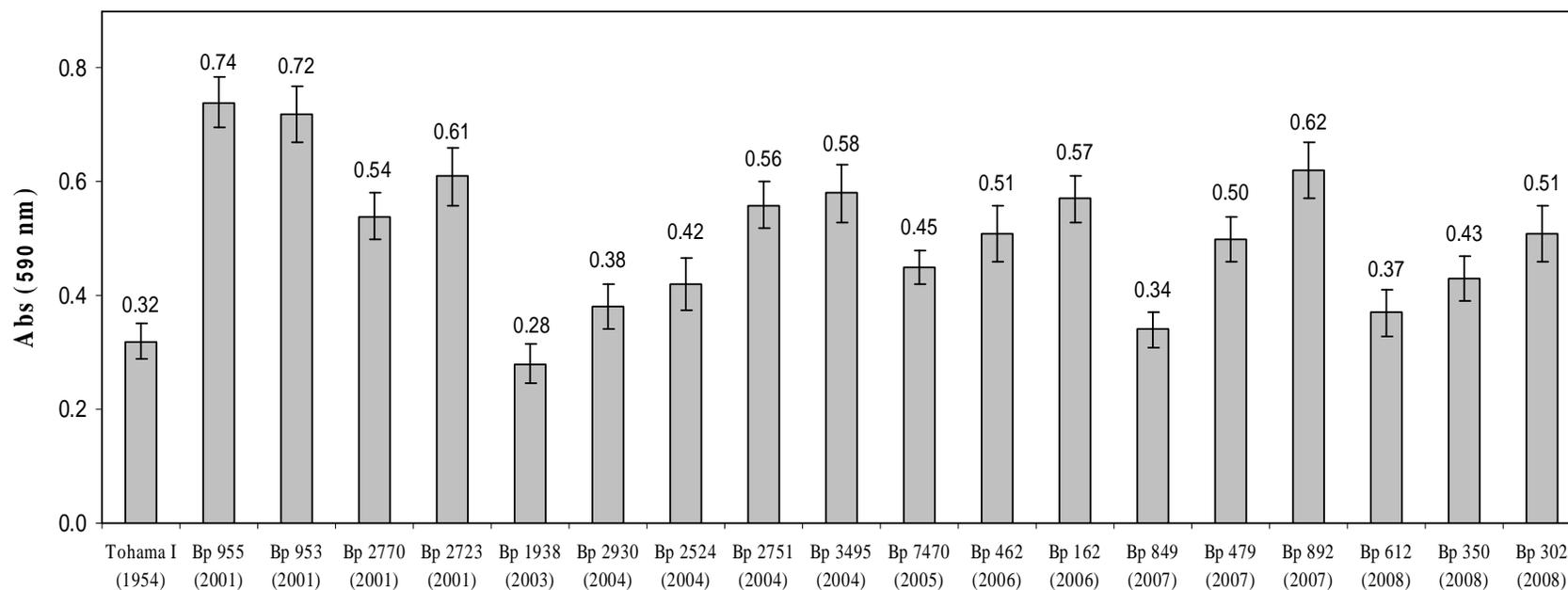


Fig. 11. Análisis comparativo de la biomasa adherida de la cepa de referencia Tohama I y 18 aislados clínico de *B. pertussis*. El evento de adhesión a una superficie abiótica fue evaluado comparativamente mediante cuantificación espectrofotométrica de la biomasa desarrollada sobre perlas de polipropileno luego de 5 h de incubación a 37°C. Este análisis permitió establecer que el 78% de los aislados clínicos de *B. pertussis* analizados presentan una adherencia a soporte abiótico significativamente mayor en comparación con la cepa de referencia Tohama I. Estos resultados revelan que el nivel de adhesión a superficie exhibido por Tohama I y los aislados clínicos demostró ser independiente del año de aislamiento. Los valores de absorbancia a 590 nm (Abs_{590}) representan la biomasa adherida a las perlas para la cepa Tohama I y aislados clínicos examinados. Se indica el año de aislamiento para la cepa de referencia y para cada aislado clínico de *B. pertussis*. Los datos corresponden a medias \pm desvíos estándares de valores de Abs_{590} obtenidos por medio de tres experimentos independientes.

III.3.2.3- Adhesión bajo condiciones de no crecimiento

La adhesión a superficies abióticas de la cepa Tohama I y de 3 aislados clínicos de *B. pertussis* fue estudiada bajo condiciones que aseguraran la falta de nutrientes en el medio incubación, con el objetivo de corroborar que dicho proceso no estaba asociado a un aumento de biomasa adherida por multiplicación sobre el soporte. Para tal fin, suspensiones de células en solución salina fosfatada, provenientes de cultivos líquidos de la cepa de referencia y de los aislados clínicos Bp 953, Bp 2751 y Bp 892, fueron utilizadas para inocular perlas de polipropileno, tal como se describió en la sección III.2.3.3. Por otro lado, la adhesión de dichas muestras fue evaluada bajo las condiciones de crecimiento celular descritas en la sección anterior. La biomasa adherida fue cuantificada con el método de CV a las 5 h de incubación, para luego cotejar los resultados obtenidos bajo ambas condiciones. En la Figura 12 se puede observar que los valores de biomasa adherida a superficie obtenidos bajo condiciones de no crecimiento celular no presentan diferencias significativas respecto de los valores de biomasa adherida bajo las condiciones que permitirían un crecimiento, tanto para la cepa Tohama I como para los aislamientos Bp 953, Bp 2751 y Bp 892. De esta manera se consiguió confirmar que el proceso de adhesión a superficie abiótica

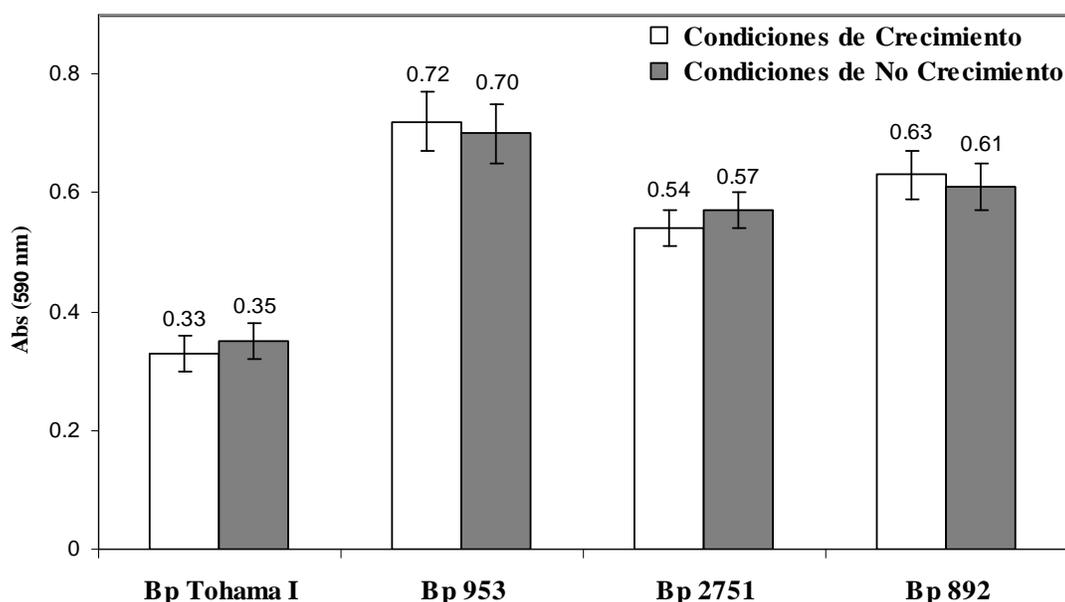


Fig. 12. Adhesión en condiciones de crecimiento y no crecimiento de la cepa Tohama I y aislados clínicos de *B. pertussis*. La biomasa adherida a perlas de polipropileno bajo condiciones de crecimiento y no crecimiento celular, fue cuantificada mediante el procedimiento de tinción con cristal violeta a las 5 h de incubación a 37°C. No se detectan diferencias significativas en la cantidad de biomasa adherida entre ambas condiciones de cultivo evaluadas con la cepa Tohama I y los aislados clínicos de Bp 953, Bp 2751 y Bp 892 de *B. pertussis*. Los valores corresponden a medias \pm desvíos estándares de tres experimentos independientes.

de la cepa de referencia y aislados clínicos de *B. pertussis* no depende del crecimiento *in situ* sobre las superficies expuestas.

III.3.2.4- Efecto de la modulación sobre la adhesión a soportes abióticos

Diversos factores de virulencia han manifestado ser indispensables para la etapa de adhesión, lo cual los convierte en componentes fundamentales del proceso de colonización de superficies por microorganismos (12-14). Nuestro grupo de trabajo ha demostrado con la cepa de referencia Tohama I de *B. pertussis*, que la ausencia de factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS, en especial la adhesina FHA, provoca una disminución del nivel de adhesión como así también del desarrollo de biofilms (57). Con este antecedente se decidió estudiar la capacidad de adhesión a polipropileno que presentan aislados clínicos de *B. pertussis* bajo condiciones de modulación en fase avirulenta (fase Bvg-) y así realizar una comparación con la adherencia en condiciones sin modulación (condición de virulencia). La evaluación de la biomasa adherida se realizó a través del método de CV. Como se muestra en la Figura 13, el nivel de adhesión de la cepa Tohama I como así también de los aislados clínicos Bp 953, Bp 2751 y Bp 892 fue considerablemente menor en fase avirulenta, indicando que la ausencia de factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS afecta la

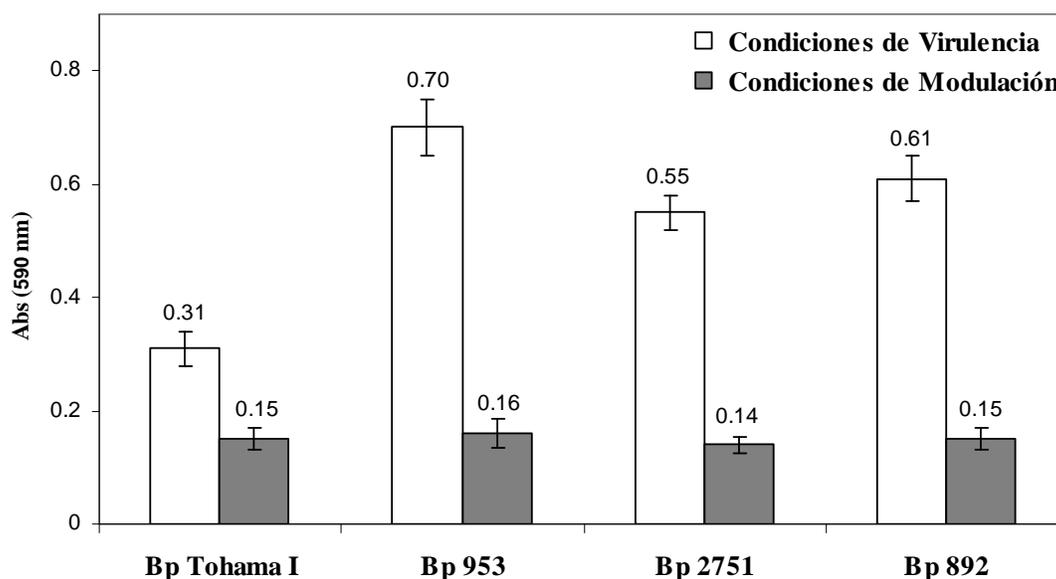


Fig. 13. Adhesión bajo condiciones de virulencia y modulación de la cepa Tohama I y aislados clínicos de *B. pertussis*. La biomasa adherida a polipropileno en fase virulenta y bajo modulación en fase avirulenta, fue cuantificada mediante el método de CV a las 5 h de incubación a 37°C. El nivel de adherencia es significativamente menor en condiciones de modulación tanto para Tohama I como para los aislados clínicos Bp 953, Bp 2751 y Bp 892 de *B. pertussis*. Los datos son medias \pm desvíos estándares de tres experimentos independientes.

adhesión a superficie abiótica tanto de los aislados clínicos como de la cepa de referencia de *B. pertussis*. Estos resultados sugieren que ciertas adhesinas, reguladas por el sistema BvgAS también serían fundamentales para los aislados clínicos de *B. pertussis* durante la etapa de adhesión. Resulta interesante observar como la disminución de la adhesión es mucho más marcada en los aislados clínicos, lo cual podría indicar un mayor nivel de expresión de adhesinas reguladas por BvgAS, que deberá ser estudiado.

III.3.3- Formación de biofilm sobre superficie abiótica

El proceso de desarrollo de biofilm sobre una superficie abiótica fue evaluado de manera comparativa entre la cepa de referencia Tohama I y aislados clínicos de *B. pertussis*. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron 2 sistemas de cultivo en columna: el sistema *batch* con recambio de medio (sistema semi-continuo) y el sistema con flujo continuo de nutrientes. En ambos sistemas de cultivo se utilizaron perlas de polipropileno como soporte para la formación de biofilm. La biomasa adherida fue teñida con CV (0,1%) e indirectamente cuantificada por medición de la cantidad de colorante adsorbido por las células.

III.3.3.1- Sistema de cultivo batch con recambio de medio

A través de este sistema de cultivo se cuantificó el biofilm formado por la cepa de referencia y 3 aislados clínicos de *B. pertussis* en condiciones aeróbicas reemplazando asepticamente el medio de cultivo agotado por medio fresco cada 24 h. Como se muestra en la Figura 14, luego de la etapa de adhesión inicial (5 h) los aislados clínicos Bp 953, Bp 2751 y Bp 892 crecieron sobre la superficie abiótica incrementando notoriamente su biomasa adherida durante las primeras 48 h de cultivo. Sin embargo, bajo las mismas condiciones de cultivo la cepa Tohama I no fue capaz de alcanzar los niveles de biomasa adherida que consiguieron los aislados clínicos ensayados. La formación de biofilm, tanto para la cepa de referencia como para los aislados clínicos de *B. pertussis*, obtuvo un nivel máximo a las 72 h de iniciado el cultivo, para luego comenzar a disminuir de manera paulatina. Los aislados clínicos exhibieron mayores cantidades de biomasa adherida sobre el soporte abiótico, respecto de Tohama I, en todos los tiempos examinados. Asimismo, la Figura 14 revela que la cantidad de biofilm formado por los aislados clínicos durante la etapa de maduración (60-72 h de cultivo), resultó ser entre 2,65 y 2,95 veces superior al producido por la cepa de referencia. Los resultados de este estudio indican que ciertos aislados clínicos de *B. pertussis*

presentarían la capacidad de desarrollar mayores niveles de biomasa bajo el modo de crecimiento en biofilm, en comparación con la cepa de referencia Tohama I.

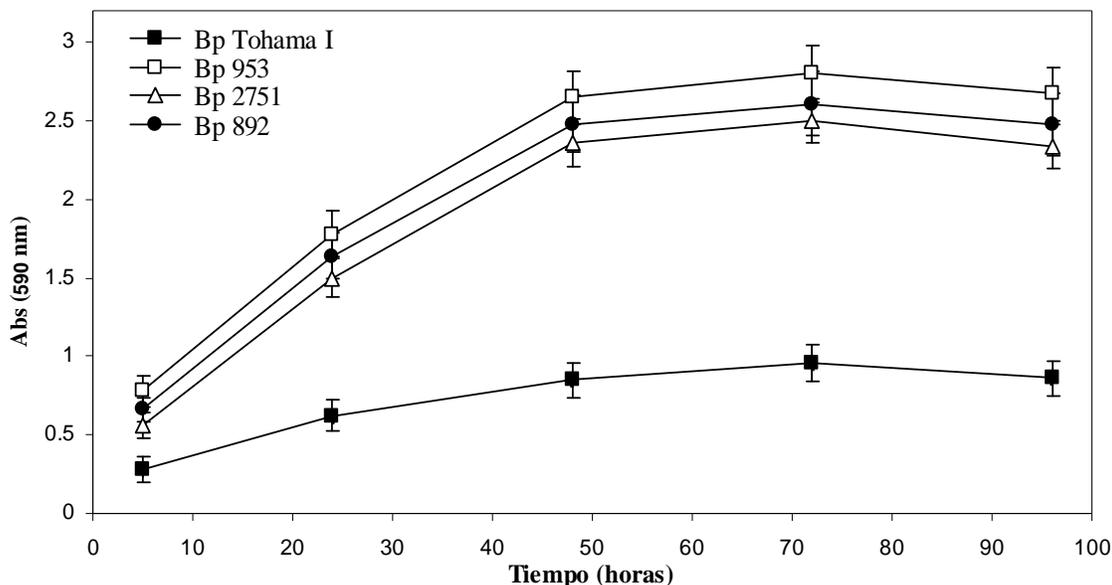


Fig. 14. Formación de biofilm por la cepa Tohama I y aislados clínicos de *B. pertussis* empleando el sistema de cultivo *batch* con recambio de medio. Luego de la adhesión inicial (5 h), el desarrollo de biofilm por la cepa Tohama I y los aislados clínicos Bp 953, Bp 2751 y Bp 892, fue determinado a las 24, 48, 72 y 96 h sobre superficie de polipropileno. La biomasa adherida fue cuantificada indirectamente por medio del método de CV. Los valores son promedios \pm desviaciones estándares de tres experimentos independientes.

III.3.3.2- Sistema de cultivo con flujo continuo de nutrientes

La formación de biofilm por la cepa Tohama I y 2 aislados clínicos fue evaluada bajo condiciones de flujo continuo de nutrientes con el fin de cuantificar la biomasa adherida a superficie y así realizar una comparación con la cantidad de biofilm desarrollado mediante el método de cultivo *batch* con recambio de medio. Para tal fin, el crecimiento en biofilm se llevó a cabo en un biorreactor conteniendo perlas de polipropileno, incubando los cultivos a 37°C con circulación constante de medio SS fresco. El biofilm desarrollado sobre la superficie abiótica fue determinado a las 36 y 72 h de incubación, por medio del procedimiento de tinción con CV. En la Figura 15 se observa que, los aislados clínicos Bp 953 y Bp 892 crecieron aumentando intensamente su biomasa adherida a partir de la etapa de adhesión inicial hasta las 72 h de incubación, mientras que la cepa Tohama I alcanzó niveles inferiores de biofilm bajo iguales condiciones de cultivo y período de tiempo. Mediante este

sistema de cultivo se consiguió determinar, al igual que con el sistema anterior, que el nivel máximo de biofilm desarrollado por los aislados clínicos de *B. pertussis* fue entre 2,8 y 2,95 veces superior al generado por la cepa de referencia (Fig. 15). De esta manera, fue posible confirmar que aislados clínicos de *B. pertussis* son capaces de desarrollar cantidades superiores de biomasa bajo condiciones de crecimiento sésil, comparativamente con la cepa de referencia Tohama I.

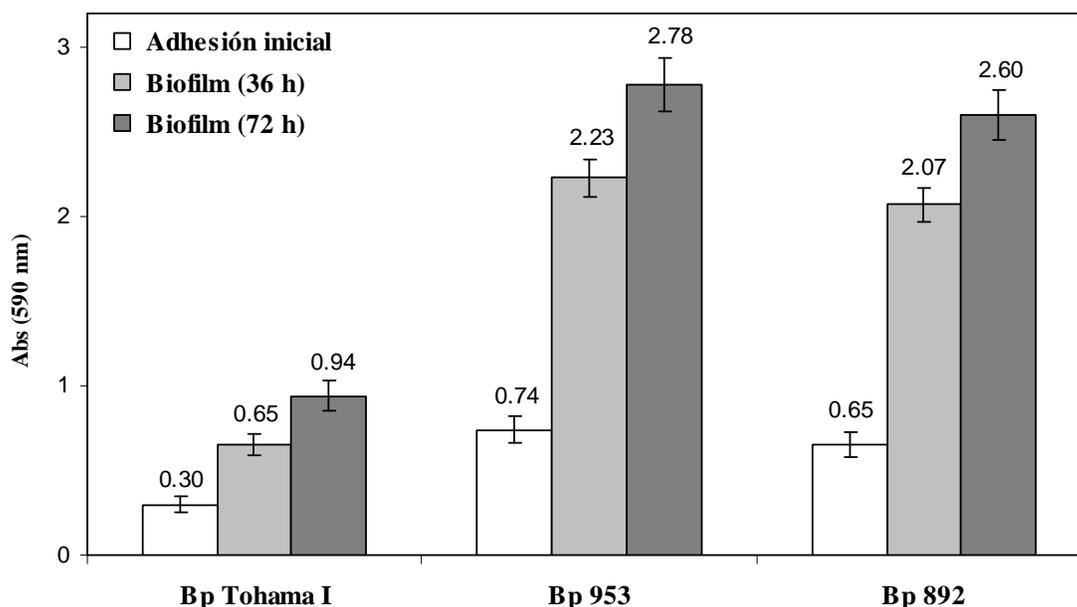


Fig. 15. Desarrollo de biofilm por la cepa Tohama I y aislados clínicos de *B. pertussis* utilizando el sistema de cultivo con flujo continuo de nutrientes. A partir de la adhesión inicial (5 h), la formación de biofilm sobre polipropileno por la cepa Tohama I y los aislados clínicos Bp 953 y Bp 892 fue analizada a las 36 y 72 h de cultivo. La cantidad de biomasa adherida fue calculada indirectamente por medio del procedimiento de tinción con CV. Los datos son medias \pm desviaciones estándares de dos experimentos independientes.

III.3.4- Análisis de células enteras por SDS-PAGE

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, empleando electroforesis SDS-PAGE, determinaron diferencias cuali y cuantitativas en bandas de proteínas de membrana externa con bajo peso molecular, entre células sésiles y planctónicas de la cepa de referencia Tohama I de *B. pertussis* (56). En el presente trabajo, los perfiles proteicos de células enteras de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953, crecidas en cultivos líquidos y en biofilm, fueron estudiados comparativamente a través de geles SDS-PAGE, tal como fue detallado en la sección III.2.6. Este análisis reveló prácticamente el mismo perfil de bandas de proteínas

entre células planctónicas de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953. Del mismo modo no fue posible apreciar diferencias en el perfil de bandas proteicas entre células cultivadas en biofilm de Tohama I y del aislado Bp 953 (Fig. 16). Sin embargo, a través del análisis electroforético se determinó que las células sésiles de Tohama I y Bp 953 exhiben una mayor intensidad de las bandas ubicadas en la región de 40-80 kDa del perfil proteico, en comparación con sus respectivas células planctónicas. Esto sugiere que el aislado clínico analizado, al igual que la cepa de referencia de *B. pertussis*, expresaría mayor cantidad de ciertas proteínas bajo la condición de crecimiento en biofilm respecto de la forma de cultivo planctónico.

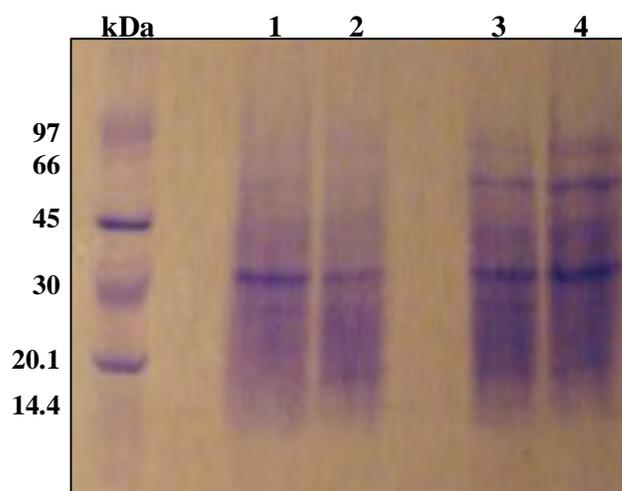


Fig. 16. Perfiles electroforéticos de proteínas de células enteras de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953. Comparación de bandas de proteínas pertenecientes a células planctónicas de Tohama I (calle 1) y Bp 953 (calle 2), y células sésiles de Tohama I (calle 3) y Bp 953 (calle 4). Las bandas de proteínas fueron teñidas con Coomassie blue R250.

III.3.5- Estudio comparativo de la expresión fenotípica de células planctónicas y sésiles mediante FT-IR

La espectroscopía FT-IR constituye una metodología de gran utilidad en estudios de expresión fenotípica bacteriana ya que aporta información cuali y cuantitativa sobre las macromoléculas que conforman una población de bacterias crecidas bajo determinadas condiciones de cultivo. Las regiones espectrales correspondientes a la absorción de las principales macromoléculas (lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos) que se ubican entre los rangos 3000-2820 y 1800-750 cm^{-1} , fueron consideradas para analizar comparativamente la expresión fenotípica de la cepa de referencia Tohama I y del aislado

clínico Bp 953 de *B. pertussis*, en cultivos planctónicos y bajo la forma de crecimiento en biofilm.

III.3.5.1- Análisis de espectros IR de células planctónicas y sésiles mediante un método estadístico multivariado

Según la definición de biofilms propuesta por Donlan y Costerton (3), dicho modo de crecimiento microbiano está caracterizado por células que expresan un fenotipo propio. Sin embargo, otros investigadores han planteado que las células sésiles se asemejarían a células planctónicas en estado estacionario por encontrarse bajo condiciones de estrés nutricional dentro de la matriz del biofilm (69-70).

En este contexto se analizaron comparativamente espectros FT-IR de células provenientes de cultivos planctónicos en fase estacionaria (48 h de incubación) y de biofilms maduros (72 h de cultivo) de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953, mediante Análisis Jerárquico de Clusters, el cual es un método estadístico multivariado ampliamente utilizado en esta clase de estudios. El dendrograma derivado del análisis de los espectros FT-IR adquiridos a partir de células pertenecientes a la cepa Tohama I expuso claramente la discriminación entre dichos espectros en dos grupos, los cuales corresponden uno al conjunto de espectros de la población de bacterias planctónicas, mientras que el otro al set de espectros de la población sésil (Fig. 17 A). Estos datos coinciden con resultados obtenidos previamente a partir de estudios realizados en nuestro laboratorio con dicha cepa de referencia, indicando que el fenotipo sésil de Tohama I es distintivo respecto de su contraparte planctónica. Del mismo modo, el análisis multivariado aplicado al conjunto de espectros FT-IR correspondientes a las células de Bp 953 discriminó notoriamente dichos espectros en dos clusters, separando de manera evidente la población planctónica de aquella desarrollada como biofilm (Fig. 17 B). Este resultado indica que existen diferencias fenotípicas entre las poblaciones celulares planctónicas y sésiles del aislado clínico Bp 953, indicando que bajo condiciones de cultivo en biofilm los aislados clínicos presentarían características fenotípicas particulares respecto a la forma de crecimiento planctónica, al igual que lo observado para la cepa de referencia Tohama I.

III.3.5.2- Estudio comparativo entre espectros IR de células planctónicas y sésiles

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio permitieron identificar las diferencias fenotípicas entre espectros FT-IR adquiridos a partir de células de *B. pertussis* Tohama I

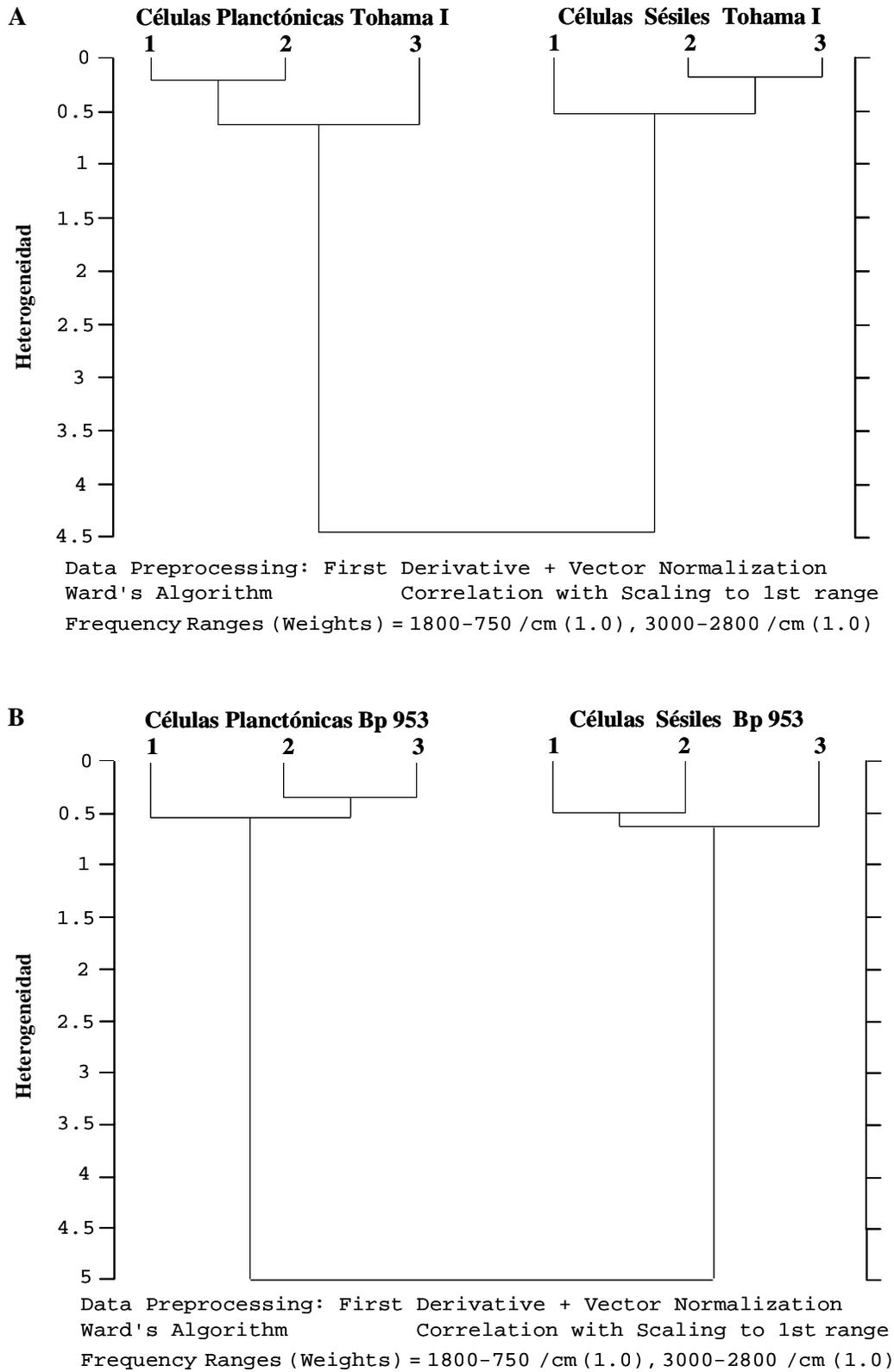


Fig. 17. Estudio de espectros FT-IR mediante el método Análisis Jerárquico de Clusters.
 A) Dendrograma obtenido a partir del análisis comparativo de espectros correspondientes a células planctónicas y sésiles de la cepa Tohama I. B) Dendrograma derivado del análisis de espectros provenientes de células planctónicas y sésiles del aislado clínico Bp 953. Los números indican los experimentos independientes para cada tipo celular.

provenientes de cultivos planctónicos y de biofilms maduros. Dichos estudios indicaron que las mayores diferencias entre las mencionadas poblaciones celulares podrían deberse a aumentos en el contenido de carbohidratos en la población sétil de Tohama I (57). A partir de estos resultados se decidió analizar comparativamente espectros FT-IR correspondientes a células planctónicas y sétiles del aislado clínico Bp 953 de *B. pertussis*, para poder de este modo comparar dichos espectros entre sí y con espectros pertenecientes a la cepa Tohama I. Para tal fin, espectros IR adquiridos a partir de células obtenidas de cultivos líquidos en fase estacionaria y de biofilms maduros correspondientes a dicha cepa de referencia y al mencionado aislado clínico, fueron examinados en las regiones de absorción de las principales macromoléculas.

En la Figura 18 A se muestran los espectros FT-IR correspondientes a células planctónicas y sétiles de la cepa Tohama I. El análisis comparativo entre dichos espectros permitió distinguir, al igual que en los trabajos previos, diferencias cualitativas y semicuantitativas principalmente en la región espectral asignada con carbohidratos. Estas diferencias fueron también identificadas en la región de carbohidratos entre espectros IR provenientes de células planctónicas y sétiles del aislado clínico Bp 953 (Fig. 18 B). Las disimilitudes presentes en dicha región derivan de un aumento relativo de la intensidad de las bandas de absorción de grupos funcionales ubicados en el rango $1200-900\text{ cm}^{-1}$ de los espectros IR pertenecientes a la población de células sétiles tanto de Tohama I como de Bp 953. Cabe mencionar que no se detectaron, mediante esta metodología, diferencias significativas para el resto de las macromoléculas entre ambos tipos celulares de la cepa de referencia y del aislado clínico.

Los resultados indican que la región de polisacáridos podría contribuir mayormente a la discriminación fenotípica entre las poblaciones de células planctónicas y sétiles del aislado clínico Bp 953, como también fue determinado previamente para la cepa Tohama I.

III.3.5.3- Estudio semi-cuantitativo de la composición macromolecular de células planctónicas y sétiles de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953

La composición macromolecular de células sétiles y planctónicas de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953 fue determinada semi-cuantitativamente a partir de los espectros IR adquiridos por espectroscopía FT-IR. Para tal fin, se calcularon las áreas pertenecientes a las bandas de absorción de los lípidos ($3000-2820\text{ cm}^{-1}$), proteínas (Amida II: $1590-1485\text{ cm}^{-1}$), ácidos nucleicos ($1250-1220\text{ cm}^{-1}$) y carbohidratos ($1150-985\text{ cm}^{-1}$), mediante la aplicación del programa OPUS 4.2. A partir del cálculo de áreas se consiguió determinar que la

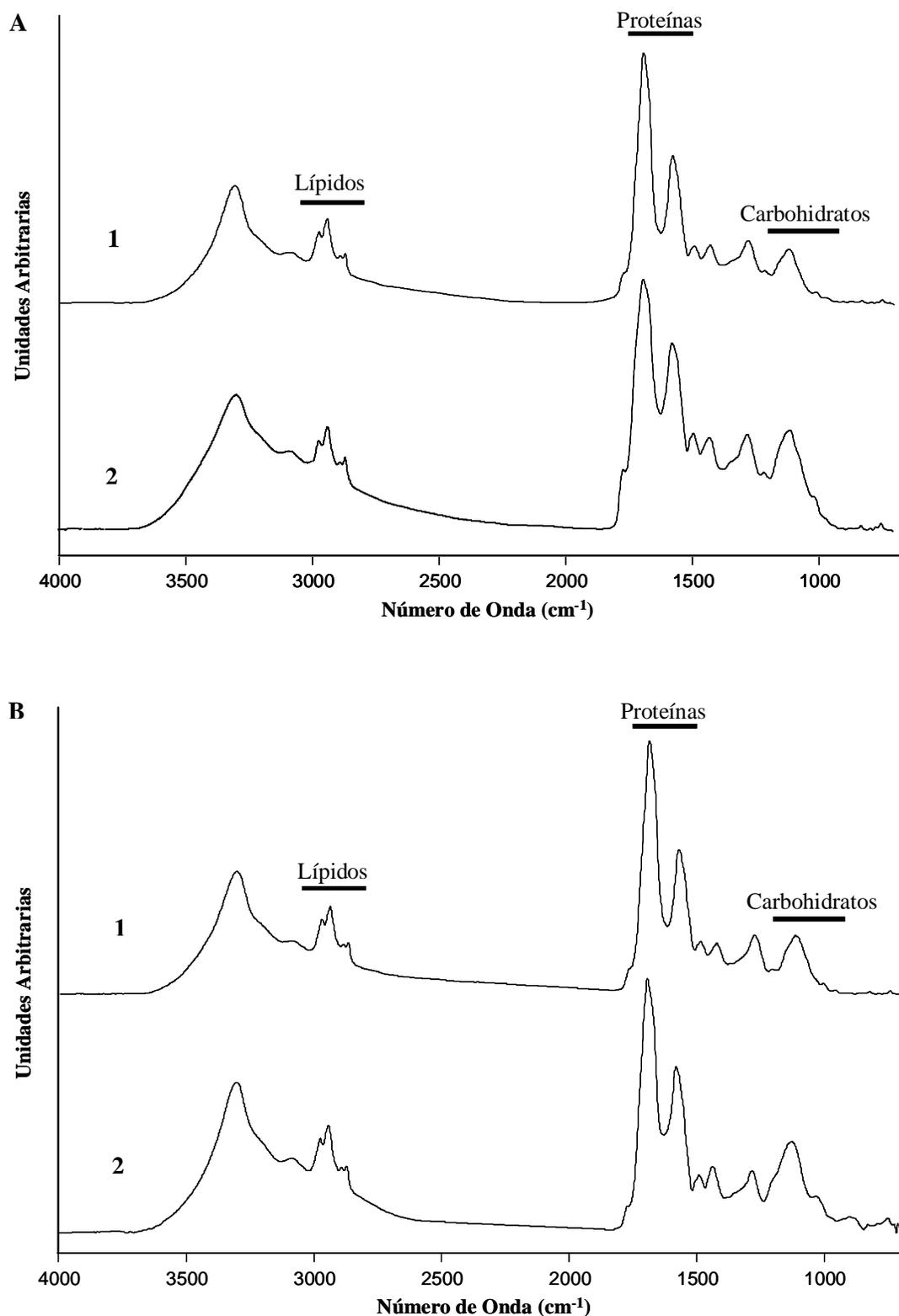


Fig. 18. Espectros FT-IR de células de la cepa Tohamia I y del aislado clínico Bp 953. A) Espectros de células planctónicas (1) y células sésiles (2) de la cepa de referencia Tohamia I. B) Espectros de células planctónicas (1) y células sésiles (2) del aislado clínico Bp 953. En los espectros se indican las regiones de absorción correspondientes a los grupos funcionales asociados a lípidos (3000-2820 cm⁻¹), proteínas (1720-1485 cm⁻¹) y carbohidratos (1150-985 cm⁻¹).

composición macromolecular de la cepa Tohama I no reveló diferencias significativas entre las células planctónicas y sésiles con respecto al contenido de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, se determinó que el contenido de carbohidratos de la población de células sésiles de Tohama I resultó ser 2,5 veces superior al obtenido por su contraparte planctónica (Tabla 3). Estos resultados son coincidentes con lo reportado previamente por Bosch y *col* (56) para dicha cepa. Asimismo, mediante este análisis se logró establecer que no hay variaciones significativas en la cantidad de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos entre las poblaciones planctónicas y sésiles correspondientes al aislado clínico Bp 953. Estos valores no difieren significativamente de aquellos pertenecientes a la cepa Tohama I. El contenido de carbohidratos de las células sésiles del aislado clínico mostró ser 3 veces superior respecto del correspondiente a su contraparte población planctónica (Tabla 3). Tal como se mencionó en el Capítulo I, el aumento en el contenido de carbohidratos de las células sésiles se encuentra relacionado con la formación de la matriz polimérica extracelular, la cual caracteriza la estructura de los biofilms bacterianos. De este modo, a partir de los resultados se puede sugerir que el incremento en el contenido de polisacáridos en las células sésiles del aislado clínico Bp 953 podría estar vinculado con un aumento en el desarrollo de la matriz extracelular y por consecuencia en un mayor nivel de formación de biofilm.

Tabla 3. Composición macromolecular determinada por espectroscopía FT-IR de células planctónicas y sésiles de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953 de *B. pertussis*

Cepa o aislado clínico	Tipo de células	Lípidos	Proteínas	Ácidos Nucleicos	Carbohidratos
Tohama I	Planctónicas	8,12 ± 0,41	10,46 ± 0,51	0,32 ± 0,01	2,35 ± 0,16
	Sésiles	8,18 ± 0,45	10,68 ± 0,56	0,36 ± 0,02	5,91 ± 0,30
Bp 953	Planctónicas	8,14 ± 0,43	10,59 ± 0,54	0,34 ± 0,01	2,81 ± 0,19
	Sésiles	8,20 ± 0,47	10,83 ± 0,56	0,37 ± 0,02	8,42 ± 0,45

Los valores de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos corresponden a las áreas integradas de las bandas de absorción, ubicadas en las regiones con rango 3000-2820 cm^{-1} , 1590-1485 cm^{-1} , 1250-1220 cm^{-1} y 1150-985 cm^{-1} , respectivamente. Los valores son promedios \pm desviaciones estándares de tres experimentos independientes.

III.4- DISCUSIÓN

Cuando se inició este trabajo nuestro laboratorio disponía de información del proceso de adhesión y desarrollo en biofilms de la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I (56-57). A su vez, trabajos de los últimos años reportan diferencias genéticas entre aislados clínicos y la cepa de referencia Tohama I, las cuales son el resultado de la adaptación de los organismos circulantes a la vacunación (63-64, 70-71). Actualmente el estudio de aislados clínicos es crucial para lograr entender la persistencia de estos organismos en el hospedador y los mecanismos que han adoptado estas bacterias para evadir las presiones impuestas por la vacunación. En el contexto de nuestros trabajos en biofilm se decidió así realizar estudios de adhesión y formación de biofilms empleando aislados clínicos locales de *B. pertussis*.

El estudio del crecimiento en cultivo *batch* mostró que los aislados clínicos analizados exhiben una velocidad específica de crecimiento mayor que la cepa de referencia Tohama I, y a su vez logran alcanzar en el medio Stainer-Scholte una mayor biomasa final respecto a Tohama I creciendo en las mismas condiciones experimentales.

A través del análisis de la cinética de adhesión a soporte abiótico se consiguió demostrar que la adherencia a superficie de Tohama I como también de aislados clínicos, no se ve influenciada por el crecimiento de las bacterias adheridas al sustrato. Los estudios de adhesión mostraron grandes diferencias entre la cepa de referencia y los aislados circulantes. El 78% de los aislamientos presentó una adherencia significativamente mayor respecto de la cepa de referencia. Asimismo, la adhesión fue menor en fase avirulenta, indicando que la ausencia de factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS afecta dicho proceso. De este modo se puede sugerir que, el mayor nivel de adhesión exhibido por la mayoría de los aislados clínicos podría estar vinculado a una mayor expresión de ciertas adhesinas como FHA. En nuestro laboratorio se están cuantificando las fuerzas de interacción entre bacteria y superficie, tanto para la cepa de referencia como para aislados clínicos de *B. pertussis*.

El desarrollo en biofilm fue analizado durante la etapa de maduración por ser en la cual se consolida su estructura tridimensional. En esta fase los biofilms de patógenos ofrecen la mayor resistencia a las defensas del hospedador y al tratamiento con antimicrobianos (41). A partir de los ensayos de formación de biofilm se logró establecer que la biomasa desarrollada por los aislados clínicos ensayados fue marcadamente superior a la producida por la cepa Tohama I. La producción de biofilm de los aislados clínicos como así también de Tohama I mediante el sistema de cultivo *batch* con recambio de medio fue similar a la obtenida con el sistema de cultivo con flujo continuo de nutrientes, indicando que con ambos sistemas se

consiguió crear las condiciones necesarias para el adecuado desarrollo en biofilm de la cepa de referencia y aislados clínicos de *B. pertussis*.

El análisis de proteínas de células enteras mediante SDS-PAGE, mostró que la población sétil tanto del aislado clínico examinado como de Tohama I produciría mayor cantidad de proteínas en el rango 40-80 kDa, en comparación con las respectivas poblaciones planctónicas. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos para otras bacterias formadoras de biofilm, corroborando que el crecimiento en biofilm aporta características fenotípicas distintivas a las células sétiles (61). Por otra parte, la aplicación de la espectroscopía FT-IR en conjunto con el Análisis de Clusters permitió discriminar fenotípicamente a la población de células sétiles del aislado clínico Bp 953 de su contraparte población planctónica, coincidiendo con resultados obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio con Tohama I. A su vez, el análisis comparativo de espectros IR permitió identificar diferencias cualitativas y semicuantitativas en la zona de carbohidratos entre células sétiles y planctónicas de dicho aislamiento. A partir de estos estudios se determinó que las células sétiles correspondientes a biofilms maduros del aislado Bp 953 muestran una fisiología distintiva y características fenotípicas particulares respecto a las células desarrolladas en condiciones planctónicas, coincidiendo con los resultados reportados para Tohama I (57-58) y otras bacterias formadoras de biofilm (59-61). Por medio del cálculo de áreas de las bandas de absorción IR se consiguió demostrar que la población de células sétiles de Bp 953, al igual que para Tohama I, exhibe un mayor contenido de carbohidratos en comparación con su contraparte planctónica. Sin embargo, se observó que la población sétil de Bp 953 experimenta un mayor incremento en la cantidad de carbohidratos respecto a la que muestra la cepa de referencia bajo la misma forma de crecimiento. Debido a que el aumento de la síntesis de polisacáridos está vinculado a la formación de la matriz polimérica extracelular en biofilms (19-20), es posible indicar que la elevada producción de polisacáridos en aislados clínicos de *B. pertussis* podría generar un incremento de la matriz en general. Estos resultados sugieren que una matriz extracelular con un contenido superior de exopolisacáridos en los aislados clínicos de *B. pertussis*, podría acrecentar la protección que las células sétiles de biofilms reciben contra la acción de anticuerpos, células fagocíticas y de los tratamientos antimicrobianos, lo cual representa un aumento de patogenicidad.

En definitiva, en este capítulo se consiguió determinar diferencias en el crecimiento en biofilm entre aislados clínicos de *B. pertussis* y la cepa de referencia Tohama I, lo cual favorecerá la búsqueda de estrategias que consigan inhibir uno de los posibles mecanismos que posee el patógeno para su persistencia en el hospedador.

III.5- REFERENCIAS

1. Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., and Marrie, T. J. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease, *Annu Rev Microbiol.* 41, 435-464.
2. Costerton, J. W., Stewart, P. S., and Greenberg, E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science.* 284, 1318-1322.
3. Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clin Microbiol Rev.* 15, 167-193.
4. Zobell, C. E., and Allen, E. C. (1935) The Significance of Marine Bacteria in the Fouling of Submerged Surfaces, *J Bacteriol.* 29, 239-251.
5. Zobell, C. E. (1943) The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity, *J Bacteriol.* 46, 39-56.
6. Costerton, J. W., Geesey, G. G., and Cheng, K. J. (1978) How bacteria stick, *Sci Am.* 238, 86-95.
7. Stewart, P. S., and Franklin, M. J. (2008) Physiological heterogeneity in biofilms, *Nat Rev Microbiol.* 6, 199-210.
8. Holah, J. T. a. I. R. K. (1992) Introduction to biofilms in the food industry, en Melo LF, Bott TR, Fletcher M. Capdeville B. (Eds). *Biofilm-Science and Technology.* Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Limpioherlands, pp. 35-41.
9. Carpentier, B., and Cerf, O. (1993) Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry, *J Appl Bacteriol.* 75, 499-511.
10. Donlan, R. M. (2001) Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process, *Clin Infect Dis.* 33, 1387-1392. Epub 2001 Sep 1320.
11. Donlan, R. M. (2001) Biofilms and device-associated infections, *Emerg Infect Dis.* 7, 277-281.
12. O'Toole, G., Kaplan, H. B., and Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development, *Annu Rev Microbiol.* 54, 49-79.
13. Davey, M. E., and O'Toole G, A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics, *Microbiol Mol Biol Rev.* 64, 847-867.
14. Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., and Penades, J. R. (2001) Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation, *J Bacteriol.* 183, 2888-2896.
15. Pringle, J. H., and Fletcher, M. (1986) Influence of substratum hydration and adsorbed macromolecules on bacterial attachment to surfaces, *Appl Environ Microbiol.* 51, 1321-1325.
16. Pratt, L. A., and Kolter, R. (1998) Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili, *Mol Microbiol.* 30, 285-293.
17. Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M. J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penades, J. R., and Lasa, I. (2001) The enterococcal surface protein, Esp, is involved in Enterococcus faecalis biofilm formation, *Appl Environ Microbiol.* 67, 4538-4545.
18. Hall-Stoodley, L., and Stoodley, P. (2002) Developmental regulation of microbial biofilms, *Curr Opin Biotechnol.* 13, 228-233.
19. Sutherland, I. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework, *Microbiology.* 147, 3-9.
20. Davies, D. G., Chakrabarty, A. M., and Geesey, G. G. (1993) Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by Pseudomonas aeruginosa, *Appl Environ Microbiol.* 59, 1181-1186.

21. Solano, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J. M., Gamazo, C., and Lasa, I. (2002) Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose, *Mol Microbiol.* *43*, 793-808.
22. Wai, S. N., Mizunoe, Y., Takade, A., Kawabata, S. I., and Yoshida, S. I. (1998) *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation, *Appl Environ Microbiol.* *64*, 3648-3655.
23. Maira-Litran, T., Kropec, A., Abeygunawardana, C., Joyce, J., Mark, G., 3rd, Goldmann, D. A., and Pier, G. B. (2002) Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide, *Infect Immun.* *70*, 4433-4440.
24. Sauer, K., Cullen, M. C., Rickard, A. H., Zeef, L. A., Davies, D. G., and Gilbert, P. (2004) Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm, *J Bacteriol.* *186*, 7312-7326.
25. Lasa, I., Del Pozo, J. L., Penades, J. R., and Leiva, J. (2005) Bacterial biofilms and infection, *An Sist Sanit Navar.* *28*, 163-175.
26. Stewart, P. S. (2003) Diffusion in biofilms, *J Bacteriol.* *185*, 1485-1491.
27. Hibiya, K., Nagai, J., Tsuneda, S., and Hirata, A. (2004) Simple prediction of oxygen penetration depth in biofilms for wastewater treatment, *Biochem Eng J* *19*, 61-68.
28. Monds, R., and O'Toole, G. (2009) The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review, *Trends Microbiol* *17*, 73-87.
29. Sauer, K., Camper, A., Ehrlich, G., Costerton, J., and Davies, D. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm, *J. Bacteriol* *184*, 1140-1154.
30. Parsek, M., and Tolker-Nielsen, T. (2008) Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Curr. Opin. Microbiol* *11*, 560-566.
31. James, G. A., Beaudette, L. and J. W. Costerton. (1995) Interspecies bacterial interactions in biofilms, *J. Indust. Microbiol.* *15*, 257-262.
32. Lasa, I. (2006) Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development, *Int Microbiol.* *9*, 21-28.
33. Miller, M. B., and Bassler, B. L. (2001) Quorum sensing in bacteria, *Annu Rev Microbiol.* *55*, 165-199.
34. Waters, C. M., and Bassler, B. L. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria, *Annu Rev Cell Dev Biol.* *21*, 319-346.
35. O'Toole, G. A., Gibbs, K. A., Hager, P. W., Phibbs, P. V., Jr., and Kolter, R. (2000) The global carbon metabolism regulator *Crc* is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol.* *182*, 425-431.
36. Jackson, D. W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J. W., Hart, M. E., and Romeo, T. (2002) Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator *CsrA* of *Escherichia coli*, *J Bacteriol.* *184*, 290-301.
37. Vidal, O., Longin, R., Prigent-Combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M., and Lejeune, P. (1998) Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increases curli expression, *J Bacteriol.* *180*, 2442-2449.
38. Adams, J. L., and McLean, R. J. (1999) Impact of *rpoS* deletion on *Escherichia coli* biofilms, *Appl Environ Microbiol.* *65*, 4285-4287.
39. Choi, K. S., Veeraragouda, Y., Cho, K. M., Lee, S. O., Jo, G. R., Cho, K., and Lee, K. (2007) Effect of *gacS* and *gacA* mutations on colony architecture, surface motility,

- biofilm formation and chemical toxicity in *Pseudomonas* sp. KL28, *J Microbiol.* 45, 492-498.
40. Kuchma, S. L., Connolly, J. P., and O'Toole, G. A. (2005) A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol.* 187, 1441-1454.
 41. Lewis, K. (2001) Riddle of biofilm resistance, *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 999-1007.
 42. Suman, E., Jose, J., Varghese, S., and Kotian, M. S. (2007) Study of biofilm production in *Escherichia coli* causing urinary tract infection, *Indian J Med Microbiol.* 25, 305-306.
 43. Post, J. C. (2001) Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media, *Laryngoscope.* 111, 2083-2094.
 44. Lamont, R. J., and Jenkinson, H. F. (1998) Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*, *Microbiol Mol Biol Rev.* 62, 1244-1263.
 45. Brooks, W., Demuth, D. R., Gil, S., and Lamont, R. J. (1997) Identification of a *Streptococcus gordonii* SspB domain that mediates adhesion to *Porphyromonas gingivalis*, *Infect Immun.* 65, 3753-3758.
 46. Collins, F. S. (1992) Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications, *Science.* 256, 774-779.
 47. Pier, G. (1995) *Pseudomonas aeruginosa*: a key problem in cystic fibrosis *ASM News* 64, 339-347.
 48. Anwar, H., Strap, J. L., and Costerton, J. W. (1992) Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy, *Antimicrob Agents Chemother.* 36, 1347-1351.
 49. Hyde, J. A., Darouiche, R. O., and Costerton, J. W. (1998) Strategies for prophylaxis against prosthetic valve endocarditis: a review article, *J Heart Valve Dis.* 7, 316-326.
 50. Thien, F. C., and O'Toole, G. A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *Trends Microbiol.* 9, 34-39.
 51. Potera, C. (1999) Forging a link between biofilms and disease, *Science.* 283, 1837, 1839.
 52. Cashel, M., Gentry, D. R., Hernandez, V. J. and Vinella, D. (eds). . (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, *Washington, D.C.*, 1400-1416.
 53. Betzner, A. S., Ferreira, L. C., Holtje, J. V., and Keck, W. (1990) Control of the activity of the soluble lytic transglycosylase by the stringent response in *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol Lett.* 55, 161-164.
 54. Richards, J., and Melander, C. (2009) Controlling bacterial biofilms, *Chembiochem* 10, 2287-2294.
 55. Cloete, T. (2003) Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds, *Int. Biodet. Biodegrad* 51, 277-282.
 56. Bosch, A., Serra, D., Prieto, C., Schmitt, J., Naumann, D., and Yantorno, O. (2006) Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy, *Appl Microbiol Biotechnol.* 71, 736-747. Epub 2005 Nov 2016.
 57. Serra, D., Bosch A., Russo, D., Rodriguez, M., Zorreguieta, A., Schmitt, J., Naumann, D., and O. Yantorno. (2007) Continuous nondestructive monitoring of *Bordetella pertussis* biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy and other corroborative techniques, *Anal Bioanal Chem* 387, 1759-1767.
 58. Serra, D. O., Lucking, G., Weiland, F., Schulz, S., Gorg, A., Yantorno, O. M., and Ehling-Schulz, M. (2008) Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*, *Proteomics.* 8, 4995-5010.

59. Vilain, S., Cosette, P., Hubert, M., Lange, C., Junter, G. A., and Jouenne, T. (2004) Comparative proteomic analysis of planktonic and immobilized *Pseudomonas aeruginosa* cells: a multivariate statistical approach, *Anal Biochem.* 329, 120-130.
60. Vilain, S., and Brozel, V. S. (2006) Multivariate approach to comparing whole-cell proteomes of *Bacillus cereus* indicates a biofilm-specific proteome, *J Proteome Res.* 5, 1924-1930.
61. Mikkelsen, H., Duck, Z., Lilley, K. S., and Welch, M. (2007) Interrelationships between colonies, biofilms, and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol.* 189, 2411-2416. Epub 2007 Jan 2412.
62. Branda, S. S., Vik, S., Friedman, L., and Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited, *Trends Microbiol.* 13, 20-26.
63. Elomaa, A., Advani, A., Donnelly, D., Antila, M., Mertsola, J., Hallander, H., and He, Q. (2005) Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates in finland, where the whole-cell pertussis vaccine has been used for 50 years, *J Clin Microbiol.* 43, 3681-3687.
64. Fingerhann, M., Fernandez, J., Sisti, F., Rodriguez, M. E., Gatti, B., Bottero, D., Graieb, A., Gaillard, M. E., Ayala, S. G., Mooi, F. R., Lopardo, H., and Hozbor, D. (2006) Differences of circulating *Bordetella pertussis* population in Argentina from the strain used in vaccine production, *Vaccine.* 24, 3513-3521. Epub 2006 Feb 3528.
65. O'Toole, G. A., and Kolter, R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis, *Mol Microbiol.* 28, 449-461.
66. Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
67. Naumann, D., Helm, D. and H. Labischinski (1991) Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy, *Nature* 351, 81-82.
68. Waite, R. D., Papakonstantinou, A., Littler, E., and Curtis, M. A. (2005) Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* growth: comparison of gene expression in planktonic cultures and developing and mature biofilms, *J Bacteriol.* 187, 6571-6576.
69. Spoering, A. L., and Lewis, K. (2001) Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials, *J Bacteriol.* 183, 6746-6751.
70. Mastrantonio, P., Spigaglia, P., van Oirschot, H., van der Heide, H. G., Heuvelman, K., Stefanelli, P., and Mooi, F. R. (1999) Antigenic variants in *Bordetella pertussis* strains isolated from vaccinated and unvaccinated children, *Microbiology.* 145, 2069-2075.
71. Botero, D., Gaillard, M., Fingerhann, M., Weltman, G., Fernandez, J., Sisti, F., Graieb, A., Roberts, R., Rico, O., Rios, G., Regueira, M., Binztein, N., and Hozbor, D. (2007) Pulsed-Field gel electrophoresis, Pertactin, Pertussis Toxin S1 subunit polymorphisms and surface analysis of vaccine and chemical *Bordetella pertussis* strains, *Clin Vacc immunol* 14, 1490-1498.

CAPÍTULO IV

Detección e identificación de moléculas señal de Quórum Sensing del tipo Acil-homoserín lactonas en *Bordetella pertussis*

ÍNDICE DEL CAPÍTULO IV	Página
IV.1- INTRODUCCIÓN	137
IV.1.1- Comunicación intercelular bacteriana.....	137
IV.1.2- Sistemas de comunicación celular mediados por Quórum Sensing	137
IV.1.3- Moléculas señal de Quórum Sensing.....	138
IV.1.4- Funciones controladas por Quórum Sensing.....	142
IV.1.5- Quórum Sensing en bacterias Gram-negativas.....	142
IV.1.6- El sistema LuxI/LuxR de <i>V. fischeri</i>	143
IV.1.7- Familias de sintasas de AHLs.....	145
IV.1.7.1- <i>Sintasas homólogas a la enzima Lux I</i>	146
IV.1.7.2- <i>Sintasas homólogas a la enzima LuxM</i>	147
IV.1.7.3- <i>Sintasas homólogas a la enzima HdtS</i>	148
IV.1.8- Quórum Sensing dependiente de AHLs en bacterias patógenas humanas.....	150
IV.1.9- Quórum Sensing y biofilms.....	151
IV.1.10- Terapia antimicrobiana basada en Quórum Sensing.....	152
IV.1.11- Objetivos del capítulo	153
IV.2- MATERIALES Y MÉTODOS	154
IV.2.1- Estudios bioinformáticos: Búsqueda de homología con sintasas de AHLs	154
IV.2.2- Microorganismos	154
IV.2.2.1- <i>Bordetella pertussis</i>	154
IV.2.2.2- <i>Cepas biosensoras</i>	155
IV.2.2.3- <i>Bacterias productoras de AHLs</i>	157
IV.2.2.4- <i>Bacteria deficiente en la producción de AHL</i>	158
IV.2.3- Estándares de acil-homoserín lactonas	158
IV.2.4- Preparación de cultivos de <i>B. pertussis</i>	158
IV.2.4.1- <i>Cultivos en medio sólido</i>	158
IV.2.4.2- <i>Cultivos planctónicos</i>	159
IV.2.4.3- <i>Cultivos en Biofilm</i>	160

IV.2.4.4- Cultivos planctónicos de bacterias productoras de AHLs	161
IV.2.5- Extracción de AHLs.....	161
IV.2.5.1- Tratamiento de sobrenadantes de cultivo	161
IV.2.5.2- Extracción de AHLs de sobrenadantes de cultivo	162
IV.2.5.3- Extracción de medios de cultivo sin inocular.....	162
IV.2.6- Calibración del ensayo de detección de AHLs en placa de Petri	163
IV.2.7- Búsqueda de un medio de cultivo apto para la detección de AHLs en <i>B. pertussis</i>	163
IV.2.8- Detección de Acil-homoserín-lactonas	164
IV.2.8.1- Bioensayo de detección de AHLs en placa de Petri	164
IV.2.8.2- Bioensayo de detección de AHLs por difusión	165
IV.2.8.3- Ensayo combinado de detección de AHLs	166
IV.2.9- Análisis de la producción de AHLs en función de las fases de crecimiento de cultivos líquidos	166
IV.2.10- Cuantificación de Acil-homoserín-lactonas	167
IV.2.10.1- Separación de AHLs mediante cromatografía en placa delgada	167
IV.2.10.2- Detección de AHLs en placas TLC	168
IV.2.11- Estimación de la concentración de AHLs producida por cultivos de <i>B. pertussis</i>	168
IV.2.12- Análisis de la inducción de cepas biosensoras por ácidos grasos.....	169
IV.2.13- Identificación de AHL mediante métodos físico-químicos.....	169
IV.2.13.1- Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier	169
IV.2.13.2- Cromatografía gaseosa-espectroscopía de masas	170
IV.2.13.3- Identificación mediante HPLC MS/MS-MRM	172
IV.3- RESULTADOS	173
IV.3.1- Búsqueda de homología con sintasas de AHLs.....	173
IV.3.2- Cultivos líquidos y en biofilm	183
IV.3.3- Calibración del ensayo de detección de AHLs en placa de Petri	183
IV.3.4- Búsqueda de un medio de cultivo sólido para la detección de AHLs en <i>B. pertussis</i>	185

IV.3.5- Detección de Acil-homoserín-lactonas en <i>B. pertussis</i>	189
IV.3.5.1- <i>Ensayo de detección de AHLs en cultivos en medio sólido</i>	189
IV.3.5.2- <i>Detección de AHLs a partir de extractos de cultivos de B. pertussis</i>	192
IV.3.5.3- <i>Detección de AHLs mediante ensayo combinado</i>	197
IV.3.6- Análisis de la producción de AHLs durante el crecimiento de <i>B. pertussis</i> en medio líquido	197
IV.3.7- Cromatografía en placa delgada de extractos de cultivo.....	199
IV.3.8- Estimación de la concentración de AHLs producida por <i>B. pertussis</i>	202
IV.3.9- Análisis de inducción de cepas biosensoras por acción de ácidos grasos.....	204
IV.3.10- Identificación de acil-homoserín lactonas.....	205
IV.3.10.1- <i>Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier</i>	205
IV.3.10.2- <i>Cromatografía gaseosa-espectroscopía de masas</i>	209
IV.3.10.3- <i>Identificación de AHLs mediante HPLC MS/MS-MRM</i>	218
IV.4- DISCUSIÓN	224
IV.5- REFERENCIAS	227

IV.1- INTRODUCCIÓN

IV.1.1- Comunicación intercelular bacteriana

Durante muchas décadas se ha considerado a las bacterias como unidades autónomas dentro de una población celular. Sin embargo, en los últimos 30 años se ha hecho evidente que lejos de vivir en forma aislada, las bacterias pueden llevar a cabo interacciones sociales dentro de la misma especie, entre especie diferentes e inclusive entre distintos reinos (procariota-eucariota). Estas interacciones confieren a las bacterias la capacidad de desarrollar comportamientos cooperativos en respuesta a desafíos ambientales (temperatura, nutrientes, presión, oxígeno, pH, etc.) utilizando sofisticados sistemas o redes de comunicación intercelular (1). La comunicación célula-célula entre bacterias es mediada por moléculas señal o feromonas sintetizadas y secretadas por las mismas bacterias. La producción de estas moléculas puede tener lugar en función de la densidad bacteriana, en tal caso se las ha denominado de Quórum-Sensing (2) o puede estar relacionada a una fase específica del crecimiento como ocurre por ejemplo con el indol, el cual es producido por *E. coli* durante la fase estacionaria de crecimiento (3-4). Los sistemas de comunicación celular regulan la expresión o represión de ciertos genes y de esta manera consiguen controlar diversos procesos fenotípicos poblacionales en numerosas bacterias tanto Gram-negativas como Gram-positivas (5-6). Se debe considerar que en casi todos los ambientes, una comunidad bacteriana contiene múltiples especies que normalmente se encuentran en asociación estrecha con organismos eucariontes, ya sea a través de una relación patológica, simbiótica o de comensalismo. Por lo tanto, los sistemas de comunicación que regulan los distintos tipos de interacciones constituyen una estrategia de supervivencia adaptativa que permite a las bacterias monitorear su entorno y ajustar su comportamiento en respuesta a desafíos ambientales y fluctuaciones poblacionales (7).

IV.1.2- Sistemas de comunicación celular mediados por Quórum Sensing

El sistema de comunicación intercelular que depende de la densidad poblacional de microorganismos para iniciar acciones cooperativas fue denominado Quórum-Sensing (detección por quórum) por Fuqua, Winans y Greenberg en 1994 (8). El sistema de Quórum-Sensing (QS) consiste en un evento por el cual un aumento en la densidad poblacional bacteriana resulta concomitante con un incremento en la producción y secreción, al ambiente extracelular, de moléculas señal. A través de la concentración de estas moléculas, la bacteria es capaz de determinar o censar la densidad poblacional en el medio. Cuando la

concentración de la molécula señal ha alcanzado un nivel umbral, la activación de una cascada de transducción de señales favorece la expresión, des-represión e incluso la represión de genes blanco. Esta regulación génica permite controlar diversos procesos fisiológicos y morfológicos a nivel poblacional, en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (9-10). Es importante mencionar que distintos sistemas de QS están involucrados en asociaciones patogénicas o simbióticas entre bacterias y plantas o animales (incluyendo los humanos), causando de esta manera enfermedades o relaciones beneficiosas respectivamente (11-13). En algunas instancias, los genes responsables de la síntesis de señales de QS son regulados positivamente, convirtiendo a la producción de estas moléculas en un evento de autoinducción. Por este motivo las moléculas señal son conocidas también como autoinductores (AI). Gran variedad de compuestos pueden ser empleados como moléculas señal. Asimismo, en muchas especies bacterianas más de una clase de molécula señal, en conjunto con su aparato de transducción de señales, conforman circuitos de comunicación que controlan a la población bacteriana a través de la regulación de diversos genes (9).

IV.1.3- Moléculas señal de Quórum Sensing

Las señales químicas involucradas en los sistemas de comunicación intercelular de QS son generalmente moléculas pequeñas y difusibles, pudiendo encontrarse en el medio de cultivo agotado después del crecimiento bacteriano. En la mayor parte de los casos la producción de los distintos tipos de moléculas de QS solo ocurre cuando están presentes factores como la temperatura óptima, factores dependientes del hospedador y nutrientes del medio (14). Las moléculas de QS se definen por medio de los siguientes criterios (14):

- 1- La síntesis debe producirse en función de la densidad celular bajo ciertas condiciones fisiológicas.
- 2- Las moléculas señal se deben acumular extracelularmente y ser reconocidas por un receptor específico.
- 3- La acumulación de las moléculas debe ocasionar una respuesta concertada, una vez alcanzada la concentración umbral.
- 4- La respuesta celular generada debe ser distinta de los cambios fisiológicos necesarios para metabolizar o detoxificar la molécula señal.

Hasta la actualidad, se han descrito un gran número de moléculas de QS agrupadas en diferentes familias. Asimismo, se ha descubierto que distintas bacterias utilizan más de una molécula señal o incluso más de un tipo de señal para comunicarse dentro de la misma

especie o a nivel interespecífico. Asimismo, es importante mencionar que algunas moléculas señal pueden interactuar con receptores celulares de organismos eucariontes, incluyendo mamíferos, regulando distintos procesos y respuestas fisiológicas (15-16). A continuación se describen las principales moléculas señal de QS reportadas:

1) *N*-Acil-L-homoserín lactonas (AHLs)

Son moléculas producidas por bacterias Gram-negativas a partir del sustrato *S*-adenosilmetionina (SAM) y ácidos grasos. Fueron identificadas por primera vez en la bacteria bioluminiscente marina *Vibrio fischeri* (17), que constituye el paradigma de los sistemas de comunicación mediados por QS en bacterias Gram-negativas. Conocidas como autoinductores de tipo 1 (AI-1), las AHLs poseen una elevada diversidad conformacional debido a que difieren en la longitud y grado de insaturación de la cadena lateral acilada, como así también en las posibles sustituciones ubicadas en el carbono 3 de dicha cadena (18-19). El largo de la cadena acilada varía entre 4 y 18 carbonos y las sustituciones pueden ser carbonilos o hidroxilos. Las insaturaciones -dobles o triples enlaces- se pueden presentar en la posición C-7 y C-8 de la cadena acilada (20-21). La gran variedad de las cadenas aciladas asegura la producción de diferentes moléculas AHLs. En la Figura 1 se muestra la estructura de distintos tipos de AHLs producidas por bacterias Gram-negativas: *N*-acil-L-HSL, *N*-3-oxo-acil-L-HSL y *N*-3-hidroxi-acil-L-HSL. Estequiométricamente, se ha establecido que el carbono α del anillo homoserín lactona presenta una conformación isométrica L en todas las AHLs naturales (22). Asimismo, es importante destacar que el carácter difusible de las AHLs depende de la longitud de la cadena acilada. Las AHLs de cadena corta difunden libremente a través de la membrana plasmática, mientras que las de

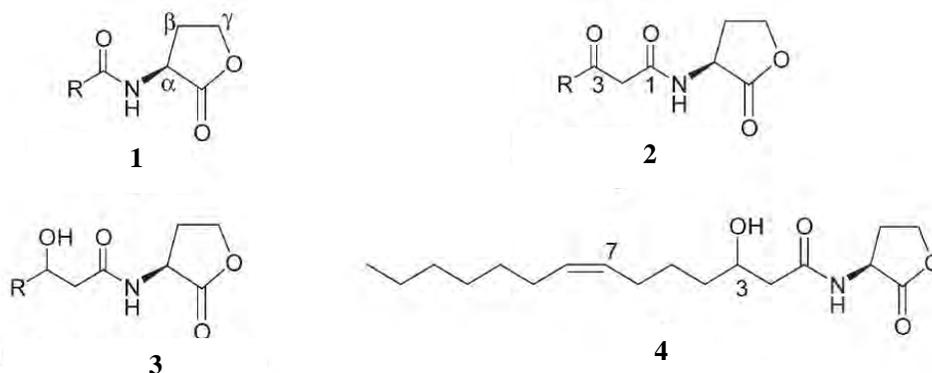


Fig. 1. Estructura de diferentes AHLs producidas por bacterias Gram-negativas. Las AHLs están compuestas por un anillo homoserín lactona no sustituido en posición β y γ , el cual está *N*-acilado con un ácido graso en posición α . La cadena acilada puede variar su largo, nivel de saturación y estado de oxidación. 1) *N*-acil-L-HSL, 2) *N*-3-oxo-acil-L-HSL, 3) *N*-3-hidroxi-acil-L-HSL y 4) *N*-3-hidroxi-7-*cis*-tetradecenoil-HSL. Tomado del trabajo de Chhabra y col (2005).

cadena larga precisan de bombas para su transporte (23-24). En la Tabla 1 se describe la longitud de la cadena acilada y el tipo de sustituyente en posición C-3 de algunas AHLs. La concentración intracelular de estas moléculas depende de su concentración en el medio extracelular, la cual solo aumenta cuando hay una suficiente población de las bacterias productoras de dicha señal (25). Estas moléculas señal intervienen en la comunicación bacteriana intraespecie (2, 9, 25).

Tabla 1. Composición química de algunas acil-homoserín lactonas (AHLs). Se indica la fórmula molecular de la cadena lateral acilada y las abreviaturas, generalmente empleadas, para distintas AHLs.

Compuesto Químico	Fórmula molecular de la cadena acilada	Abreviaturas
<i>N</i> -Butanoíl-L-homoserín lactona	CH ₃ CH ₂ CH ₂	C ₄ -HSL / BHL
<i>N</i> -3-oxo-Butanoíl-L-homoserín lactona	CH ₃ COCH ₂	3-oxo-C ₄ -HSL / OBHL
<i>N</i> -Hexanoíl-L-homoserín lactona	CH ₃ (CH ₂) ₄	C ₆ -HSL / HHL
<i>N</i> -3-oxo-Hexanoíl-L-homoserín lactona	CH ₃ (CH ₂) ₂ COCH ₂	3-oxo-C ₆ -HSL / OHHL
<i>N</i> -Octanoíl-L-homoserín lactona	CH ₃ (CH ₂) ₆	C ₈ -HSL / OHL
<i>N</i> -3-oxo-Octanoíl-L-homoserín lactona	CH ₃ (CH ₂) ₄ COCH ₂	3-oxo-C ₈ -HSL / OOHL
<i>N</i> -Decanoíl-L-homoserín lactona	CH ₃ (CH ₂) ₈	C ₁₀ -HSL / DHL
<i>N</i> -3-oxo-Decanoíl-L-homoserín lactona	CH ₃ (CH ₂) ₆ COCH ₂	3-oxo-C ₁₀ -HSL / ODHL
<i>N</i> -Dodecanoíl-L-homoserín lactona	CH ₃ (CH ₂) ₁₀	C ₁₂ -HSL / dDHL
<i>N</i> -3-oxo-Dodecanoíl-L-homoserín lactona	CH ₃ (CH ₂) ₈ COCH ₂	3-oxo-C ₁₂ -HSL / OdDHL
<i>N</i> -3-hidroxi-dodecanoíl-L-homoserín lactona	CH ₃ (CH ₂) ₈ COHCH ₂	3-hidroxi-C ₁₂ -HSL / HdDHL
<i>N</i> -Tetradecanoíl-L-homoserín lactona	CH ₃ (CH ₂) ₁₂	C ₁₄ -HSL / tDHL
<i>N</i> -3-oxo-Tetradecanoíl-L-homoserín lactona	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COCH ₂	3-oxo-C ₁₄ -HSL / OtDHL

Se ponen de manifiesto las diferencias en la longitud de la cadena acilada lateral y el tipo de sustituyente en la posición C-3, el cual puede ser carbonilo o hidroxilo. Tomado de los trabajos publicados por Bainton y col (1992) y Chhabra y col (2005).

2) Autoinductores peptídicos (AIPs)

Son péptidos pequeños sintetizados por bacterias Gram-positivas que interactúan con sistemas de 2 componentes encargados a su vez, de regular la transcripción de genes específicos. Los AIPs son procesados a partir de un prepéptido y modificados antes o después de ser secretados mediante transportadores de membrana. En casi todos los casos, los AIPs exportados son reconocidos por proteínas kinasas sensoras ubicadas en las

membranas de las mismas bacterias. Como consecuencia, se produce una transducción de señales mediante una cascada de fosforilación que culmina en la activación de la proteína reguladora de la respuesta, la cual modula la transcripción de ciertos genes involucrados en diferentes procesos bacterianos. Estas moléculas, al igual que las AHLs, intervienen en la comunicación célula-célula intraespecie (25-26). Algunas de las bacterias que disponen de este sistema de comunicación son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Bacillus subtilis* (27-29).

3) Diester Furanosil Boratos

Conocidas como autoinductores de tipo 2 (AI-2), estas moléculas fueron identificadas por primera vez en la bacteria marina *Vibrio harveyi*. Su composición es completamente diferente a las AHLs, aunque su anillo base es el mismo. Al igual que las AHLs, el diester furanosil borato se produce a partir de SAM. La enzima que cataliza su síntesis en *V. harveyi* se denomina LuxS (30). Esta molécula señal es sintetizada y reconocida por bacterias Gram-negativas así como por Gram-positivas, por lo cual se considera que está implicada en la comunicación bacteriana interespecie, conocida también como sistema de comunicación universal (31). Este sistema de comunicación otorga a una bacteria la capacidad de evaluar o censar la densidad poblacional de otras especies bacterianas dentro de comunidades mixtas (32-33). Existe una gran variedad de bacterias que presentan genes ortólogos a *luxS* y que codifican para enzimas homólogas a LuxS. Entre éstas bacterias se encuentran especies de los géneros *Bacillus*, *Campylobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Salmonella*, *Sinorhizobium*, *Streptococcus*, *Yersinia*, etc (9, 34).

4) Autoinductores de tipo 3 (AI-3)

Este tipo de moléculas, recientemente descubiertas, participan de complejos circuitos de comunicación que involucran proteínas kinasas receptoras, similares a las presentes en los sistemas de transducción de señales de dos componentes. Análisis estructurales de los AI-3 sugieren que estas moléculas señal son compuestos aromáticos (35). Sperandio y col (36) determinaron, a partir de estudios con voluntarios humanos, que bacterias de la flora intestinal normal, como las comensales *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* son capaces de producir este tipo de molécula de señalización. Asimismo, ciertas bacterias enteropatógenicas como *Shigella sp*, *Salmonella sp* y algunas cepas de *E. coli* presentan la capacidad de sintetizar AI-3. En estos casos el sistema de QS dependiente de AI-3 regula la expresión de una gran variedad de genes de virulencia (35). Los AI-3 además de participar de la señalización intraespecie e interespecie exhiben una función

intrínseca en la comunicación inter-reino debido a que dichos autoinductores y las hormonas eucariontes epinefrina y norepinefrina pueden ser reconocidas por el mismo receptor de membrana en *E. coli* enterohemorrágica, generando un efecto agonista en la transcripción de los genes de virulencia (36).

Otras moléculas que intervienen en sistemas de comunicación bacterianos son: a) Diketopiperacinas o dipéptidos cíclicos, los cuales son sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. alcaligenes*, *Enterobacter agglomerans* y *Citrobacter freundii* (37), b) 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona, conocida como señal quinolona de *Pseudomonas* (PQS: Pseudomonas Quinolona Signal) producida por *Pseudomonas aeruginosa* (38), c) las moléculas butirolactonas sintetizadas por *P. aureofaciens* (39), d) la molécula volátil metil-ester del ácido 3-hidroxi palmítico (PAME: Palmitic Acid Metil Ester), producida por el fitopatógeno *Ralstonia solanacearum* (40), y e) el ácido *cis*-11-metildodecenoico (DSF: Diffusible Signal Factor) sintetizado por el fitopatógeno *Xanthomonas campestris* (41).

IV.1.4- Funciones controladas por Quórum Sensing

A través del sistema de QS las bacterias pueden coordinar diversos comportamientos y funciones tal como si fueran organismos multicelulares. Las actividades controladas por QS son improductivas cuando se llevan a cabo por escasas células bacterianas pero se convierten en efectivas por la acción simultánea de un número elevado de bacterias (8-9). Algunos procesos regulados por QS son: producción de bioluminiscencia, expresión de factores de virulencia, formación de biofilm, esporulación, biosíntesis de antibióticos y bacteriocinas, síntesis de exopolisacárido capsular, transferencia de plásmidos por conjugación, nodulación, fijación de nitrógeno y los movimientos tipo *swarming*, *swimming* y *twitching* (5-6). En resumen, los genes activados por los distintos sistemas de QS están involucrados en 3 grandes tipos de eventos o procedimientos fisiológicos: 1) Procesos de acción en masa en los que la actividad de una sola bacteria sería inútil, desde la producción de bioluminiscencia hasta la iniciación de procesos de virulencia, 2) Competencia por nutrientes, funciones de diseminación y producción de antibióticos y 3) Procesos involucrados en el desarrollo bacteriano como la formación de biofilms.

IV.1.5- Quórum Sensing en bacterias Gram-negativas

Los sistemas de comunicación mediados por QS en bacterias Gram-negativas que han sido descritos con mayor minuciosidad, son aquellos que utilizan a las acil-homoserín lactonas

como moléculas señal. Estos sistemas de QS requieren de una enzima específica para la síntesis de AHLs a partir de los sustratos celulares SAM y ácidos grasos (42-44). Conforme aumenta la densidad poblacional bacteriana, las AHLs secretadas se acumulan en el medio extracelular hasta que, al alcanzar una concentración determinada, son incorporadas nuevamente al interior celular donde interactúan con proteínas reguladoras de la transcripción. Luego el complejo AHL-proteína reguladora es capaz de modular la expresión de genes involucrados en diferentes procesos fisiológicos (45-46).

El sistema de control de la producción de bioluminiscencia en *Vibrio fischeri* fue el primer sistema de QS en ser descrito en su totalidad y sigue siendo el mejor caracterizado, lo que lo ha convertido en el modelo de los sistemas de QS en bacterias Gram-negativas (47).

En los últimos años se han identificado los circuitos de comunicación por QS mediados por AHLs correspondientes a más de 100 bacterias Gram-negativas. En la mayoría de los casos estos circuitos son semejantes al sistema canónico de *V. fischeri*, por lo cual incluyen una enzima responsable de la síntesis de AHLs y una proteína receptora de dicha señal la cual actúa también como reguladora de la transcripción (16). En la Tabla 2 se describen sistemas de señalización de QS, homólogos al sistema canónico LuxI/LuxR de la bacteria *V. fischeri*.

IV.1.6- El sistema LuxI/LuxR de *V. fischeri*

El mecanismo de QS se describió por primera vez, como se indicó previamente, en la bacteria marina *V. fischeri*, para explicar la generación de bioluminiscencia en el interior de los órganos especializados -llamados órganos luminosos- de algunas especies de peces y calamares, que la bacteria coloniza (17). Estos organismos utilizan la luz provista por *V. fischeri* para protegerse del ataque de sus predadores, mientras que la bacteria simbiote se beneficia porque los órganos que coloniza son ricos en nutrientes permitiéndole alcanzar una elevada proliferación (48). La emisión de luz por acción de *V. fischeri* es controlada por los genes *lux* los cuales se organizan en dos unidades transcripcionales divergentes y separadas por 219 pares de bases. Una de estas unidades contiene siete genes conformando el operón *luxICDABEG*, mientras que la otra posee únicamente el gen *luxR*. El gen *luxI* codifica para la acil-homoserín lactona sintasa LuxI, la cual cataliza la síntesis de *N*-3-oxo-hexanoil-L-homoserín lactona (3-oxo-C₆-HSL). El gen *luxR* codifica para la proteína citoplasmática LuxR que es simultáneamente el receptor de la AHL y el activador transcripcional del operón *luxICDABEG* (49). Los otros genes del operón están implicados en la producción de luz: *luxA* y *luxB* codifican las subunidades α y β de la enzima luciferasa, *LuxC*, *luxD* y *luxE* codifican los componentes del complejo enzimático reductasa de ácidos grasos, responsables

Tabla 2. Sistemas de Quórum Sensing homólogos al sistema LuxI/LuxR de *V. fischeri*

Organismo	Sistema de regulación	AHL	Función controlada
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	TraI/TraR	OOHL	Transferencia del plásmido Ti por conjugación
<i>Burkholderia cepacia</i>	CepI/CepR	HHL, OHL	Síntesis de proteasas y formación de biofilms
<i>Chromobacterium violaceum</i>	CviI/CviR	HHL	Síntesis de pigmentos, antibióticos y exoproteasas
<i>Erwinia carotovora</i>	ExpI/ExpR CarI/CarR	OHHL OHHL	Síntesis de exoenzimas Síntesis de antibióticos
<i>Erwinia sterwartii</i>	EsaI/EsaR	OHHL	Síntesis de polisacáridos capsulares
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LasI/LasR RhlI/RhlR	OdDHL BHL	Síntesis de exoproteasas y formación de biofilms Síntesis de proteasa alcalina y rhamnolípidos
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	RhiI/RhiR	HHL, OHL 7ΔHtDHL	Nodulación y transferencia de plásmidos
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	CerI/CerR	tDHL	Represión de la agregación celular
<i>Yersinia Pseudotuberculosis</i>	YpsI/YpsR YtbI/YtbR	HHL, OHHL, OHpHL OHL, OOHL, HOHL ODHL	Agregación por contacto célula-célula y movilidad mediada por flagelos

Se indican las AHLs producidas y la función controlada por: *Agrobacterium tumefaciens* (Hwang y col 1994), *Burkholderia cepacia* (Lewenza y col 1999), *Chromobacterium violaceum*, (Mc Clean y col 1997), *Erwinia carotovora* (Bainton y col 1992), *Erwinia sterwartii* (Von Bodman y Farrand 1995), *Pseudomonas aeruginosa* (Chapon-Herve y col 1997, Pearson y col 1995), *Rhodobacter sphaeroides* (Puskas y col 1997), *Yersinia Pseudotuberculosis* (Ortori y col 2007), *Rhizobium leguminosarum* (Cubo y col 1992, Rodelas y col 1999). **BHL**: Butanoil homoserín lactona, **HHL**: Hexanoil homoserín lactona, **OHpHL**: oxo-heptanoil homoserín lactona, **OHL**: Octanoil homoserín lactona, **OOHL**: oxo-octanoil homoserín lactona, **HOHL**: hidroxioctanoil homoserín lactona, **ODHL**: oxo-decanoil homoserín lactona, **OdDHL**: oxo-dodecanoil homoserín lactona, **tDHL**: tetradecanoil homoserín lactona, **7Δ HtDHL**: *N*-(3-hidroxi-7-cis-tetradecenoil) homoserín lactona.

de la síntesis y reciclaje del aldehído, el cual sirve de sustrato para la luciferasa, y *LuxG* codifica una enzima reductasa del mononucleótido de flavina que genera el otro sustrato de la luciferasa, un mononucleótido de flavina reducido (FMNH₂) (50). La oxidación intracelular de estos 2 sustratos, por acción de la enzima luciferasa, resulta en la producción de luz (51).

A bajas densidades celulares de *V. fischeri* la transcripción del operón *luxICDABEG* es escasa, lo que ocasiona una reducida síntesis de 3-oxo-C₆-HSL y una inapreciable producción de bioluminiscencia. La molécula señal difunde libremente a través de la membrana, por lo que la concentración de AHL es la misma en el medio y en el interior

celular. A medida que el número de células se incrementa en el órgano luminoso, la concentración de 3-oxo-C₆-HSL aumenta hasta alcanzar el nivel umbral, que es suficiente para ser detectada por la proteína receptora LuxR. La unión de la AHL a la proteína LuxR provoca su dimerización formando el complejo AHL-LuxR. Asimismo, la interacción entre la AHL y la proteína LuxR expone el dominio de unión a DNA de LuxR, lo que le permite unirse al promotor del operón *luxICDABEG*, en la zona altamente conservada denominada *caja lux*, incrementando así la transcripción de los genes de dicho operón. Esto genera como resultado un aumento exponencial tanto de la concentración de AHL como de la emisión de luz por acción de las enzimas sintetizadas (2, 47) (Fig. 2.) Simultáneamente, el complejo AHL-LuxR reprime la transcripción del gen *luxR*, generándose un mecanismo de retroalimentación negativa compensatorio que limita la expresión de *luxICDABEG* (52). El gen *luxR* está a su vez regulado por estímulos ambientales exógenos, como las elevadas temperaturas y el AMPc que estimulan la transcripción de dicho gen (52).

IV.1.7- Familias de sintasas de AHLs

Se conocen 3 familias de enzimas encargadas de la síntesis de moléculas acil-homoserín lactonas en bacterias Gram-Negativas. Estas enzimas son aciltransferasas que catalizan la unión entre la S-adenosilmetionina (SAM), fuente del motivo homoserín lactona, y una cadena acilada, la cual puede ser aportada por una proteína carrier de grupos acilos (AcyCarrier Protein, ACP) o por la coenzima A (CoA) (43-44, 53-54). Para los distintos tipos de sintasas de AHLs, es probable que primero se produzca la unión de SAM a la enzima, para luego unirse a la misma la proteína ACP o la CoA transportando un ácido graso para formar de esta manera una unión amida entre SAM y la cadena acilada. Luego se genera el ciclado de la molécula acil-SAM liberando la AHL y 5-metiltioadenosina (42-43, 55). Cabe precisar que ciertas sintasas de AHL, pertenecientes a las distintas familias de sintasas, catalizan la síntesis de más de un tipo de AHL. Algunas bacterias del género *Rhizobium* producen distintas moléculas AHLs por medio de sintasas cuyos genes se localizan en el cromosoma como así también en plásmidos (56). Las 3 familias de sintasas de AHLs descriptas hasta el momento son las siguientes a) Familia I: Sintasas homólogas a la enzima Lux I (43-44), b) Familia II: Sintasas homólogas a la enzima Lux M (32, 57) y c) Familia III: Sintasas homólogas a la enzima HdtS (58-59). Cabe precisar que, las sintasas de AHLs pertenecientes a diferentes familias no presentan similitud significativa a pesar de que todas participan en la síntesis de acil-homoserín lactonas, a partir de los sustratos mencionados (7).

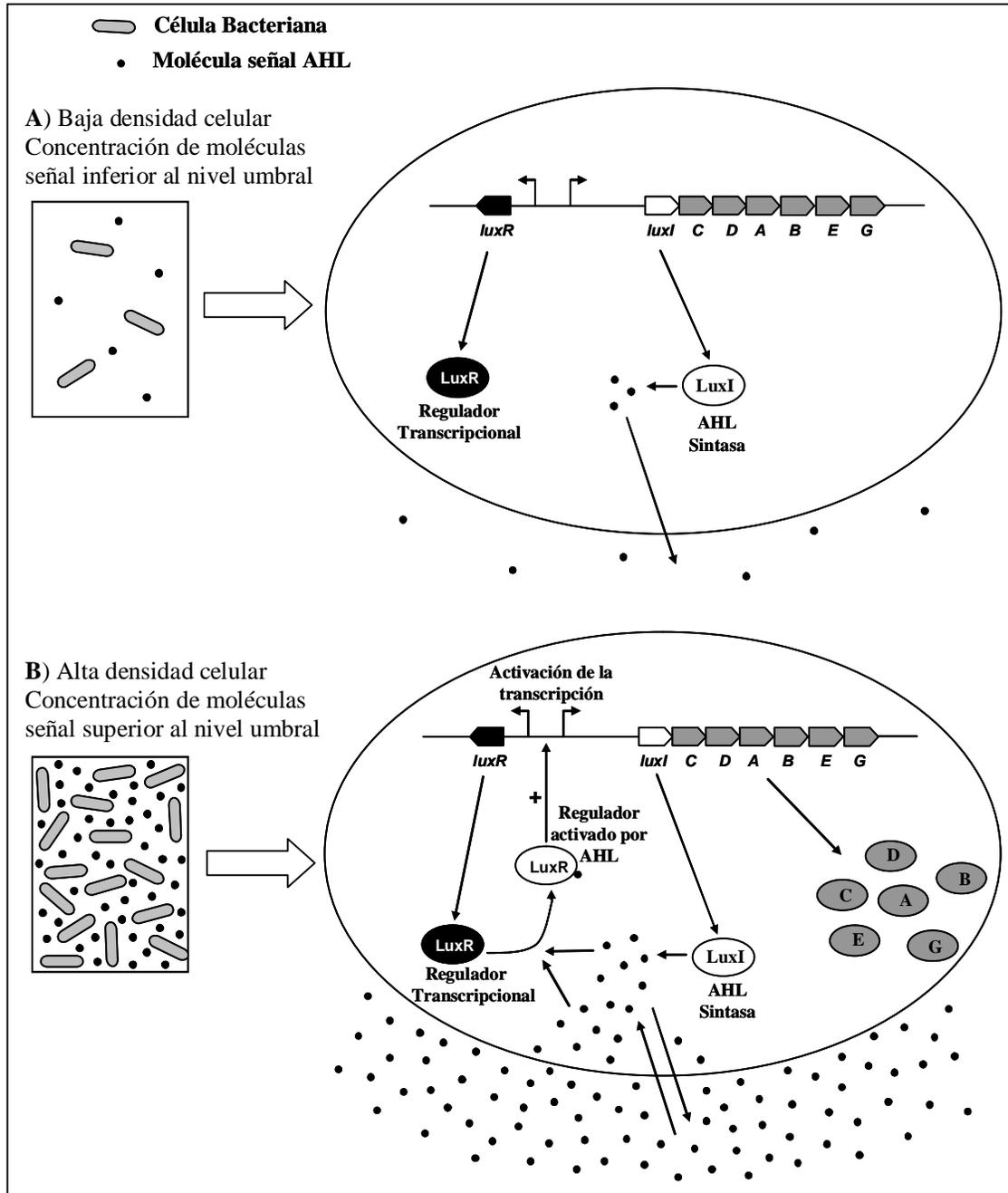


Fig. 2. Regulación de la transcripción de los genes *lux* de *V. fischeri* mediante Quórum Sensing. A: Cuando la densidad celular es baja, la concentración de AHLs no alcanza el valor umbral para unirse a LuxR, de modo que los genes *lux* se transcriben a bajos niveles. B: A elevada densidad celular, las moléculas señal superan el umbral de concentración, activan a LuxR y esta estimula la transcripción del operón *luxICDABEG*. Tomado de Fuqua y col (1994) y Dunlap (1999).

IV.1.7.1- Sintetas homólogas a la enzima *Lux I*

La enzima LuxI es generada por la bacteria *V. fischeri* y dirige la síntesis no solo de la molécula 3-oxo-C₆-HSL sino también de C₆-HSL. El gen *luxI* se transcribe de forma

divergente al gen *luxR*, el cual codifica la proteína LuxR, receptora de las AHLs y regulador transcripcional de los genes *lux*. Las enzimas con homología a Lux I constituyen la Familia I de las sintasas de AHLs. Hasta el presente se conocen más de 100 sintasas homólogas a LuxI que sintetizan diferentes AHLs en bacterias Gram-negativas (7). Algunas sintasas homólogas a LuxI pueden dirigir la síntesis de más de una molécula distinta de AHL, como por ejemplo la sintasa SinI de *Sinorhizobium meliloti* Rm1021, la cual es capaz de sintetizar 5 moléculas AHLs diferentes, entre las cuales hay algunas con distintos tipos de sustituciones, una con una cadena acilada monoinsaturada y la AHL con la cadena acilada más larga (C₁₈) (47). Asimismo, ciertas bacterias producen más de una sintasa homóloga a LuxI, disponiendo del mismo número de proteínas homologas a LuxR y circuitos de QS, tal es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* (60), *Erwinia carotovora* (61) y *Yersinia Pseudotuberculosis* (62) (ver Tabla 2). Con respecto a los reguladores transcripcionales homólogos a LuxR, se ha descrito que están compuestos por los 2 dominios característicos de LuxR: el dominio N-terminal de unión a las AHLs y el dominio C-terminal de unión al DNA, a través del cual hacen contacto con el promotor de los respectivos genes que regulan (50). Es importante mencionar que, las proteínas de la familia LuxR pueden actuar como activadores, pero también como represores de la transcripción de sus genes diana (63). En algunos casos los genes que codifican para las proteínas homólogas a LuxI y para LuxR están ligados, mientras que la orientación entre dichos genes es variable (64). Las sintasas homólogas a LuxI exhiben una homología cercana al 35%, mientras que entre las proteínas homólogas a LuxR la homología es próxima al 25% (8, 10).

IV.1.7.2- Sintasas homólogas a la enzima LuxM

La enzima LuxM, producida por el patógeno *Vibrio harveyi*, es la responsable de la síntesis de la molécula 3-hidroxi-C₄-HSL la cual controla la expresión de genes de luminiscencia. LuxM es una proteína de 42.5 Kda y no exhibe homología con la enzima LuxI ni con la gran cantidad de sintasas homólogas a esta. De manera contigua y en la misma dirección al gen *luxM*, se encuentra el gen *luxN*, cuyo producto es la proteína LuxN, reguladora de este sistema de Quórum Sensing (65). Las enzimas con homología a Lux M componen la Familia II de las sintasas de AHLs. La enzima AinS, responsable de la síntesis de C₈-HSL en *V. fischeri*, pertenece a esta familia de sintasas. La región C-terminal de esta proteína presenta una identidad del 34% con la sintasa LuxM. Adyacente al gen *ainS* y con la misma orientación se encuentra el gen *ainR*, el cual codifica para la proteína reguladora AinR (55, 57). Otra enzima que pertenece a esta familia de sintasas es VanM, la cual cataliza la síntesis

de 3-hidroxi-C₆-HSL y C₆-HSL en el patógeno de peces *V. anguillarum*. La enzima VanM exhibe una identidad del 64% con LuxM y del 33% con AinS. Contiguo y en la misma dirección al gen *vanM* se ubica el gen que codifica la proteína reguladora VanR (66). Las proteínas reguladoras de los mencionados sistemas de QS (LuxN, AinR y VanR) presentan cierto nivel de homología entre sí (55, 57, 66).

IV.1.7.3- Sintetasas homólogas a la enzima HdtS

La enzima HdtS es una sintasa de AHLs identificada originalmente en *Pseudomonas fluorescens* F113 y dirige la síntesis de las moléculas C₆-HSL, C₁₀-HSL y 3-OH-C_{14:1}-HSL. Por lo tanto, al igual que algunas sintetasas de las otras familias, la enzima HdtS es capaz de sintetizar más de una AHL distinta. Esta enzima no tiene similitud significativa con las sintetasas de AHLs de la familia LuxI ni con las de la familia LuxM. La sintasa HdtS es una proteína de 33 kDa y esta codificada por el gen *hdtS* (58). HdtS es una aciltransferasa perteneciente a la familia 1-acil-sn-glicerol 3-fosfato O-aciltransferasas, conocidas como aciltransferasas del ácido lisofosfatídico. Estas enzimas catalizan la transferencia de una cadena acilada, desde la ACP o a partir de la CoA hacia el ácido lisofosfatídico, produciendo ácido fosfatídico. Es decir que este tipo de enzimas están involucradas en la biosíntesis de membrana celular a través del metabolismo de fosfolípidos (58, 67). Las enzimas homólogas a HdtS conforman la Familia III de las sintetasas de AHLs.

La proteobacteria acidófila *Acidithiobacillus ferrooxidans* posee un gen ortólogo al gen *hdtS* de *P. fluorescens* F113. Dicho gen fue denominado *act* por Rivas y *col* por estar involucrado en la función de transferencia de grupos acilos (*acil transfer function*) codificando para la proteína Act, homóloga a la enzima HdtS. Por tal motivo, dicha enzima presenta actividad de aciltransferasa catalizando la síntesis de C₁₄-HSL, entre otras AHLs de cadena larga (59). Es importante agregar que proteínas homólogas a la enzima HdtS de *P. fluorescens* F113, también pueden ser producidas por bacterias pertenecientes a los géneros: *Ralstonia* y *Burkholderia* (Familia Burkholderiaceae), *Herbaspirillum* y *Herminiimonas* (Familia Oxalobacteraceae) y *Achromobacter* (Familia Alcaligenaceae).

Todas las sintetasas de AHLs homólogas a HdtS son aciltransferasas pertenecientes a la familia 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato-O-aciltransferasas. Esta clase de sintetasas contiene 2 dominios altamente conservados responsables de las funciones de acilación. Asimismo, poseen en su secuencia de aminoácidos 2 motivos característicos, KHQSAWET y PEGTR, ambos flanqueados por aminoácidos hidrofóbicos. Estos motivos de aminoácidos están fuertemente conservados en las aciltransferasas del ácido lisofosfatídico tanto de

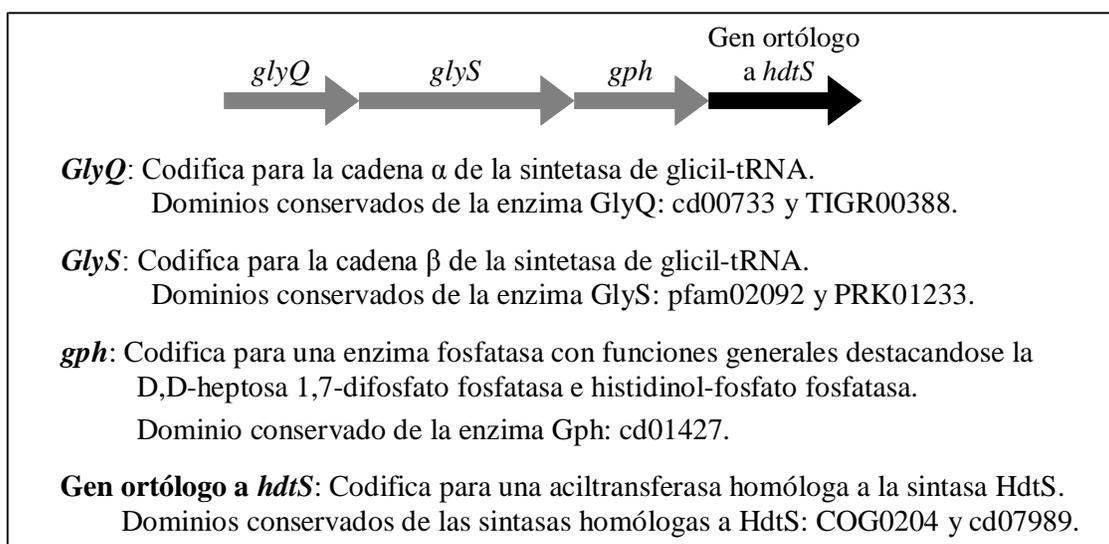
procariontes como de eucariontes (68). Estudios realizados por Shih y *col* (69) determinaron que dichos motivos aminoacídicos pueden constituir sitios de unión a la acil-CoA así como a la proteína carrier de grupos acilos. Asimismo, comprobaron que aminoácidos localizados fuera de estos motivos podrían alterar la especificidad de estas aciltransferasas (69), permitiendo la transferencia de un grupo acilo desde la acil-CoA o proteína carrier a otro sustrato como puede ser SAM para producir AHLs, tal como ocurre en el sistema clásico de LuxI (58). Es decir que la enzima HdtS y sus proteínas homólogas tendrían una función dual o doble, ya que catalizan la acilación del ácido lisofosfatídico (58, 67) y poseen la capacidad de acilar SAM llevando a cabo la síntesis de AHLs (58-59). En la Tabla 3 se resumen las propiedades de las sintasas homólogas a la enzima HdtS.

Tabla 3. Características de las sintasas de AHLs homólogas a la enzima HdtS

Propiedades de las sintasas homólogas a HdtS
Tipo de Enzima: Aciltransferasas pertenecientes a la familia 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato O-aciltransferasas conocidas como aciltransferasas del ácido lisofosfatídico
Función dual: Acilación del ácido lisofosfatídico para sintetizar ácido fosfatídico y acilación del sustrato SAM para producir AHLs
Motivos de aminoácidos conservados: KHQSAWET y PEGTR
Dominios conservados: COG0204: 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato-aciltransferasa (PlsC) cd07989: Aciltransferasa de lisofosfolípidos (LPLATs)

Las características correspondientes a las enzimas homólogas a HdtS fueron recopiladas del trabajo publicado por Laue y *col* (2000), quienes identificaron originalmente este tipo de sintasas de AHLs en la bacteria *P. fluorescens*.

Los genes que codifican para las enzimas aciltransferasas de esta familia de sintasas, se ubican en un contexto genómico altamente conservado para un amplio rango de proteobacterias. Los genes conservados que constituyen dicho contexto son *glyQ*, *glyS* y *gph*. Estos genes junto con el gen que codifica para la enzima aciltransferasa conservan un orden, se orientan en la misma dirección y conforman un operón o cluster actuando como una unidad transcripcional (59). El gen *gph* codifica para una enzima fosfatasa con funciones generales, Gph (General function phosphatase), entre las que se destacan D,D-heptosa 1,7-difosfato fosfatasa e histidinol-fosfato fosfatasa. En la Figura 3 se describe el cluster característico donde se localizan los genes codificantes de las enzimas homólogas a HdtS. Es importante mencionar que la identidad entre las sintasas pertenecientes a la familia HdtS se ubica en un rango de 37 a 85%, mientras que la similitud se sitúa entre 10 y 35%.

Fig. 3. Cluster característico de los genes que codifican enzimas homólogas a HdtS

Los genes que conforman el contexto genómico donde se ubican los ortólogos a *hdtS*, fueron descritos en los trabajos realizados por Laue y col (2000) y Rivas y col (2007).

IV.1.8- Quórum Sensing dependiente de AHLs en bacterias patógenas humanas

Un gran número de bacterias, causantes de enfermedades humanas, utilizan sistemas de QS dependientes de AHLs durante los procesos de infección y colonización para regular la expresión de genes de virulencia. Probablemente, el patógeno humano más estudiado sea la bacteria oportunista *P. aeruginosa* que dispone de 2 sistemas de comunicación del tipo LuxI/LuxR, denominados LasI/LasR y RhII/RhlR, los cuales trabajan en serie para controlar la expresión de diferentes factores de virulencia, la adhesión y la formación de biofilm (70-71). La enzima LasI, homóloga a LuxI, sintetiza 3-oxo-C₁₂-HSL, la cual se une a la proteína receptora LasR, homóloga a LuxR. El complejo LasR-AHL activa una gran variedad de genes incluyendo el gen *lasI*, estableciendo así el característico mecanismo de retroalimentación positivo o autoinducción que activa más aún al sistema LasI/LasR. Asimismo, el complejo LasR-AHL activa la expresión de los genes *rhlI* y *rhlR* iniciando de esta manera al otro circuito de QS. La sintasa RhII cataliza la síntesis de C₄-HSL, la cual se une a la proteína RhlR regulando la trascrición de genes de virulencia tardía (71-72). El proceso de regulación de RhII/RhlR por acción del par LasI/LasR resulta en la activación secuencial de los dos circuitos de QS en *P. aeruginosa* (73), a través de los cuales controla los procesos de formación de biofilms, síntesis de proteasas y rhamnolípidos (74-75). En esta bacteria la producción de AHLs depende no sólo de la densidad poblacional sino también de factores nutricionales y ambientales (76). Otro patógeno humano muy estudiado, que utiliza un sistema de QS homólogo a LuxI/LuxR es *Burkholderia cepacia*, la cual infecta a

pacientes con fibrosis quística (77-78). En esta bacteria el sistema de QS está conformado por los genes *cepI* y *cepR*, los cuales codifican para la sintasa CepI (sintetiza C₆-HSL y C₈-HSL) y para el activador transcripcional CepR, respectivamente (79-80). Se ha demostrado que el sistema CepI/CepR está involucrado en la síntesis de proteasas, formación de biofilm, movilidad y en la regulación de la síntesis de sideróforos (79, 81-82).

En resumen, a través de los sistemas de QS, las bacterias patógenas consiguen maximizar las chances para conseguir éxito durante la infección a sus hospedadores. El conjunto de genes de virulencia involucrados en la patogenicidad de una bacteria se encuentra reprimido cuando las densidades poblacionales son bajas. Esto previene la detección temprana de las bacterias por parte del hospedador, evitando la activación del sistema inmune en la etapa inicial de colonización del hospedador. Una vez que la densidad poblacional se expande, los sistemas de QS activan la expresión de una gran variedad de genes de virulencia, como los que están implicados en la producción de proteasas, adhesinas, sideróforos y toxinas, así como también en la resistencia a antibióticos, movilidad y en la inducción de la apoptosis de neutrófilos y macrófagos (60, 83-84). Es decir que los circuitos de QS permiten a las bacterias patógenas llevar a cabo un ataque coordinado con todos los individuos de la población, superando a las defensas del hospedador y estableciendo así la infección (70).

IV.1.9- Quórum Sensing y biofilms

Generalmente las bacterias en la naturaleza tienden a adherirse a superficies y a desarrollar biofilms que las protegen de las condiciones del ambiente. Los biofilms exhiben una elevada resistencia a agentes antimicrobianos y a los mecanismos de defensa correspondientes al sistema inmune del hospedador (85-86). Se ha reportado que los biofilms representan un nicho relevante para los mecanismos de comunicación mediados por Quórum Sensing (87). Aparentemente, los sistemas de QS están involucrados en todas las fases de formación de un biofilm bacteriano, desde la etapa de adhesión hasta la de desagregación. Asimismo, los sistemas de QS regulan la densidad poblacional y la actividad metabólica dentro de un biofilm maduro con el fin de que las bacterias sésiles se ajusten a las demandas nutricionales y a la disponibilidad de nutrientes (88). Ciertos circuitos de QS también son capaces de controlar la dispersión de las bacterias cuando la densidad poblacional en el biofilm es elevada mediante la disminución de la síntesis de polisacáridos intercelulares, permitiendo así la colonización de otras zonas del hospedador (89-90).

Específicamente, el sistema de QS de *P. aeruginosa* está involucrado en la etapa de maduración de los biofilms que este patógeno desarrolla en los pulmones de pacientes con

fibrosis quística (89, 91). Del mismo modo, en otras bacterias patógenas como *Serratia liquefaciens*, *B. cepacia* y *Aeromonas hydrophila*, sus respectivos sistemas de QS controlan el proceso de maduración de biofilms que desarrollan en tejidos de pacientes inmunocomprometidos (81, 92-93). Estos casos indican que distintos sistemas de QS desempeñan un rol fundamental en la virulencia de bacterias patógenas. La interrupción de los mecanismos de comunicación de QS, a través de la degradación de las AHL o mediante la aplicación de antagonistas de estas moléculas, provocaría la inhibición del desarrollo de biofilms, como también la limitación en la expresión de una variedad de factores de virulencia, disminuyendo de este modo la patogenicidad de gran cantidad de bacterias (94).

IV.1.10- Terapia antimicrobiana basada en Quórum Sensing

El descubrimiento de variados circuitos de QS en diferentes patógenos humanos, ha dado lugar a un considerable interés en el desarrollo de nuevas aplicaciones terapéuticas antibacterianas para lograr intervenir en la acción de las moléculas de señalización (95). Se han descrito varios mecanismos que pueden interferir con sistemas de QS, reprimiendo así la expresión de los genes de virulencia responsables de enfermedades bacterianas. Un posible mecanismo no enzimático está relacionado con el empleo de compuestos análogos a AHLs, los cuales compiten con dichas moléculas por las proteínas receptoras, inhibiendo así la activación de los circuitos de QS. Tal es el caso de las furanonas halogenadas, extraídas originalmente del alga marina *Delisea pulchra*, las cuales son capaces de inhibir la formación de biofilm en *Salmonella typhimurium* (96). Asimismo, Morohoshi y *col* demostraron que las N-acil ciclopentilamidas, análogos sintéticos de las AHLs, son efectivos inhibidores de ciertos procesos regulados por QS, en el patógeno oportunista *Serratia marcescens*, como la movilidad del tipo swarming y el desarrollo de biofilms (97). Otro mecanismo de interferencia de QS, es la degradación de las moléculas señal mediante las enzimas lactonasas y acilasas de AHLs. Las lactonasas hidrolizan el anillo lactona y las acilasas causan la ruptura de la unión amida de las AHLs, provocando ambas enzimas la reducción de la actividad biológica de estas moléculas. La presencia de estas enzimas se ha descrito en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas como *A. tumefaciens*, *Variovorax paradoxus*, *Bacillus cereus* y *B. thuringiensis* (95, 98). De este modo, dichos mecanismos de interferencia de los sistemas de QS podrían ser aplicados con el objeto de reemplazar la utilización de los antibióticos. Este enfoque es particularmente prometedor debido al aumento en los niveles de resistencia a los antimicrobianos convencionales (99).

IV.1.11- Objetivos del capítulo

La formación de biofilm es controlada en numerosas bacterias Gram-negativas a través de sistemas de Quórum Sensing, con acil-homoserín lactonas (AHLs) como moléculas de señalización (8-9). Teniendo en cuenta la capacidad de formación de biofilm por *B. pertussis* y que en los inicios de este trabajo de Tesis no existía en la literatura internacional ningún trabajo que hiciera referencia a la presencia de sistemas de Quórum Sensing en bacterias del género *Bordetella*, se planteó iniciar estudios orientados a determinar si *B. pertussis* es capaz de sintetizar moléculas señal del tipo AHLs. Para tal fin se propuso llevar a cabo los siguientes análisis con la cepa de referencia Tohama I y el aislado clínico seleccionado Bp 953 de *B. pertussis*:

- i) Búsqueda de homología entre secuencias correspondientes a proteínas de la cepa Tohama I y sintetas de AHLs de las distintas familias de dichas enzimas pertenecientes a otros organismos, mediante la aplicación de herramientas bioinformáticas.
- ii) Detección de moléculas tipo AHLs a partir de cultivos sólidos, líquidos y en biofilm de *B. pertussis* empleando las cepas biosensoras *Chromobacterium violaceum* y *Agrobacterium tumefaciens*, las cuales poseen elevada especificidad por dichas señales.
- iii) Análisis de la producción de AHLs en función de las fases de crecimiento de cultivos líquidos en sistemas *batch*.
- iv) Determinación del número de moléculas diferentes de AHL sintetizadas por *B. pertussis*, aplicando cromatografía en placa delgada en combinación con cepas biosensoras.
- v) Estimación de la concentración de AHLs producida bajo condiciones de crecimiento planctónico y en biofilm.
- vi) Determinación del tipo de AHLs producidas por *B. pertussis*, por medio del análisis de extractos de cultivo aplicando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier.
- vii) Confirmación de la estructura de AHLs mediante cromatografía gaseosa con ionización electrónica-espectroscopía de masas (GC/EI-MS) y cromatografía líquida-espectroscopía de masas en tándem con monitoreo de reacción múltiple (HPLC MS/MS-MRM).

IV.2- MATERIALES Y MÉTODOS

IV.2.1- Estudios bioinformáticos: Búsqueda de homología con sintasas de AHLs

Tal como se describió, existen 3 familias de enzimas encargadas de la síntesis de AHLs en bacterias Gram-negativas. Estas enzimas son aciltransferasas que emplean como sustratos S-adenosilmetionina y una cadena acilada que puede ser aportada por una proteína carrier de grupos acilos o por la acil-coenzima A (43-44, 53-54, 100). Las 3 familias de sintasas de AHLs descritas hasta la actualidad son: a) Familia I: sintasas homólogas a la enzima LuxI (43-44), b) Familia II: sintasas homólogas a la enzima LuxM (32, 57) y c) Familia III: Sintasas homólogas a la enzima HdtS (58-59). Es importante mencionar que no existe homología significativa entre las sintasas de distinta familia a pesar de que todas participan en la síntesis de AHL, a partir de los mismos sustratos. Un análisis comparativo entre las secuencias de las proteínas codificadas por el genoma de *B. pertussis* Tohama I y proteínas representativas de las distintas familias de sintasas de AHLs, fue llevado a cabo con el fin de buscar homología entre las mismas. Este procedimiento se efectuó empleando el algoritmo BlastP (protein-protein BLAST) y el análisis algorítmico iterativo PSI-BLAST (Position Specific Iterated BLAST). Ambos algoritmos pertenecen al programa BLAST que ofrece el NIST (National Center of Biotechnology Information, EUA) a través de su página en internet: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. La aplicación del algoritmo Blastp implicó utilizar las secuencias protéicas de sintasas de AHLs como moldes o *Queries* para lograr de este modo la comparación con las proteínas de *B. pertussis* Tohama I. Asimismo, para los casos que fueran necesarios, se aplicó el análisis de Alineamiento Múltiple de Secuencias a través del programa CLUSTAL W. Como resultado de este análisis se obtienen porcentajes de identidad y similitud entre las secuencias de aminoácidos comparadas. El programa CLUSTAL W es brindado por el Polo Bioinformático de Lyonnais, Francia, a través de su página web: www.npsa-pbil.ibcp.fr.

IV.2.2- Microorganismos

IV.2.2.1- *Bordetella pertussis*

Se utilizó la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I y el aislado clínico Bp 953. Este aislado clínico fue elegido por presentar alto crecimiento en biofilm respecto de la cepa de referencia.

IV.2.2.2- Cepas biosensoras

En los ensayos de detección y cuantificación de AHLs fueron utilizadas las cepas biosensoras: *Chromobacterium violaceum* CV026, *C. violaceum* VIR07, *Agrobacterium tumefaciens* KYC55, *A. tumefaciens* WCF47 y *A. tumefaciens* NTL4. Las características genéticas relevantes como así también la resistencia a antibióticos de las cepas biosensoras se resume en la Tabla 4. En Tabla 5 se detallan las moléculas de AHL detectables por dichas cepas. A continuación se describen ciertas características de las cepas de *C. violaceum* y *A. tumefaciens*.

a) Cepas biosensoras de *Chromobacterium violaceum*

La cepa *C. violaceum* CV026 fue provista por la Dra. Ángeles Zorreguieta de la Fundación Instituto Leloir (Buenos Aires, Argentina) y la cepa *C. violaceum* VIR07 por el Dr. Tomoshiro Morohoshi de la Universidad de Utsonomiya (Utsonomiya, Japón). *C. violaceum* CV026 es una mutante derivada de *C. violaceum* ATCC 31532 que no sintetiza AHLs debido a una mutación en el gen *cviI* generada por la inserción del transposón Tn5. Tiene la capacidad de detectar AHLs de cadena acilada corta con o sin sustituyente en el carbono 3, como también algunas homocisteín tiolactonas (*101*). La cepa *C. violaceum* VIR07 es una mutante derivada de *C. violaceum* ATCC 12472 con una delección en el gen *cviI* generada por la inserción de un casete de resistencia a kanamicina (*cviI::Km^r*), por este motivo no sintetiza AHLs. VIR07 es capaz de detectar en especial AHLs con cadena acilada larga con o sin sustituyente (*102*). Ambas cepas biosensoras se crecieron a 30°C en el medio LB. La cepa VIR07 se cultivó en la condición de restricción recomendada por bibliografía, con Kanamicina (50 µg ml⁻¹, Sigma). Estas cepas producen el pigmento violeta Violaceina cuando son inducidas por AHLs exógenas, siendo este proceso un indicador de la presencia de dichas moléculas.

b) Cepas biosensoras de *Agrobacterium tumefaciens*

Las cepas biosensoras *A. tumefaciens* KYC55 y WCF47 fueron provistas por el Dr. Stephen Winans de la Universidad de Cornell (Ithaca, EUA). Ambas son mutantes de la cepa *A. tumefaciens* R10 con una delección en el gen que expresa la enzima TraI (*traI*) por lo que no son capaces de sintetizar AHLs. La cepa KYC55 posee el plásmido pJZ384 que contiene la fusión del promotor del sistema de expresión del bacteriófago T7 y el gen que expresa el receptor de AHLs conocido como TraR (PT7-*TraR*). Posee además el plásmido pJZ410 conteniendo el gen de la RNA polimerasa de T7 y el plásmido pJZ372 con la fusión reportera

del promotor del gen *traI* y el gen *lacZ* (*PtraI-lacZ*). De esta manera, KYC55 logra sobreexpresar la proteína receptora TraR permitiéndole detectar con gran sensibilidad un amplio rango de AHLs y producir color azul como respuesta a la presencia de AHLs (103). La cepa *A. tumefaciens* WCF47 posee el plásmido pCF218 el cual contiene la fusión del promotor del gen que codifica para la resistencia a tetraciclina junto con el gen que expresa el receptor TraR (*PtetR-TraR*). Asimismo WCF47 contiene el plásmido pJZ372 con la fusión reportera del promotor del gen *traI* y el gen *lacZ* (*PtraI-lacZ*). En este caso la sobreexpresión de TraR es menor que para la cepa KYC55, por lo que la detección de AHLs se lleva a cabo con menor sensibilidad y rango de AHLs respecto a dicha cepa (104). Ambas cepas biosensoras fueron cultivadas a 30°C en el medio mínimo AT (105-106), el cual posee la siguiente composición: 10,7 g L⁻¹ KH₂PO₄, 160 mg L⁻¹ MgSO₄·7 H₂O, 7,5 mg L⁻¹ CaCl₂ anhidro, 5 mg L⁻¹ FeSO₄·7 H₂O, 12 mg L⁻¹ MnSO₄·7 H₂O, 2 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 2 g L⁻¹ dextrosa anhidra. Estas cepas se cultivaron en las condiciones de restricción recomendadas por bibliografía, para lo cual el medio de cultivo fue suplementado con el/los antibióticos adecuados (tetraciclina 2 µg ml⁻¹; gentamicina 100 µg ml⁻¹ y espectinomicina 100 µg ml⁻¹, Sigma, St. Louis, EUA).

La cepa *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) fue cedida por el Dr. Juan González de la Universidad de Texas, Dallas (Richardson, Texas, EUA). Esta mutante deriva de la cepa *A. tumefaciens* NT1 y contiene el plásmido pZLR4 en el que se ha clonado el gen *traR* y la fusión reportera *traG::lacZ*. La cepa NTL4 (pZLR4) es incapaz de producir AHLs y la fusión *lacZ* solo se expresa en presencia AHLs exógenas (47). Esta cepa se cultivó a 30°C en el medio Luria-Bertani (LB: NaCl, 10 g L⁻¹; extracto de levadura, 5 g L⁻¹; peptona, 10 g L⁻¹)

Tabla 4. Cepas biosensoras utilizadas en este trabajo

Cepa biosensora	Características relevantes	Resistencia	Cita
<i>C. violaceum</i> CV026	Derivada de la cepa ATCC 31532 con mutación en el gen <i>cviI</i> por inserción del transposón Tn5 (<i>cviI::Tn5</i>)	---	(101)
<i>C. violaceum</i> VIR07	Derivada de la cepa ATCC 12472 con mutación en el gen <i>cviI</i> por inserción de casete de resistencia a Kanamicina (<i>cviI::Km^r</i>)	Kanamicina	(102)
<i>A. tumefaciens</i> KYC55	Derivada de R10 conteniendo pJZ384 (PT7- <i>TraR</i>), pJZ410 (<i>RNA pol T7</i>) y pJZ372 (<i>PtraI-lacZ</i>)	Espectinomicina Gentamicina Tetraciclina	(103)
<i>A. tumefaciens</i> WCF47	Derivada de R10 conteniendo pCF218 (<i>PtetR-TraR</i>) y pJZ372 (<i>PtraI-lacZ</i>)	Gentamicina Tetraciclina	(104)
<i>A. tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4)	Derivada de NT1 conteniendo el plásmido pZLR4 con la fusión <i>traG-lacZ</i>	Gentamicina	(47)

(107), suplementado con 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de gentamicina. Para las cepas biosensoras de *A. tumefaciens*, la producción de color azul, debido a la hidrólisis del sustrato X-gal por acción de la enzima β -galactosidasa, es un indicador de la presencia de AHLs exógenas.

Tabla 5. Rango de detección de moléculas de QS para las distintas cepas biosensoras

Cepa biosensora	Moléculas señal
<i>C. violaceum</i> CV026	C ₄ -HSL, C ₆ -HSL, C ₈ -HSL, 3-oxo-C ₄ -HSL, 3-oxo-C ₆ -HSL, 3-oxo-C ₈ -HSL, benzoilacetil-HSL, C ₄ -homocisteín tiolactona, C ₆ -homocisteín tiolactona, 3-oxo-C ₆ -homocisteín tiolactona
<i>C. violaceum</i> VIR07	C ₈ -HSL, C ₁₀ -HSL, C ₁₂ -HSL, C ₁₄ -HSL, C ₁₆ -HSL 3-oxo-C ₈ -HSL, 3-oxo-C ₁₀ -HSL, 3-oxo-C ₁₂ -HSL
<i>A. tumefaciens</i> KYC55	C ₄ -HSL, C ₅ -HSL, C ₆ -HSL, C ₇ -HSL, C ₈ -HSL, C ₁₀ -HSL, C ₁₂ -HSL, 3-oxo-C ₄ -HSL, 3-oxo-C ₅ -HSL, 3-oxo-C ₆ -HSL, 3-oxo-C ₇ -HSL, 3-oxo-C ₈ -HSL, 3-oxo-C ₁₀ -HSL, 3-oxo-C ₁₂ -HSL, 4-oxa-3-oxo-C ₆ -HSL, 3-hidroxi-C ₉ -HSL, 3-hidroxi-C ₁₂ -HSL, 2-hexenoil-HSL, 2-octenoil-HSL, 2-nonenoil-HSL, 2-decenoil-HSL, 2-butinoil-HSL, 2-hexinoil-HSL, 5-hexinoil-HSL, 2-octinoil-HSL, 3-oxo-7-octinoil-HSL, 3-oxo-11-octadecenoil-HSL, di-HSL-decandioato, di-HSL-3,12-dioxotetradecandioato, <i>p</i> -propilbenzoyl-HSL, <i>O</i> -hexil- <i>N</i> -HSL
<i>A. tumefaciens</i> WCF47	C ₅ -HSL, C ₆ -HSL, C ₇ -HSL, C ₈ -HSL, C ₁₀ -HSL, 3-oxo-C ₅ -HSL, 3-oxo-C ₆ -HSL, 3-oxo-C ₇ -HSL, 3-oxo-C ₈ -HSL, 3-oxo-C ₁₀ -HSL, 3-oxo-C ₁₂ -HSL, 4-oxa-3-oxo-C ₆ -HSL, 3-hidroxi-C ₉ -HSL, 3-hidroxi-C ₁₂ -HSL, 2-hexenoil-HSL, 2-octenoil-HSL, 2-nonenoil-HSL, 2-decenoil-HSL, 2-butinoil-HSL, 2-hexinoil-HSL, 2-octinoil-HSL, 3-oxo-7-octinoil-HSL, di-HSL-3,12-dioxotetradecandioato, <i>O</i> -hexil- <i>N</i> -HSL
<i>A. tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4)	C ₄ -HSL, C ₆ -HSL, C ₈ -HSL, C ₁₀ -HSL, C ₁₂ -HSL, 3-oxo-C ₄ -HSL, 3-oxo-C ₆ -HSL, 3-oxo-C ₈ -HSL, 3-oxo-C ₁₀ -HSL, 3-oxo-C ₁₂ -HSL

A. tumefaciens KYC55 (Zhu y col 2003), *A. tumefaciens* WCF47 (Zhu y col 1998), *A. tumefaciens* NT1(pZLR4) (Marketon y González 2002), *C. violaceum* CV026 (Mc Clean y col 1997), *C. violaceum* VIR07 (Morohoshi y col 2008)

IV.2.2.3- Bacterias productoras de AHLs

En los ensayos de detección e identificación de acil-homoserín lactonas se utilizaron las siguientes cepas productoras de AHLs como controles positivos: *Serratia marcescens* AS-1 (97), *Agrobacterium tumefaciens* R10 (108), *Sinorhizobium meliloti* Rm8530 (109), *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (104, 110), *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 (82) y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (111). La cepa *S. marcescens* AS-1 fue gentilmente provista por el Dr. Tomoshiro Morohoshi de la Universidad de Utsunomiya, *A. tumefaciens* R10 por el Dr. Stephen Winans de la Universidad de Cornell, *S. meliloti* Rm8530 por el Dr. Juan González de la Universidad de Dallas y *A. tumefaciens* NTL4 por el Dr. Claudio Valverde de la Universidad Nacional de Quilmes. Por otro lado las cepas *B. cepacia* ATCC

25416 y *P. aeruginosa* PAO1 provienen de la colección del CINDEFI. Estas cepas control se crecieron en el medio de cultivo LB y en el medio AT según el experimento llevado a cabo. En la Tabla 6 se detallan las acil-homoserín lactonas producidas por cada cepa control.

Tabla 6. Acil-homoserín lactonas producidas por las cepas control

Cepa Bacteriana	Acil-homoserín lactonas	Cita
<i>Serratia marcescens</i> AS-1	C ₆ -HSL, 3-oxo-C ₆ -HSL	(97)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> R10	C ₈ -HSL, 3-oxo-C ₆ -HSL, 3-oxo-C ₈ -HSL	(108)
<i>Sinorhizobium meliloti</i> Rm8530	C ₁₂ -HSL, C ₁₄ -HSL, C ₁₆ -HSL, C _{16:1} -HSL, C ₁₈ -HSL, 3-oxo-C ₁₄ -HSL, 3-oxo-C _{16:1} -HSL	(109)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4	C ₆ -HSL, C ₈ -HSL, 3-oxo-C ₆ -HSL, 3-oxo-C ₈ -HSL	(104, 110)
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416	C ₆ -HSL, C ₈ -HSL	(82)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	C ₄ -HSL, 3-oxo-C ₁₂ -HSL	(111)

IV.2.2.4- Bacteria deficiente en la producción de AHL

La cepa *Agrobacterium tumefaciens* NTL4-, deficiente en la síntesis de acil-homoserín lactonas fue gentilmente provista por el Dr. Claudio Valverde de la Universidad Nacional de Quilmes. Esta cepa fue utilizada como control negativo de producción de AHLs en los ensayos de detección de dichas moléculas.

IV.2.3- Estándares de acil-homoserín lactonas

Una serie de estándares sintéticos de acil-homoserín lactonas, con una concentración de 10 mM, fueron gentilmente suministrados por el Dr. Morohoshi de la Universidad de Utsonomiya. En la Tabla 7 se describen algunas características de dichas moléculas.

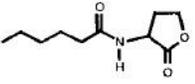
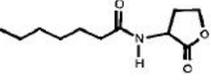
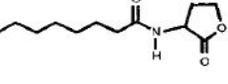
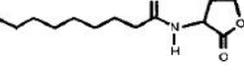
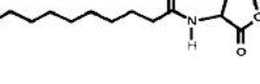
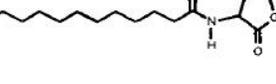
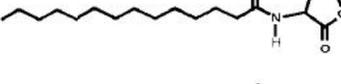
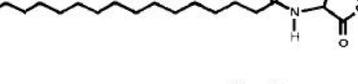
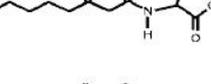
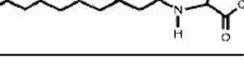
IV.2.4- Preparación de cultivos de *B. pertussis*

IV.2.4.1- Cultivos en medio sólido

Los cultivos en medio sólido de *B. pertussis* se llevaron a cabo partiendo de stocks conservados a -80°C, en placas con agar Bordet-Gengou (Difco) suplementadas con 1% (m v⁻¹) de bactopectone (Difco) y 14% (v v⁻¹) de sangre de carnero desfibrinada (ABGs). Estas placas fueron incubadas a 36°C durante 72 h. Luego de este período de incubación se realizó un repique de células a otras placas con medio ABGs, incubándolas a 37°C durante

48 h, consiguiendo de este modo cultivos activos de *B. pertussis* para iniciar los cultivos planctónicos.

Tabla 7. Algunas características de las AHLs sintéticas utilizadas en este trabajo

Acil-homoserín lactona	Abreviatura	Peso molecular	Estructura Química
Hexanoil-homoserín lactona	C ₆ -HSL	199	
Heptanoil-homoserín lactona	C ₇ -HSL	213	
Octanoil-homoserín lactona	C ₈ -HSL	227	
Nonoil-homoserín lactona	C ₉ -HSL	241	
Decanoil-homoserín lactona	C ₁₀ -HSL	255	
Dodecanoil-homoserín lactona	C ₁₂ -HSL	283	
Tetradecanoil-homoserín lactona	C ₁₄ -HSL	311	
Hexadecanoil-homoserín lactona	C ₁₆ -HSL	339	
3-oxo-octanoil-homoserín lactona	3-oxo-C ₈ -HSL	241	
3-oxo-decanoil-homoserín lactona	3-oxo-C ₁₀ -HSL	269	

IV.2.4.2- Cultivos planctónicos

Cultivos líquidos de *B. pertussis* se iniciaron a partir de células cultivadas en placas con ABGs, las cuales se transfirieron a frascos Erlenmeyer de 3 litros conteniendo 600 ml del medio SS. Los Erlenmeyer se incubaron a 37°C en agitación (160 rpm) durante 36 h. Luego los cultivos fueron centrifugados a 8000 xg durante 30 min a 4°C. Seguidamente, los sobrenadantes de cultivo fueron filtrados a través de membranas de acetato de 0,22 μm

(Osmonics Inc., Massachussets, EUA), con el fin de eliminar las células remanentes, y se mantuvieron a -20°C hasta su posterior extracción con solventes. Cultivos líquidos tanto de la cepa Tohama I como del aislado clínico Bp 953 fueron realizados en repetidas oportunidades partiendo de cultivos independientes en medio sólido.

IV.2.4.3- Cultivos en Biofilm

Los cultivos en biofilm de *B. pertussis* se realizaron mediante un sistema de cultivo *batch* en columna empleando perlas de polipropileno como soporte abiótico. Brevemente, el sistema consistió en una columna de vidrio de 8 cm de diámetro y 55 cm de altura conteniendo 800 g de perlas. La columna se conectó a través de una manguera de silicona a un frasco Erlenmeyer de 1 litro cumpliendo la función de reservorio del inóculo y del medio de cultivo fresco. Asimismo, la columna dispone de una manguera de silicona acoplada a un filtro y este conectado a un aireador aportando aire estéril al cultivo (Figura 4). La columna fue

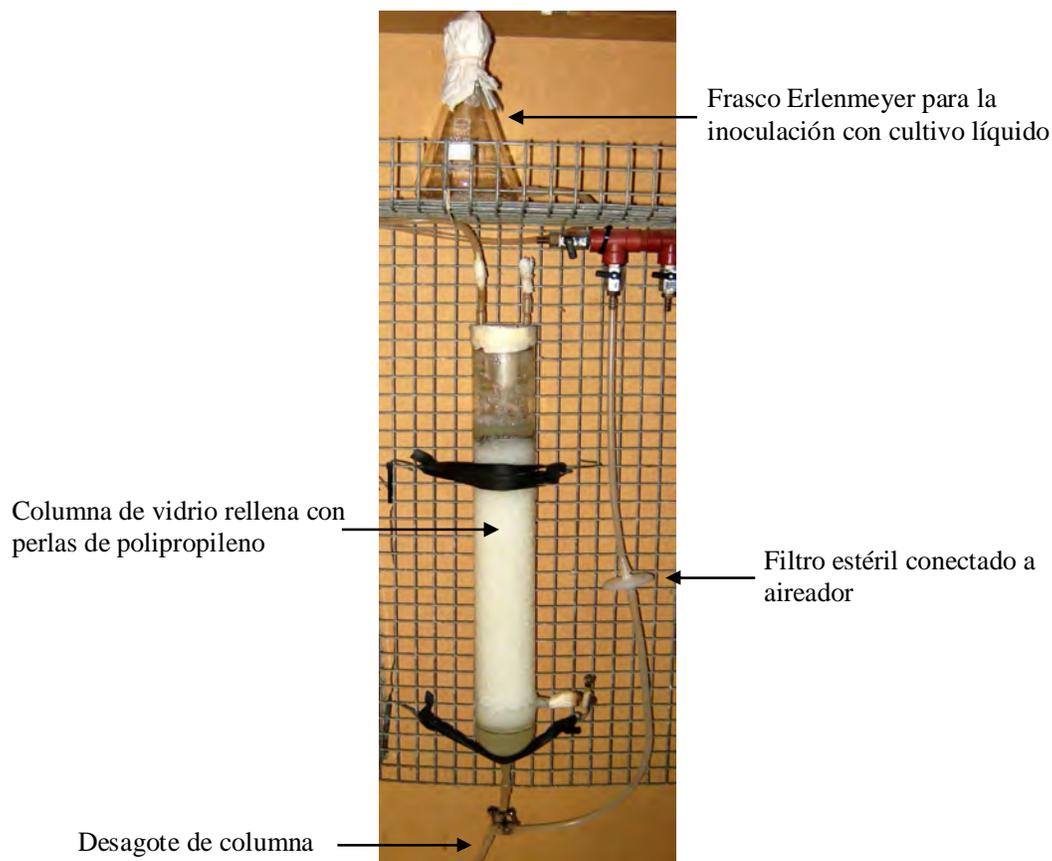


Fig. 4. Dispositivo para cultivo en biofilm de *B. pertussis*. En la imagen se muestra el biorreactor conformado por una columna conteniendo perlas de polipropileno y conectada a un frasco Erlenmeyer empleado para su inoculación con un cultivo planctónico. La columna dispone de una manguera con filtro acoplada a un aireador a través de la cual se aporta aire estéril al cultivo.

inoculada con 600 ml de un cultivo planctónico en fase exponencial incubándola de manera estática y en posición vertical a 37°C durante 5 h. Seguidamente se llevó a cabo el drenado de la suspensión de bacterias no adheridas al soporte y se agregó asépticamente 600 ml de medio SS fresco. El sistema de cultivo se incubó aeróbicamente ($0,1 \text{ L min}^{-1}$) a 37°C durante 48 h. Luego de este período de incubación, las perlas junto con el medio de cultivo agotado se transfirieron a un frasco Erlenmeyer de 2 litros. Dicho Erlenmeyer se agitó a 250 rpm durante 40 min para lograr desadherir el biofilm de las perlas. Posterior a la separación de las perlas por medio de una gasa se llevó a cabo la centrifugación (8000 xg , 30 min, 4°C) del cultivo conteniendo las células de biofilm desadheridas. Finalmente el sobrenadante de cultivo se filtró a través de membranas de acetato (Osmonics Inc.) de $0,22 \mu\text{m}$ de poro y se mantuvo a -20°C hasta su extracción. Cabe precisar que los cultivos en biofilm tanto para la cepa Tohama I como para el aislado Bp 953 fueron realizados por triplicado partiendo de cultivos líquidos independientes.

IV.2.4.4- Cultivos planctónicos de bacterias productoras de AHLs

Cultivos realizados en el medio sólido LB de las cepas productoras de AHLs *S. marcescens* AS-1, *A. tumefaciens* R10, *S. meliloti* Rm8530, *A. tumefaciens* NTL4, *P. aeruginosa* PAO1 y *B. cepacia* ATCC 25416 como así también de la cepa deficiente en la síntesis de AHLs *A. tumefaciens* NTL4- fueron empleados para inocular frascos Erlenmeyer de 0,25 L conteniendo 50 ml de medio líquido LB. Los frascos fueron incubados durante un período de 18 h con una agitación de 160 rpm. La temperatura de incubación para *S. marcescens* AS-1, *A. tumefaciens* R10, *S. meliloti* Rm8530, *A. tumefaciens* NTL4 y *A. tumefaciens* NTL4- fue 30°C mientras que para *P. aeruginosa* PAO1 y *B. cepacia* ATCC 25416 fue 37°C. Luego los cultivos fueron centrifugados a 4000 rpm durante 20 min a 4°C. Por último, los sobrenadantes de cultivo se filtraron a través membranas de acetato (Osmonics Inc.) de $0,22 \mu\text{m}$ y se mantuvieron a -20°C hasta su extracción.

IV.2.5- Extracción de AHLs

IV.2.5.1- Tratamiento de sobrenadantes de cultivo

Durante el cultivo de *B. pertussis* en medio líquido y en biofilm como así también de las cepas productoras de AHLs en medio líquido, se generó un aumento del pH de los respectivos medios de cultivo. La alcalinización del medio de cultivo produce la ruptura del anillo lactona de las AHLs presentes en los cultivos bacterianos. Para revertir esta hidrólisis

química se procedió según la metodología descrita por Yates y col (112). Brevemente, los sobrenadantes de cultivos libres de células se acidificaron hasta pH 2 con HCl (Cicareli, Argentina). Luego, dichos sobrenadantes acidificados se incubaron a 37°C durante 24 h en un agitador orbital a 160 rpm.

IV.2.5.2- Extracción de AHLs de sobrenadantes de cultivo

Los sobrenadantes de cultivo fueron extraídos según el procedimiento descrito por Mc Clean y col (101) y por Shaw y col (113). Para tal fin, los sobrenadantes libres de células, acidificados, se mezclaron en un vaso de precipitados con diclorometano (DCM) grado HPLC (U.V.E., Argentina) en una relación 70:30. La mezcla se agitó a 200 rpm con un agitador magnético durante 20 minutos para luego transvasar la emulsión a un balón de decantación permitiendo de esta manera la separación de las fases. Seguidamente, la fracción orgánica fue removida y se repitió la extracción con DCM de la fase acuosa. Ambas fracciones orgánicas se juntaron para ser tratadas con Na₂SO₄ anhidro (Anedra, Madrid, España) con el fin de eliminar restos de agua y luego se filtraron a través de papel Whatman (GE Healthcare, EUA). El extracto orgánico se llevó a sequedad total mediante un rotavapor a 36°C y nitrógeno gaseoso. Los extractos secos se reconstituyeron en pequeños volúmenes de DCM tal que los correspondientes a los cultivos líquidos y en biofilm de *B. pertussis* resultaron 5000 veces concentrados. Asimismo, los extractos pertenecientes a los cultivos líquidos de las cepas productoras de AHLs como así también el de la cepa deficiente en la síntesis de dichas moléculas, se concentraron 250 veces utilizando el mencionado solvente.

IV.2.5.3- Extracción de medios de cultivo sin inocular

Un volumen de 600 mL de medio de cultivo SS complementado, esterilizado y sin inocular fue acidificado hasta pH 2 con HCl e incubado a 37°C durante 24 h en un agitador orbital a 160 rpm. Del mismo modo, un volumen de 100 mL de medio de cultivo LB sin inocular fue acidificado e incubado a 37°C con agitación por 24 h. Estos medios de cultivo líquidos fueron sometidos al proceso de extracción con DCM de la manera descrita en la sección anterior. Los extractos secos obtenidos a partir de los medios de cultivo SS y LB se reconstituyeron en pequeños volúmenes de DCM, tal que sus concentraciones coincidieran con las correspondientes a los extractos de cultivos líquidos de *B. pertussis* y de las cepas productoras de AHLs respectivamente.

IV.2.6- Calibración del ensayo de detección de AHLs en placa de Petri

El ensayo de detección de AHLs en placa de Petri, fue calibrado empleando las cepas biosensoras CV026 y VIR07 de *C. violaceum* y las cepas KYC55 y WCF47 de *A. tumefaciens*, como así también distintas cepas productoras de AHLs. Las cepas de *C. violaceum* fueron sembradas en placas de Petri conteniendo medio de cultivo sólido LB mientras que las cepas de *A. tumefaciens* se sembraron en placas de Petri conteniendo el medio sólido AT suplementado con 50 µg/ml de X-Gal (5-bromo-4-choro-3-indolil-β-D-galactopiranosido, Promega, EUA). Las cepas productoras de AHLs fueron sembradas perpendicularmente a las cepas biosensoras de manera tal que crecieran cercanas a estas últimas (Fig. 5). Posteriormente, las placas se incubaron a 30°C registrando el crecimiento y de inducción de las cepas biosensoras a distintos tiempos. Las cepas productoras de AHLs empleadas en esta calibración fueron: *B. cepacia* ATCC 25416, *S. marcescens* AS-1, *A. tumefaciens* R10 y *P. aeruginosa* PAO1. Cada cepa biosensora se sembró además frente a sí misma con el fin de corroborar que no son capaces de generar su propia inducción.

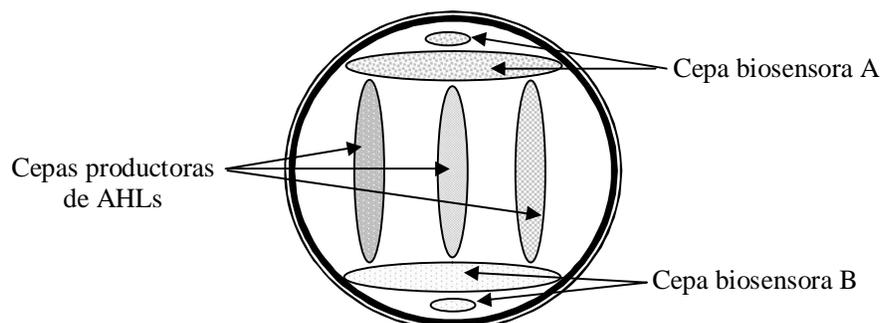


Fig. 5. Esquema de sembrado de las cepas para la calibración de la detección de AHLs en placa de Petri. Las cepas biosensoras se sembraron perpendicularmente a cepas productoras de AHLs de manera que crecieran próximas y así permitir su inducción. Cada cepa biosensora se enfrentó a sí misma para confirmar que no tienen la capacidad de activar su propia inducción.

IV.2.7- Búsqueda de un medio de cultivo apto para la detección de AHLs en *B. pertussis*

Se debió llevar a cabo la búsqueda de un medio de cultivo sólido apropiado para el crecimiento de *B. pertussis* como así también de las cepas biosensoras y cepas productoras de AHLs. Para efectuar esta búsqueda se utilizó la cepa *C. violaceum* CV026 como cepa biosensora y *B. cepacia* ATCC 25416 como cepa productora de AHLs. Asimismo, se procuró que dicho medio de cultivo permitiera la inducción de la cepa CV026 para que esta lograra la producción del pigmento violaceina. La formación de este pigmento por parte de la cepa CV026 debido a su inducción por acción de las AHLs generadas por *B. cepacia*,

constituyó el control positivo en la detección de AHLs. En todos aquellos medios sólidos ensayados se sembró inicialmente la cepa *B. pertussis* Tohama I partiendo de un cultivo fresco en medio Agar Bordet-Gengou (ABG). Seguidamente, las placas con los distintos medios, fueron incubadas a 37°C durante 46 h para permitir el crecimiento de Tohama I. Luego se sembraron en las mismas placas, la cepa biosensora CV026 y la cepa productora de AHLs, incubando a 30°C durante 14 h. La cepa biosensora se sembró de manera perpendicular a la cepa Tohama I y a la cepa de *B. cepacia*, de modo tal que creciera cercana a ambas cepas y así permitir su inducción. La cepa *C. violaceum* CV026 se sembró también frente a sí misma para confirmar que no es capaz de estimular su propia inducción (Fig. 6).

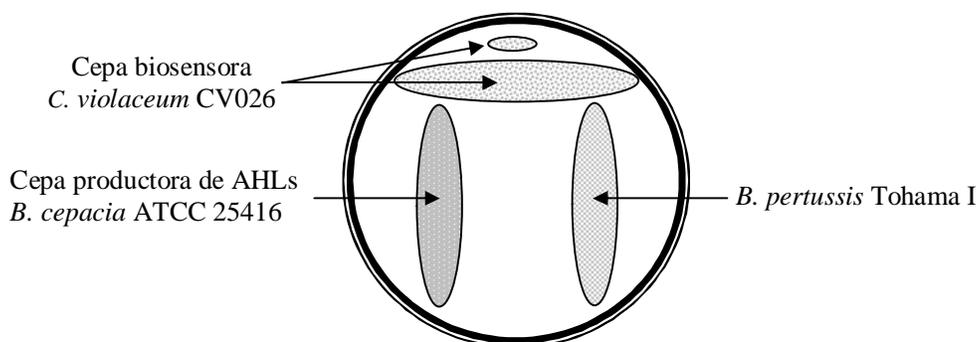


Fig. 6. Esquema de sembrado de las cepas empleadas en la búsqueda de un medio de cultivo apropiado para la detección de AHLs. La cepa biosensora *C. violaceum* CV026 se sembró perpendicularmente a *B. pertussis* Tohama I y a la cepa de *B. cepacia*, de modo que creciera próxima a estas y así permitir su inducción. La cepa CV026 se sembró además frente a sí misma para corroborar que no activa su propia inducción.

IV.2.8- Detección de Acil-homoserín-lactonas

Luego de realizar la calibración del ensayo de detección de AHLs en placas de Petri y la búsqueda del medio de cultivo adecuado para analizar cultivos de *B. pertussis* mediante dicho ensayo, se llevó a cabo la detección de AHLs en *B. pertussis* empleando las cepas biosensoras de *C. violaceum* (CV026 y VIR07) y de *A. tumefaciens* (KYC55 y WCF47) mediante distintos estudios biológicos que se describirán a continuación.

IV.2.8.1- Bioensayo de detección de AHLs en placa de Petri

El ensayo de detección de AHLs en placas de Petri se llevó a cabo como fue descrito por Llamas y col (114) utilizando las cepas de *C. violaceum* y *A. tumefaciens*. Brevemente, partiendo de cultivos de 48 h de la cepa *B. pertussis* Tohama I en medio ABGs, se sembraron bacterias en placas con el medio sólido agar Cerebro-Corazón (BHA, *Brain Heart*

Agar) (Oxoid Ltd., Hampshire, Inglaterra) suplementado con 2,5% (v v⁻¹) de suero fetal bovino (PAA Laboratories GmbH, Alemania). En los casos en que se utilizaron las cepas biosensoras de *A. tumefaciens*, el medio BHA fue suplementado con 50 µg/ml del sustrato X-Gal. Seguidamente, las placas fueron incubadas a 37°C durante 48 h para permitir el crecimiento de *B. pertussis*. Luego de la incubación y partiendo de cultivos en medio sólido, se sembraron las cepas biosensoras y cepas productoras de AHLs. Las cepas biosensoras fueron sembradas perpendicularmente al cultivo de *B. pertussis* y al de la cepa productora de AHLs, de tal manera que crezcan en una zona cercana a estas últimas (ver esquema de la Fig. 6). Las placas fueron incubadas nuevamente, a 30°C durante 12 h al utilizar las cepas biosensoras de *A. tumefaciens* y durante 18 h al emplear las cepas de *C. violaceum*. La producción del pigmento violaceina por parte de las cepas de *C. violaceum* como así también la formación de color azul por las cepas de *A. tumefaciens* fue utilizada como indicador de la inducción de dichas cepas por la acción de AHLs producidas por los cultivos ensayados. La cepa *A. tumefaciens* NTL4- fue utilizada para obtener un control negativo de la inducción de las cepas biosensoras por acción de AHLs. El aislado clínico Bp 953 de *B. pertussis* fue también sometido a los ensayos de detección de AHLs en placa de Petri, empleando las cepas biosensoras de *C. violaceum* y *A. tumefaciens*. Este ensayo fue repetido utilizando cultivos independientes de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953.

IV.2.8.2- Bioensayo de detección de AHLs por difusión

La detección de acil-homoserín lactonas se aplicó sobre los extractos obtenidos a partir de los distintos cultivos de *B. pertussis*, mediante el bioensayo de detección por difusión descrito por Morohoshi y col (102), utilizando las cepas biosensoras de *C. violaceum* y *A. tumefaciens*. Brevemente, 50 ml de medio de cultivo LB semi-sólido (0,75% v/v de agar) fue inoculado en una relación 10:1, con un cultivo en fase exponencial de las cepas biosensoras de *C. violaceum* (CV026 y VIR07). Asimismo, 50 ml de medio de cultivo AT semi-sólido suplementado con 50 µg/ml de X-Gal, fue inoculado, en una relación 10:1, con un cultivo en fase exponencial de las cepas biosensoras de *A. tumefaciens* (KYC55 y WCF47). Los medios semi-sólidos inoculados fueron transferidos a placas de Petri para luego colocar sobre la superficie del agar solidificado, discos de papel Whatman con un diámetro de 8 mm. Posteriormente, 50 µl de los extractos concentrados obtenidos a partir de cultivos líquidos y biofilm de la cepa Tohama I y del aislado Bp 953 de *B. pertussis*, fueron aplicados sobre los discos de papel. Luego, las placas se incubaron a 30°C durante 8 h cuando se utilizaron las cepas biosensoras de *A. tumefaciens* y durante 12 h al emplear las cepas de *C. violaceum*. La

presencia de AHLs en los extractos se determinó a través de la formación de halos de color violeta y de color azul alrededor de los discos de papel al emplear las cepas biosensoras de *C. violaceum* y de *A. tumefaciens* respectivamente. El nivel de producción de AHLs por parte de los distintos tipos de cultivos de *B. pertussis* se evaluó a través de los diámetros correspondientes a los halos de coloración. Se utilizaron extractos de cultivos líquidos de las cepas productoras de AHLs, para la obtención de controles positivos de la inducción de las cepas biosensoras por acción de dichas moléculas. El extracto del cultivo líquido de *A. tumefaciens* NTL4- fue utilizado para obtener un control negativo de la inducción de las cepas biosensoras por acción de AHLs. Asimismo, se ensayaron como controles negativos extractos de los medios de cultivo líquidos SS y LB sin inocular. Este experimento se repitió utilizando extractos independientes de la cepa Tohama I y del aislado Bp 953.

IV.2.8.3- Ensayo combinado de detección de AHLs

La detección de AHLs de *B. pertussis* fue evaluada mediante la combinación de los ensayos de detección en placa y difusión. A partir de un cultivo en medio ABGs, células de *B. pertussis* Tohama I fueron sembradas en una placa con el medio agar Cerebro-Corazón (BHA) suplementado con 2,5% de suero fetal bovino y 50 µg/ml de X-Gal. La placa fue incubada a 37°C durante 46 h para permitir el crecimiento de Tohama I. Seguidamente, la cepa biosensora *A. tumefaciens* KYC55 fue sembrada en una zona de la placa cercana al cultivo de *B. pertussis*. Un volumen de 50 µl de un extracto obtenido a partir de 600 ml de cultivo líquido de *B. pertussis* y concentrado 5000 veces, se colocó sobre un disco de papel Whatman ubicado de manera contigua al cultivo de la cepa biosensora. Por último, la placa se incubó nuevamente, a 30°C durante 8 h. La formación de color azul en el cultivo de la cepa biosensora fue utilizada como indicador de la producción de AHLs por parte del cultivo de Tohama I, como así también de la presencia de estas moléculas en el extracto del cultivo líquido de dicha cepa de referencia.

IV.2.9- Análisis de la producción de AHLs en función de las fases de crecimiento de cultivos líquidos

La producción de AHLs por parte de *B. pertussis* fue estudiada en función de las fases de crecimiento de cultivos líquidos operados en sistemas *batch*. Para tal fin, 3 frascos Erlenmeyer de 3 litros conteniendo 600 ml de medio de cultivo SS, fueron inoculados con células correspondientes al aislado clínico Bp 953 de *B. pertussis* provenientes de placas con

ABGs, incubadas durante 48 h. La inoculación de los frascos se realizó de tal manera que la densidad celular inicial fuera igual a una DO_{650} de 0.2, en los 3 cultivos líquidos por igual. Seguidamente, los frascos fueron incubados a 36°C en un agitador orbital a 160 rpm. A distintos tiempos de incubación (12, 24 y 36 h) un cultivo líquido fue retirado del agitador, se le midió la densidad óptica a 650 nm y luego fue centrifugado a 8000 xg durante 30 min a 4°C. Cada sobrenadante de cultivo fue filtrado a través de membranas de acetato con 0,22 µm de poro para eliminar células residuales. Luego, los sobrenadantes se acidificaron con HCl hasta pH 2, se incubaron a 37°C con agitación (160 rpm) durante 24 h y fueron sujetos al procedimiento de extracción con DCM. Los extractos se concentraron 6000 veces y se analizaron mediante el ensayo de detección de AHL por difusión. Para tal fin, 100 µl de cada extracto se aplicó a discos de papel ubicados sobre una placa de Petri conteniendo medio AT semi-sólido suplementado con 50 µg/ml de X-Gal e inoculado con un cultivo líquido en fase exponencial de la cepa biosensora *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). La placa fue incubada a 30°C durante 12 h para luego evaluar el nivel de AHL en cada etapa del crecimiento por el diámetro del halo de color azul formado alrededor de los discos por inducción de la cepa biosensora. El ensayo se repitió con extractos obtenidos de cultivos líquidos independientes correspondientes al aislado clínico Bp 953 como así también a la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I.

IV.2.10- Cuantificación de Acil-homoserín-lactonas

IV.2.10.1- Separación de AHLs mediante cromatografía en placa delgada

El número de moléculas diferentes de acil-homoserín lactona presente en extractos obtenidos a partir de cultivos en biofilm de *B. pertussis* fue determinado mediante cromatografía analítica en placa delgada (TLC) siguiendo la metodología descrita por Taminiou y col (115) y Laue y col (58). La separación se realizó empleando placas cromatográficas de Sílica gel 60 F₂₅₄ Fase Reversa C₁₈ y placas de Sílica gel 60 F₂₅₄ Fase Normal (Merck, Darmstadt, Alemania) las cuales fueron previamente lavadas con metanol (Sintorgan, Argentina) con el fin de eliminar posibles impurezas. Un volumen de 20 µl correspondiente a extractos concentrados 5000 veces obtenidos a partir de 600 ml de cultivo en biofilm de *B. pertussis*, fue sembrado en placas de Sílica gel para luego introducirlas en una cuba de vidrio conteniendo la mezcla de solventes adecuada a cada tipo de placa. Asimismo, un volumen de 1 µl perteneciente a un extracto obtenido de 100 ml de cultivo líquido de *B. cepacia* ATCC 25416 y concentrado 200 veces, fue sembrado en las placas con el fin de ser utilizado como

control positivo de AHLs. Las cromatografías llevadas a cabo en placas de Fase Reversa C₁₈ fueron desarrolladas empleando una mezcla de 60% (v v⁻¹) de metanol (Sintorgan) en agua destilada y las realizadas en placas de Fase Normal se desarrollaron con una mezcla de 45% (v v⁻¹) de hexano en acetona (Sintorgan). Las cromatografías se efectuaron hasta que el frente de elusión alcanzó el margen superior de las placas y luego se secaron a temperatura ambiente. Las cromatografías fueron repetidas utilizando extractos de la cepa de referencia Tohama I y del aislado Bp 953 de *B. pertussis*, obtenidos a partir de cultivos en biofilm independientes.

IV.2.10.2- Detección de AHLs en placas TLC

Las AHLs separadas mediante TLC fueron detectadas por medio de cepas biosensoras siguiendo el procedimiento descrito por Taminau y *col* (115). Brevemente, tras la separación cromatográfica algunas placas de TLC fueron cubiertas con medio LB conteniendo 0,75% (v v⁻¹) de agar e inoculado con un cultivo líquido en fase exponencial de la cepa biosensora *C. violaceum* (CV026 y VIR07). Las placas se incubaron a 30°C durante un período de 14 a 18 h. Otras placas se cubrieron con medio AT conteniendo 0,75% (v v⁻¹) de agar, suplementado con 50 µg/ml de X-Gal e inoculado con un cultivo exponencial de la cepa biosensora *A. tumefaciens* (KYC55 y WCF47). Dichas placas se incubaron a 30°C durante un período de 8 a 12 h. Luego de la incubación, las AHLs fueron localizadas a través de spots violetas y azules, al utilizar las cepas de *C. violaceum* y *A. tumefaciens* respectivamente. Una identificación tentativa de las AHLs presentes en extractos de *B. pertussis* se llevó a cabo comparando los valores de R_f de los spots obtenidos a partir de dichos extractos respecto a los spots del extracto de la cepa de referencia de *B. cepacia*.

IV.2.11- Estimación de la concentración de AHLs producida por cultivos de *B. pertussis*

Para estimar la concentración de acil-homoserín lactona producida en crecimiento planctónico y en biofilm tanto por la cepa Tohama I como por el aislado clínico Bp 953 de *B. pertussis*, se construyó una curva de calibración mediante el empleo de un estándar sintético de AHL. Partiendo de una dilución 1/50 de la solución stock 10 mM del estándar C₁₀-HSL se realizaron diluciones seriadas 1:2 empleando dimetilsulfóxido (Anedra) como diluyente. Luego, las distintas diluciones del estándar C₁₀-HSL fueron examinadas a través del ensayo de detección de AHLs por difusión. Para tal fin, 1 µl de cada dilución del estándar se aplicó a discos de papel ubicados sobre una placa de Petri conteniendo medio AT semi-sólido

suplementado con X-Gal (50 µg/ml) e inoculado, en una relación 10:1, con un cultivo líquido en fase exponencial de *A. tumefaciens* KYC55. La placa fue incubada durante 8 h a 30°C. Luego se procedió a medir el diámetro correspondiente a los halos de coloración generados por la cepa biosensora al ser inducida por las diluciones seriadas del estándar C₁₀-HSL. A partir de los diámetros de los distintos halos y de las cantidades de AHLs ensayadas, se construyó la curva de calibración: diámetro de los halos de coloración (cm) en función de la concentración del estándar C₁₀-HSL (µg/ml). La ecuación de la curva de calibración fue utilizada para calcular las concentraciones de AHLs en los distintos cultivos de *B. pertussis*.

IV.2.12- Análisis de la inducción de cepas biosensoras por ácidos grasos

A pesar de que las cepas biosensoras utilizadas en este trabajo poseen alta especificidad AHLs, se resolvió estudiar la posibilidad de que otras moléculas producidas por *B. pertussis* fueran la causa de la inducción de dichas cepas biosensoras en los ensayos de detección. Ciertos ácidos grasos de cadena larga son algunas de las moléculas con mayor producción y secreción por parte de *B. pertussis*. Por este motivo, estándares de los ácidos tetradecanoico, hexadecanoico y octadecanoico fueron evaluados mediante el análisis de detección por difusión, empleando las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 y VIR07 como así también *A. tumefaciens* KYC55 y WCF47. Dichos ácidos grasos fueron provistos por el Instituto de Investigaciones Biológicas de La Plata (INIBIOLP). Diluciones de los mismos fueron aplicadas a discos de papel colocados sobre las superficies de medios agarizados semi-sólido, inoculados con las cepas biosensoras y contenidos en placas de Petri. Las placas correspondientes a las cepas de *C. violaceum* fueron incubadas durante 18 h mientras que las placas con las cepas de *A. tumefaciens* se incubaron durante 12 h. La inducción de las cepas biosensoras se evidenció a través de la formación de los halos de coloración. Estándares sintéticos de AHLs fueron utilizados para obtener controles positivos de la inducción correspondiente a las distintas cepas biosensoras utilizadas.

IV.2.13- Identificación de AHL mediante métodos físico-químicos

IV.2.13.1- Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) fue utilizada para la identificación de picos de absorción característicos de las AHLs, potencialmente presentes en extractos concentrados de cultivos en biofilm de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953 de *B. pertussis*, según el procedimiento descripto por Chhabra y col (116).

Asimismo, extractos concentrados obtenidos a partir de cultivos líquidos de *B. cepacia* ATCC 25416, *P. aeruginosa* PAO1, *S. marcescens* AS-1, *A. tumefaciens* NTL4, *A. tumefaciens* R10 y *S. meliloti* Rm8530 fueron empleados como controles positivos de AHLs. Treinta μl de cada extracto concentrado fueron colocados en celdas de ZnSe (13 \times 2 mm, Korth Kristalle GmbH, Alemania) y secados durante 60 min a temperatura ambiente con el fin de obtener films transparentes sobre la superficie de las celdas. Seguidamente, las celdas fueron leídas en un espectrómetro Spectrum One (Perkin-Elmer, EUA) en modo absorbancia. Los espectros IR se adquirieron en el intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} , a una velocidad de medición de 1cm/s, y mediante 64 escaneos y una resolución de 6 cm^{-1} . A partir de los espectros IR, se calcularon sus respectivas derivadas segundas para aumentar la resolución de los picos de absorción (117). Las derivadas fueron empleadas para la detección de grupos funcionales propios de los distintos tipos de AHLs, los cuales se ubican en rangos específicos del espectro IR. En la Tabla 8 se detallan los grupos funcionales característicos de cada tipo de AHL, junto con su ubicación en el espectro IR. Dichos grupos funcionales fueron utilizados para dilucidar el tipo de molécula de AHL (*N*-acil HSL, *N*-3-oxo-alcanoil HSL y *N*-3-hidroxi-acil HSL) presente en los extractos.

Tabla 8. Grupos funcionales característicos de los distintos tipos de moléculas AHLs y su ubicación en el espectro IR

AHLs	Grupo Funcional	Rango Espectral (cm^{-1})
<i>N</i> -acil-HSLs	C=O (Anillo lactona)	1780-1792
	C=O (Amida)	1643-1647
<i>N</i> -3-oxo-alcanoil-HSLs	C=O (Anillo lactona)	1781-1793
	C=O (Cetona)	1710-1724
	C=O (Amida)	1648-1654
<i>N</i> -3-hidroxi-acil-HSLs	C=O (Anillo lactona)	1774-1778
	C=O (Amida)	1638-1642

Los grupos funcionales característicos de las distintos tipos de moléculas de AHLs y sus rangos específicos de ubicación espectral fueron extraídos del trabajo publicado por Chhabra y col (116).

IV.2.13.2- Cromatografía gaseosa-espectroscopía de masas

La separación e identificación de AHLs se llevó a cabo analizando también los extractos de cultivos de *B. pertussis* mediante cromatografía gaseosa con ionización electrónica-espectroscopía de masas (GC/EI-MS) según el procedimiento descrito por Cataldi y col

(118). Para realizar este estudio se utilizó un sistema de cromatografía gaseosa interconectado a un espectrómetro de masas cuadrupolo simple (Shimadzu, EUA) controlado por computadora equipada por el programa GC-MS Lab Solution (Shimadzu). La inyección de los extractos concentrados se efectuó en el modo split (150:1) empleando una columna capilar HP-5 MS (30 m de largo y 250 μm de diámetro interno) conteniendo una matriz de 5%-fenil-metilpolixiloxano y 0.25 μm de grosor. Se utilizó helio puro (Air Liquide, Argentina) como gas carrier con un flujo de 0,8 ml min^{-1} . La temperatura inicial del horno fue de 150°C para luego aumentar hasta 275°C con un gradiente de 15°C min^{-1} . Los extractos fueron primeramente analizados por medio del modo de monitoreo con ión selectivo (*SIM*, *Selected ion monitoring*) a 143 m/z , por ser este el fragmento producido con mayor abundancia mediante ionización de las moléculas AHLs. Dicho fragmento iónico se genera a través del rearreglo de Mc Lafferty, el cual es característico de grupos carbonilos con un hidrógeno en posición γ (119). Seguidamente, los extractos fueron examinados mediante el modo de monitoreo de iones totales (Modo *Full-Scan*) en el rango de 15-800 m/z , con el fin de conseguir el espectro de masas de los picos presentes en el cromatograma obtenido con el modo *SIM*. La Tabla 9 resume las condiciones operativas de esta metodología.

Para cada cepa productora de AHL como así también para *B. pertussis*, se analizaron al menos 3 extractos provenientes de cultivo independientes. Asimismo, estándares de AHLs fueron analizados para determinar los tiempos de retención y los iones característicos de dichas moléculas. El volumen de inyección de los extractos de cultivo y estándares de AHL fue de 1 μl . Este estudio fue realizado en el CEQUINOR (Centro de Química Inorgánica, CONICET-UNLP) con la colaboración del Ing. Paul Vargas y la Dra. Rosana Romano.

Tabla 9. Condiciones operativas de la GC/MS-EI

Condición	Valor
Modo de inyección Split	150:1
Flujo del gas carrier	0,8 ml min^{-1}
Temperatura del inyector	200°C
Temperatura línea de transferencia	280°C
Fuente de ionización electrónica	70 eV
Corriente de emisión	500 μA
Temperatura MS Quad	150°C
Temperatura Fuente MS	230°C
Modo <i>SIM</i>	143 m/z
Modo <i>Full Scan</i>	15-800 m/z

IV.2.13.3- Identificación mediante HPLC MS/MS-MRM

Extractos de cultivos de *B. pertussis* fueron analizados mediante cromatografía líquida-espectroscopía de masas en tándem con monitoreo de reacción múltiple (HPLC MS/MS-MRM) basándonos en el trabajo de Gould y *col* (120), con el fin de lograr la separación e identificación de moléculas del tipo AHLs. El proceso de separación se llevó a cabo mediante elución por gradiente y la identificación a través de las transiciones M+H del ión 102 correspondiente al grupo lactona. Del mismo modo, se analizaron estándares de AHLs y extractos obtenidos de cultivos de cepas productoras de AHLs, con el objeto de registrar los picos correspondientes a las transiciones de masa MRM de dichas moléculas y sus respectivos tiempos de retención. A partir de los mencionados datos se llevó a cabo una comparación con los resultados conseguidos a partir de los extractos de *B. pertussis*. Para aquellas AHLs que no se dispuso de estándar, se evaluó el tiempo de retención relativo y la transición específica de masa con los obtenidos de los estándares analizados. El grado de concentración correspondiente a los estándares y extractos de cultivo, se expresó a través de las unidades Megacounts y kilocounts en el eje vertical de cada cromatograma. Este estudio de identificación se realizó en el CIMA (Centro de Investigaciones en Medio Ambiente, CONICET-UNLP) con la colaboración del Dr. Damián Marino.

IV.3- RESULTADOS

IV.3.1- Búsqueda de homología con sintasas de AHLs

Con el fin de buscar homología entre proteínas de la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I y distintas sintasas de AHLs, se realizó un análisis comparativo entre las secuencias de aminoácidos de proteínas de la cepa Tohama I y sintasas de AHLs pertenecientes a las 3 familias descritas hasta el momento: a) Familia I: sintasas homólogas a la enzima LuxI (43-44), b) Familia II: sintasas homólogas a la enzima LuxM (32, 57) y c) Familia III: Sintasas homólogas a la enzima HdtS (58-59).

El análisis comparativo entre sintasas de AHLs pertenecientes a la Familia I y proteínas de la cepa de referencia Tohama I, aplicando el algoritmo BlastP, permitió encontrar una proteína putativa o hipotética de dicha cepa con similitud a ciertas sintasas homólogas a LuxI. Esta proteína putativa es BP1074, la cual exhibe un dominio con actividad de aciltransferasa conservado en las sintasas homólogas a LuxI. Es importante mencionar que se emplearon distintas sintasas homólogas a la enzima LuxI como molde o *Query* para el análisis comparativo mediante Blastp. La Tabla 10 resume datos característicos de la proteína BP1074 de *B. pertussis* Tohama I.

Tabla 10. Proteína BP1074 de *B. pertussis* Tohama I con similitud a sintasas homólogas a LuxI

Características de la proteína BP1074
Proteína hipotética o putativa
Gene ID: 2666029
Locus tag: BP1074
Longitud de la secuencia: 264 aminoácidos
Dominio conservado: c100357
Actividad del dominio conservado: Aciltransferasa
Localización del dominio conservado: 24-257

Información obtenida del programa BLAST que ofrece el NIST

Las sintasas de la Familia I que presentaron homología con la proteína putativa BP1074 se describen en la Tabla 11, junto con el valor del *Score* expresado en unidades *Bits* y el valor *E*. El valor del *Score* hace referencia al alineamiento significativo producido entre las sintasas de AHLs empleadas como molde comparativo y la proteína BP1074.

Tabla 11. Sintetas homólogas a LuxI con similitud a la proteína BP1074 de *B. pertussis* Tohama I

Sintasa de AHL	Bacteria	Gene ID	Locus Tag	Score (Bits)	Valor E
Las I	<i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM 5	6990266	OCAR_7682	36,4	0,001
Cep I	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	6929503	BCAM1870	34,5	0,07
Cer I	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	3719690	RSP_0123	34,2	0,09
RleI	<i>Rhizobium leguminosarum</i> WSM1325	8016790	Rleg_5481	33,8	0,3
BpsI	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344	3087402	BMAA1347	33,4	0,8
Pml I	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243	3097087	BPSS0885	33,2	0,9
Sol I	<i>Ralstonia solanacearum</i> PSI07	9410634	RPSI07_0160	28,5	1,2

Los valores del Score junto con sus correspondientes valores E refieren al alineamiento significativo producido entre las sintetas de AHLs de la Familia I y la proteína BP1074, al realizar la búsqueda de homología mediante el programa BlastP.

El análisis comparativo aplicando el algoritmo iterativo PSI-BLAST (Position Specific Iterated BLAST) realizado entre la proteína putativa BP1074 y 604 genomas correspondientes a bacterias Gram-negativas de la base de datos del programa BLAST, permitió determinar una elevada homología entre la proteína BP1074 y 3 aciltransferasas las cuales presentan predicción de pertenecer a la familia de sintetas del tipo LuxI. Estas enzimas se describen en la Tabla 12 junto con los respectivos valores del Score y valores E.

Tabla 12. Enzimas con similitud a la proteína BP1074 halladas mediante el algoritmo iterativo PSI-BLAST

Enzima	Bacteria	Gene ID	Locus Tag	Score (Bits)	Valor E
Sintasa de AHL	<i>Azoarcus</i> sp.EbN1	3181079	ebA5570	258	2 e-67
Sintasa de AHL	<i>Methylobacillus flagellatus</i> KT	3999377	Mfla_0469	241	1 e-62
Sintasa de AHL	<i>Burkholderia glumae</i> BGR1	7907385	bglu_1g11860	236	5 e-60

Los valores del Score junto con sus correspondientes valores E hacen referencia al alineamiento significativo producido entre la proteína BP1074 y las sintetas de AHLs, al realizar la búsqueda de homología mediante el algoritmo iterativo PSI-BLAST. Las 3 enzimas son aciltransferasas con predicción de pertenecer a la familia de sintetas homólogas a LuxI.

El análisis de alineamiento de secuencias mediante la aplicación del programa CLUSTAL W consiguió establecer los porcentajes de identidad y similitud entre la proteína BP1074 y las sintetas homólogas a LuxI enunciadas anteriormente. El alineamiento de secuencias entre la sintasa LasI de *Oligotropha carboxidovorans* OM5, homóloga a la sintasa LuxI y constituida por 207 aminoácidos, y la proteína BP1074 conformada por 264 aminoácidos, exhibió una identidad del 18,9% y una similitud del 24,2% entre ambas secuencias mencionadas (Fig. 7).

mediante PSI-BLAST. En la Tabla 13 se detallan los valores de identidad y similitud determinados mediante el alineamiento de secuencias entre la proteína BP1074 y las sintasas homólogas a LuxI utilizadas como moldes en el análisis con BlastP.

Tabla 13. Valores de identidad y similitud entre BP1074 y las sintasas homólogas a LuxI, utilizadas en el análisis mediante Blastp

Bacteria	Identidad (%)	Similitud Fuerte (%)	Similitud Débil (%)
<i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM 5	18,9	9,1	15,1
<i>Burkholderia cenocepacia</i> J 2315	17,8	14,8	11,4
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	17,7	15,1	13,6
<i>Rhizobium leguminosarum</i> WSM1325	17,4	18,2	9,8
<i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344	16	16,4	14,6
<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243	16	16,4	14,2
<i>Ralstonia solanacearum</i> PSI07	15,8	15,1	12,8

Los valores de identidad, similitud fuerte y similitud débil -expresados en porcentaje- fueron determinados mediante el Análisis de Alineamiento de Secuencias, aplicando el programa CLUSTAL W, entre la proteína BP1074 y las sintasas homólogas a Lux I. Estas sintasas de AHLs fueron empleadas como moldes en el análisis comparativo mediante BlastP.

En la Tabla 14 se resumen los valores de identidad y similitud obtenidos a partir del alineamiento de secuencias, entre la proteína BP1074 y las sintasas homólogas a LuxI halladas como resultado del análisis iterativo PSI-BLAST.

Tabla 14. Valores de identidad y similitud entre BP1074 y las sintasas homólogas a LuxI, halladas mediante el análisis iterativo PSI-BLAST

Bacteria	Identidad (%)	Similitud Fuerte (%)	Similitud Débil (%)
<i>Azoarcus</i> sp.EbN1	47,3	18,6	11,7
<i>Methylobacillus flagellatus</i> KT	47,3	15,9	10,2
<i>Burkholderia glumae</i> BGR1	45,5	14,9	11,3

Los valores de identidad, similitud fuerte y similitud débil -expresados en porcentaje- fueron conseguidos por medio del alineamiento de secuencias, con el programa CLUSTAL W, entre la proteína BP1074 y las sintasas homólogas a LuxI, halladas por medio del análisis iterativo PSI-BLAST. Las aciltransferasas de estas bacterias presentan predicción de pertenecer a la familia de sintasas de AHL homólogas a LuxI.

Los resultados obtenidos mediante el análisis comparativo aplicando Blastp mostraron cierta homología entre algunas sintasas del tipo LuxI y la proteína BP1074 de la cepa Tohama I.

Sin embargo, los porcentajes de identidad y similitud obtenidos resultaron ser reducidos (Tabla 13) más allá de los valores conseguidos entre BP1074 y las aciltransferasas halladas mediante PSI-BLAST (Tabla 14). Asimismo, la secuencia de BP1047 no contiene ciertos aminoácidos que son esenciales para cumplir con la función de aciltransferasa concerniente a las sintasas del tipo LuxI.

Por otro lado, mediante el análisis comparativo aplicando el algoritmo Blastp, entre sintasas de AHLs pertenecientes a la Familia II y las proteínas de la cepa Tohama I, no se encontró una proteína de dicha cepa de referencia que presentara similitud con las sintasas homólogas a LuxM.

El estudio comparativo entre las sintasas homólogas a la enzima HdtS (Familia III) y las proteínas de la cepa Tohama I, a través del programa BlastP, permitió encontrar una proteína putativa de dicha cepa de *B. pertussis* con elevada homología a las sintasas de AHLs pertenecientes a la mencionada familia. Dicha proteína es BP0036, la cual posee la función predictiva de aciltransferasa perteneciente a la familia 1-acil-sn-glicerol 3-fosfato O-aciltransferasas y contiene los dominios clásicos de las sintasas homólogas a HdtS. Asimismo, la proteína BP0036 exhibe los 2 motivos de aminoácidos conservados en la mencionada familia de enzimas (Motivos KHQSAWET y PEGTR), los cuales se encuentran flanqueados por aminoácidos hidrofóbicos. En la Tabla 15 se resume la información correspondiente a la proteína de BP0036. Además, es importante destacar que el gen *BP0036* se encuentra en un contexto genómico similar al contexto donde se ubican los genes

Tabla 15. Proteína BP0036 de *B. pertussis* Tohama I con similitud a sintasas homólogas a HdtS

Características de la proteína BP0036	
Enzima:	Aciltransferasa de la familia 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato-O-aciltransferasas
Gene ID:	2664227
Locus tag:	BP 0036
Longitud de la secuencia:	242 aminoácidos
Motivos de aminoácidos conservados:	KHQSAWET y PEGTR
Dominios conservados:	COG0204: 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato-aciltransferasa (PlsC) cd07989: Aciltransferasa de lisofosfolípidos (LPLATs)
Localización dominios conservados:	COG0204: 10 - 242 cd07989: 53 - 228

Esta información fue obtenida a partir del programa BLAST que ofrece el NIST a través de la página web: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.

de las sintasas del tipo HdtS. Tal como se describió en la sección IV.1.7.3, dicho contexto genómico está conformado por los genes *glyQ*, *glyS* y un gen que codifica para una enzima fosfatasa con funciones generales (gen *gph*), los cuales conforman un cluster altamente conservado en las sintasas de la Familia III. La Figura 9 muestra los genes que conforman el contexto genómico donde se ubica el gen *BP0036* y describe las proteínas codificadas por dichos genes junto con sus respectivos dominios conservados.

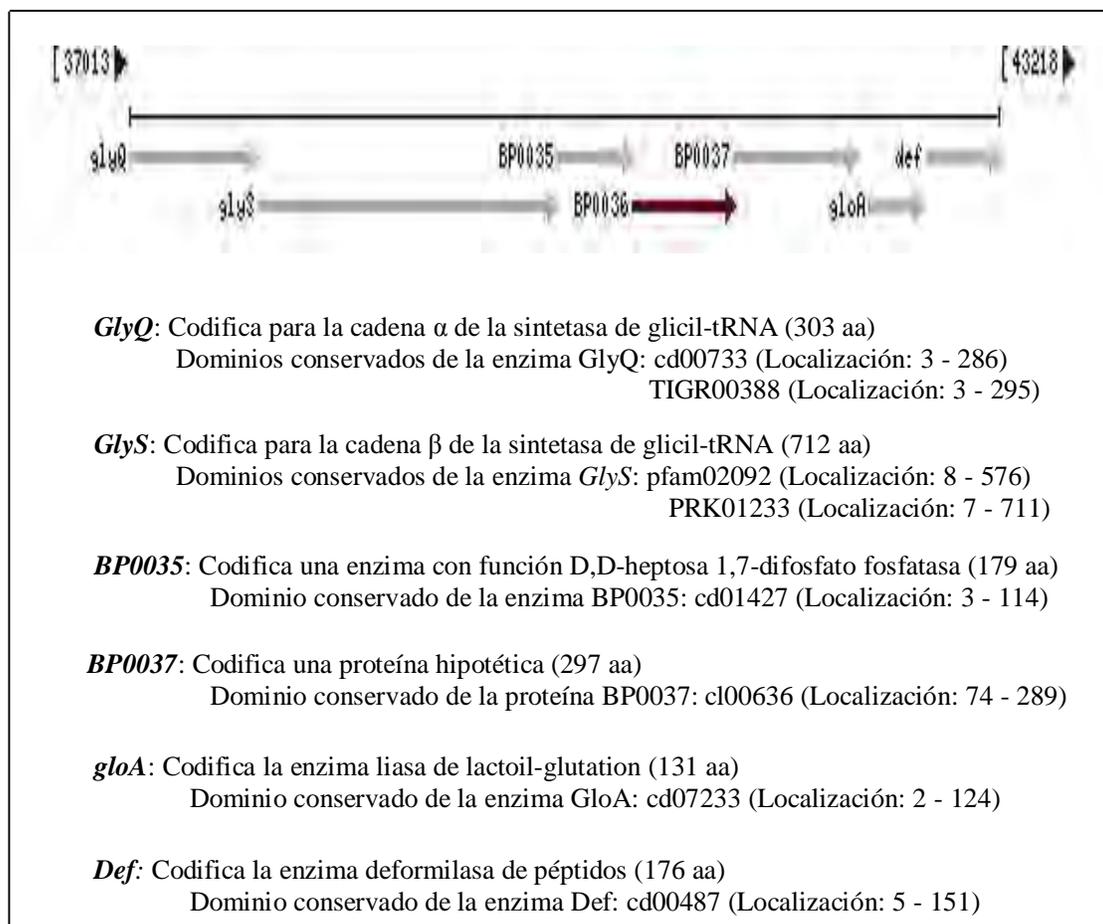


Fig. 9. Contexto genómico del gen *BP0036* de *B. pertussis* Tohama I. Se describen los genes que conforman el contexto genómico donde se ubica el gen que codifica para la enzima aciltransferasa *BP0036*. Este contexto es similar a aquellos donde se ubican los genes de las sintasas del tipo HdtS.

Las sintasas de la Familia III utilizadas como molde en el análisis comparativo mediante BlastP y que presentaron homología con la proteína putativa *BP0036*, se describen en la Tabla 16 junto con el valor del *Score* y el valor E. El valor del *Score* refiere al alineamiento significativo producido entre las sintasas de la Familia III empleadas como molde y la proteína *BP0036*.

Tabla 16. Sintetas del tipo HdtS homólogas a la proteína BP0036 de *B. pertussis* Tohama I

Tipo de Sintasa	Bacteria	Gene ID	Locus Tag	Score (Bits)	Valor E
HdtS	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243	3093197	BPSL0665	257	8 e-70
HdtS	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ	7758976	Avin_00080	177	8 e-46
HdtS	<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	4089009	PSEEN0014	177	9 e-46
HdtS	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	3480611	PFL_0011	176	2 e-45
HdtS	<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000	1181795	PSPTO_0187	176	2 e-45
HdtS	<i>Pseudomonas phaseolicola</i> 1448A	3558477	PSPPH_0009	172	3 e-44

Los valores del *Score* y sus respectivos valores E hacen referencia al alineamiento significativo producido entre las distintas enzimas del tipo HdtS y la proteína BP0036, al realizar la búsqueda de homología mediante el programa Blastp.

Cabe mencionar que todas las sintetas de AHLs utilizadas como molde en el análisis mediante Blastp, son aciltransferasas pertenecientes a la familia 1-acil-sn-glicerol 3-fosfato O-aciltransferasas, presentando los 2 dominios conservados (COG0204 y cd079890) como así también los motivos de aminoácidos (KHQSAWET y PEGTR) característicos de las enzimas homólogas a HdtS. Asimismo, los genes que codifican para estas enzimas se ubican en el contexto genómico altamente conservado especificado anteriormente. El análisis con el algoritmo iterativo PSI-BLAST entre la proteína BP0036 y 604 genomas correspondientes a bacterias Gram-negativas de la base de datos del programa BLAST, logró determinar que BP0036 también presenta similitud con otras aciltransferasas que poseen una elevada predicción de pertenecer a la familia HdtS. Dichas aciltransferasas presentan las características típicas de las sintetas de AHLs homólogas a HdtS, descriptas previamente. En la Tabla 17 se detallan las aciltransferasas con homología a BP0036, halladas mediante el algoritmo PSI-BLAST, y sus respectivos valores de *Score*.

Tabla 17. Aciltransferasas homólogas a BP0036 halladas mediante el algoritmo PSI-BLAST

Tipo de Enzima	Bacteria	Gene ID	Locus Tag	Score (Bits)	Valor E
HdtS	<i>Achromobacter piechaudii</i> ATCC 43553	293603526	HMPREF0004	431	1e-119
HdtS	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1	9401315	Hsero_0714	281	9e-75
HdtS	<i>Hermiimonas arsenicoxydans</i>	4931209	HEAR0373	278	1e-73
HdtS	<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616	5765501	Bmul_0595	274	2e-72
HdtS	<i>Ralstonia solanacearum</i> UW551	83746126	RRSL_04161	233	3e-60

Los valores de *Score* junto con sus correspondientes valores E refieren al alineamiento significativo producido entre BP1074 y las sintetas de AHLs, al realizar la búsqueda de homología mediante el algoritmo iterativo PSI-BLAST. Las 5 enzimas son aciltransferasas con predicción de pertenecer a la familia de sintetas homólogas a LuxI.

El alineamiento de secuencias aminoacídicas empleando el programa CLUSTAL W, permitió establecer los porcentajes de identidad y similitud de aminoácidos entre la proteína BP0036 y las sintasas homólogas a HdtS enunciadas anteriormente. El alineamiento entre la sintasa HdtS de *Burkholderia pseudomallei* K96243 constituida por 259 residuos de aminoácidos y la proteína BP0036 conformada por 242 residuos, permitió determinar una identidad del 46,7% y una similitud del 28,1% ente ambas secuencias. Asimismo, se logró corroborar que la secuencia de la proteína BP0036 contiene los motivos característicos de las sintasas del tipo HdtS: KHQSAWET y PEGT (Fig. 10).

```

1      MRFVRSLLLFVYFIVYTVPYATACFIAFPFMRPNARYWMAVGWCKSTLTFVARWLTGIRYR
2      MAWLR.SALYALFLIVTVIPYAFACILWAPLP-LHWRYRLTVGWPR.LAIWGARVICGIRWR
      * ::* *  ::* * .:* * **:: * : * * :*** : : : * * : **:*

1      VEGYENLPDGPVLLPKHQSAWETIALPALMPKPLCYVFKRELLYVPPFGWALGMLHMHV
2      IKGAENLPDGPAILLSKHQSAWETLFFPAHMPREVCVFYKELHMVPPFGWGLALLRMIP
      :.* *****:*.******: ** ** :*:*:** *****.*.:*:*

1      INRKDGKNAFDSVIRQGRKMAEGAWVIMFPEGTRTPVGSQGYKTGGARFAIGAGAPVV
2      IDRAGRDAFEQVVRQGVRLDEGRWPLLFPETRVPVPGKTGRFKMGGALLASRTGARI I
      *:* .*:***:.****: * : * * * :*****.* * . *:* * ** :* ** :

1      PIAHNAGRVWPRNSFTKYPGTVTVSIGQPIDTQGLTPDQLNERVENWIEAMRRIDPHAY
2      PVAHNAGECWRNNAFVKRPLITVSGPAIESQDVAVEVLNAKVQAWIEGEMRVLNPERY
      *:* ** * . * **:*.* ** :***** .*:*.:.*: * * :* : * * .***.* * :* . *

1      RHERDGARGAARASDAAHP
2      GQA-----
      :
  
```

Fig. 10. Alineamiento de secuencias entre la sintasa HdtS de *Burkholderia pseudomallei* K96243 y la proteína BP0036. El alineamiento entre las secuencias aminoacídicas de la sintasa HdtS de *B. pseudomallei* K96243 (1) y la proteína BP0036 (2) consiguió establecer una identidad del 46,7%, una similitud fuerte del 22,8%, similitud débil del 5,4% y diferencias del 25,1% entre las mencionadas secuencias. (*): Identidad entre aminoácidos, (:): Similitud fuerte entre aminoácidos, (.): Similitud débil entre aminoácidos. Mediante recuadros se indican los motivos de aminoácidos conservados en las secuencias de las sintasas del tipo HdtS.

Por otro lado, el alineamiento de secuencias entre la sintasa HdtS de *Achromobacter piechaudii* ATCC 43553 constituida por 242 residuos de aminoácidos y la proteína BP0036, permitió identificar una identidad del 84,7% y una similitud del 10,3% ente ambas secuencias. Del mismo modo, a través de este alineamiento se consiguió confirmar la presencia de los motivos conservados KHQSAWET y PEGT, en la secuencia de BP0036 (Fig. 11).

El alineamiento de secuencias también se aplicó entre la proteína BP0036 y el resto de las sintasas del tipo HdtS empleadas como molde en el análisis con Blastp, y entre BP0036 y el resto de las sintasas homólogas a HdtS, encontradas mediante PSI-BLAST.

```

1   MARLRSLLYFLFLAITVPIPYAFACILWAPLPLHWRYRLTVGWPR LAVWGAKVFCGIRWQVK
2   MAWLRSALYALFLIIVTVPIPYAFACILWAPLPLHWRYRLTVGWPR LAIWGARVICGIRWRIK
   * * * * * :*****:*****:*****:
1   GWENLPDGPAVILSKHQSAWETLFFPAYMPREVCVFYKKE LHMPFFGWGLALLRMIAIDR
2   GAENLPDGPAILLSKHQSAWETLFFPAHMPREVCVFYKKE LHMPFFGWGLALLRMIPIDR
   * *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
1   SKGRDAFDQVVKQGQTRMDEGRWPLLFPEGTRVPPGKTARFKMGGALLASRTGAVVIPVAH
2   AKGRDAFEQVVRQGVRLDEGRWPLLFPEGTRVPPGKTGRFKMGGALLASRTGARIIPVAH
   :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
1   NAGECWRRNAFVKYPGLVTL SIGPAIESKGLSPDELNQKVQEWIEGEMRRLNPERYQAH
2   NAGECWRRNAFVKRPGLITV SIGPAIESQDVAPEVLNAKVQAWIEGEMRVLNPERYQQA
   ***** *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

Fig. 11. Alineamiento de secuencias entre la sintasa HdtS de *Achromobacter piechaudii* ATCC 43553 y la proteína BP0036. El alineamiento entre las secuencias aminoacídicas de la sintasa HdtS de *A. piechaudii* ATCC 43553 (1) y la proteína BP0036 (2) demostró una identidad del 84.1%, similitud fuerte del 8,3%, similitud débil del 2,1% y diferencias del 5% entre las mencionadas secuencias. (*): Identidad entre aminoácidos, (:): Similitud fuerte entre aminoácidos, (.): Similitud débil entre aminoácidos. Los motivos de aminoácidos conservados en las secuencias de sintasas del tipo HdtS, se indican por medio de recuadros.

En la Tabla 18 se resumen los valores de identidad y similitud determinados mediante el alineamiento de secuencias, entre la proteína BP0036 y las aciltransferasas homólogas a HdtS que fueron utilizadas como moldes en el análisis comparativo mediante Blastp.

Tabla 18. Valores de identidad y similitud entre BP0036 y las enzimas homólogas a HdtS utilizadas en el análisis comparativo mediante Blastp

Bacteria	Identidad (%)	Similitud Fuerte (%)	Similitud Débil (%)
<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243	46,72	22,78	5,41
<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ	39,92	21,34	9,09
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	41,09	20,16	10,47
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	39,30	21,40	10,12
<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000	38,13	22,57	11,28
<i>Pseudomonas phaseolicola</i> 1448	38,52	21,79	11,28

Los valores de identidad, similitud fuerte y similitud débil -expresados en porcentaje- fueron determinados mediante el alineamiento de secuencias, con el programa CLUSTAL W, entre la proteína BP0036 y las aciltransferasas homólogas a HdtS que fueron empleadas como moldes en el análisis comparativo con Blastp.

Asimismo, en la Tabla 19 se detallan los valores de identidad y similitud determinados mediante el alineamiento de secuencias, entre la proteína BP0036 y las aciltransferasas homólogas a HdtS halladas como resultado del análisis iterativo con PSI-BLAST.

Tabla 19. Valores de identidad y similitud entre BP0036 y las enzimas homólogas a HdtS halladas mediante el análisis iterativo PSI-BLAST

Bacteria	Identidad (%)	Similitud Fuerte (%)	Similitud Débil (%)
<i>Achromobacter piechaudii</i> ATCC 43553	84,71	8,26	2,07
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1	49,44	17,60	7,12
<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	52,80	19,20	7,20
<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616	51,18	20,87	5,91
<i>Ralstonia solanacearum</i> UW551	48,40	19,60	8,40

Los valores de identidad, similitud fuerte y similitud débil -expresados en porcentaje- fueron determinados mediante el alineamiento de secuencias, con el programa CLUSTAL W, entre la proteína BP0036 y las aciltransferasas homólogas a HdtS halladas por medio del análisis iterativo PSI-BLAST.

En síntesis, los resultados conseguidos por medio del análisis comparativo entre secuencias de proteínas, empleando los programas BlastP y PSI-BLAST, permitieron establecer que la proteína BP0036 de *B. pertussis* Tohama I presenta homología con aciltransferasas pertenecientes a la familia de sintasas de AHL del tipo HdtS. A su vez, mediante el alineamiento de secuencias aminoacídicas se determinaron elevados porcentajes de identidad y similitud entre la proteína BP0036 y ciertas sintasas de AHL de dicha familia.

A través de los alineamientos se identificó que la secuencia de BP0036 presenta los motivos de aminoácidos y dominios conservados de las sintasas homólogas a HdtS. Además, el hecho de que el gen *BP0036* se ubique en un contexto genómico similar al de los genes que codifican las sintasas del tipo HdtS corroboraría que el producto del gen *BP0036* sea una enzima homóloga a HdtS. Estos resultados sugieren que la proteína BP0036 podría cumplir la función de sintasa de AHLs al igual que las enzimas del tipo HdtS, actuando como una aciltransferasa con la capacidad de acilar el sustrato S-adenosilmetionina para generar acil-homoserín lactonas.

Cabe agregar que mediante el análisis comparativo empleando el programa Blastp se consiguió hallar en otras especies del género *Bordetella*, como *B. bronchiseptica* RB50, *B. parapertussis* 12822, *B. petrii* DSM 12804 y *B. avium* 197N, proteínas homólogas a BP0036 y por ende homólogas a las sintasas de la Familia HdtS (datos no mostrados). Dichas proteínas son también aciltransferasas y presentan las características propias de las sintasas del tipo HdtS. Esto indica que las mencionadas especies de *Bordetella* al igual que *B. pertussis* podrían ser capaces de sintetizar moléculas del tipo AHLs.

IV.3.2- Cultivos líquidos y en biofilm

Con el fin de llevar a cabo los ensayos de detección e identificación de moléculas de Quórum Sensing, se realizaron cultivos líquidos y en biofilm de *B. pertussis* Tohama I y del aislado clínico Bp 953. En la Tabla 20 se detalla la biomasa obtenida, expresada en unidades de DO₆₅₀, y los valores de pH correspondientes a los cultivos líquidos y en biofilm desarrollados con la cepa Tohama I y el aislado Bp 953, como así también los obtenidos para cultivos líquidos de cepas productoras de AHLs.

Los resultados obtenidos permiten establecer que a través del sistema de cultivo en biofilm se consigue mayor cantidad de biomasa para Tohama I y Bp 953 en comparación con el cultivo líquido en sistema *batch*. Asimismo, en la Tabla 20 se puede advertir que todos los cultivos de *B. pertussis* y de las cepas productoras de AHLs, ya sean líquidos o en biofilm alcanzaron valores de pH elevados al término de la incubación. Este resultado confirma la necesidad de acidificar los sobrenadantes previa extracción con solventes, tal como recomiendan Yates y *col* (112), debido a que la alcalinidad de los mismos causa la ruptura del anillo lactona de las AHLs. A partir de los sobrenadantes acidificados de los diferentes cultivos, se llevaron a cabo las extracciones empleando DCM, para luego utilizar los extractos concentrados en los ensayos de detección e identificación de AHLs.

Tabla 20. Características de los cultivos bacterianos empleados en este trabajo

Bacteria	Tipo de Cultivo	DO ₆₅₀	pH
<i>B. pertussis</i> Tohama I	Líquido / 48 h	1,5	8,4
<i>B. pertussis</i> Tohama I	Biofilm / 48 h	2,6	8,7
<i>B. pertussis</i> Bp 993	Líquido / 48 h	2,7	8,8
<i>B. pertussis</i> Bp 993	Biofilm / 48 h	3,4	9,2
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Líquido / 24 h	3,8	9
<i>B. cepacia</i> ATCC 25416	Líquido / 24 h	4	9,3
<i>S. marcescens</i> AS-1	Líquido / 24 h	3,2	8,4
<i>S. meliloti</i> Rm8530	Líquido / 24 h	3	8
<i>A. tumefaciens</i> R10	Líquido / 24 h	3,5	8,6
<i>A. tumefaciens</i> NTL4	Líquido / 24 h	3,4	8,5

IV.3.3- Calibración del ensayo de detección de AHLs en placa de Petri

Las cepas biosensoras correspondientes a *C. violaceum* fueron sembradas perpendicularmente a cepas productoras de AHLs en placas de Petri conteniendo medio sólido LB. Dichas placas se incubaron a 30°C registrando los resultados de crecimiento y de

inducción de las cepas biosensoras a distintos tiempos. Las cepas productoras de AHLs empleadas en esta calibración fueron: *B. cepacia* ATCC 25416, *P. aeruginosa* PAO1 y *S. marcescens* AS-1. La formación del pigmento violaceina en los cultivos de *C. violaceum* actuó como indicador de la inducción de dichas cepas biosensoras por la acción de AHLs. En la Figura 12 se pueden observar la inducción de las cepas *C. violaceum* CV026 y VIR07 a las 14 h (A) y 18 h (B) de incubación. Todas las cepas alcanzaron óptimos crecimientos en el medio sólido LB. La formación del pigmento violeta consiguió ser visualizada a partir de las 14 h de incubación tanto para CV026 como para VIR07. Asimismo, a través de las imágenes de esta Figura se pudo comprobar que las cepas biosensoras de *C. violaceum* no poseen la capacidad de activar su propia inducción.

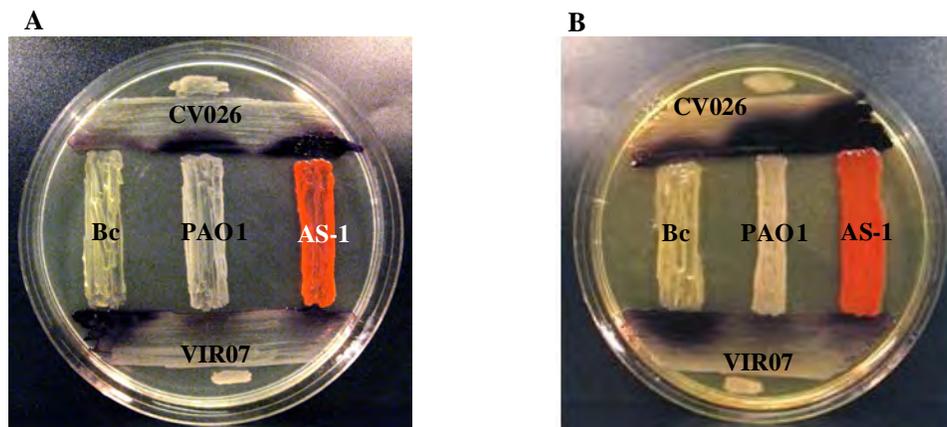


Fig. 12. Calibración del ensayo de detección de AHLs en placas de Petri utilizando las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 y VIR07. Las cepas *C. violaceum* CV026 y VIR07 fueron sembradas perpendicularmente a cepas productoras de AHLs en placas de Petri con medio sólido LB. Las placas se incubaron a 30°C registrando el crecimiento de todas las cepas y la inducción de las cepas biosensoras a las 14 h (A) y 18 h (B) de incubación. La formación de pigmento violeta es indicador de la inducción de las cepas biosensoras. CV026 y VIR07: Cepas biosensoras de *C. violaceum*. Bc: *B. cepacia* ATCC 25416, AS-1: *S. marcescens* AS-1, PAO1: *P. aeruginosa* PAO1.

De manera similar, las cepas biosensoras *A. tumefaciens* WCF47 y KYC55 fueron sembradas perpendicularmente a diferentes cepas productoras de AHLs, en placas de Petri conteniendo el medio sólido AT suplementado con 50 µg/ml de X-Gal. Dichas placas se incubaron a 30°C registrando a distintos tiempos el crecimiento de las cepas sembradas y la inducción de las cepas biosensoras. Las cepas productoras de AHLs fueron las mismas que se emplearon en el ensayo anterior más *A. tumefaciens* R10. La formación de un producto de color azul en los cultivos de las cepas biosensoras de *A. tumefaciens* actuó como indicador de la inducción de estas cepas por la acción de AHLs. En la Figura 13 se muestran los

resultados del crecimiento e inducción de las cepas biosensoras de *A. tumefaciens* a las 6 h (A) y 12 h (B) de incubación. Dichas cepas biosensoras como así también las cepas productoras de AHLs, lograron un adecuado crecimiento en el medio sólido AT. El producto de color azul generado por las cepas biosensoras de *A. tumefaciens*, consiguió ser visualizado correctamente a las 10 h de incubación para la cepa KYC55 y a las 12 h para la cepa WCF47. Asimismo, a través de esta Figura se pudo confirmar que las cepas biosensoras de *A. tumefaciens* no son capaces de activar su propia inducción.

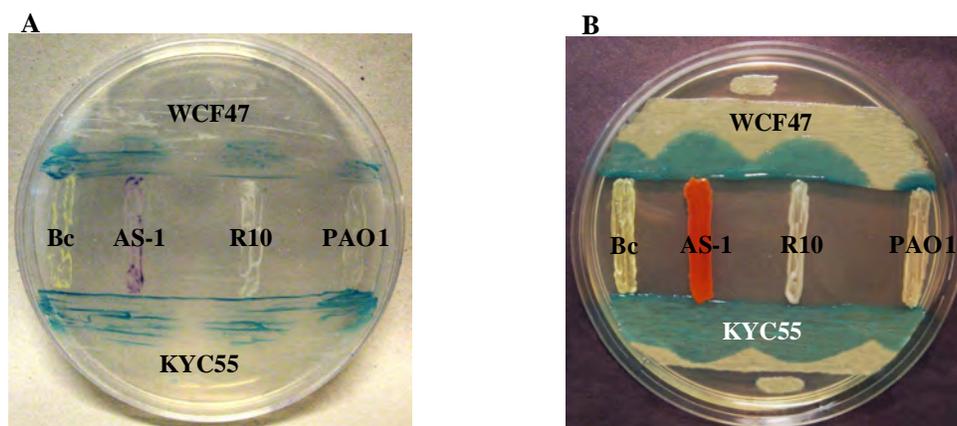


Fig. 13. Calibración del ensayo de detección de AHLs en placas de Petri empleando las cepas biosensoras *A. tumefaciens* WCF47 y KYC 55. Las cepas *A. tumefaciens* WCF47 y KYC55 fueron sembradas perpendicularmente a cepas productoras de AHLs en placas con medio AT suplementado con X-Gal. Las placas fueron incubadas a 30°C registrando el crecimiento de todas las cepas y la inducción de las cepas biosensoras a las 6 h (A) y 12 h (B) de incubación. La formación de color azul en los cultivos de las cepas biosensoras es indicador de la inducción de dichas cepas. WCF47 y KYC 55: Cepas biosensoras de *A. Tumefaciens*, Bc: *B. cepacia* ATCC 25416, AS-1: *S. marcescens* AS-1, R10: *A. tumefaciens* R10, PAO1: *P. aeruginosa* PAO1.

IV.3.4- Búsqueda de un medio de cultivo sólido para la detección de AHLs en *B. pertussis*

El análisis de detección de AHLs en *B. pertussis* se inició mediante ensayos en placas de Petri. El primer punto fue encontrar un medio de cultivo sólido adecuado que permitiera el crecimiento de *B. pertussis* Tohama I así como también de las cepas biosensoras y cepas productoras de AHLs. Para tal fin se empleó la cepa biosensora *C. violaceum* CV026 y la cepa productora de AHLs *B. cepacia* ATCC 25416, cuyos resultados de calibración para dicho ensayo de detección fueron descritos anteriormente. Además se buscó que el medio de cultivo sólido permitiera detectar la producción del pigmento violeta. La inducción de

CV026 por parte de *B. cepacia* constituyó el control positivo de la inducción de la cepa biosensora.

Inicialmente, se analizó la capacidad del medio Agar Bordet-Gengou suplementado con 14% ($v v^{-1}$) de sangre de carnero, para cumplir con los requisitos planteados. El medio ABG fue el primero en ser testeado por ser el que se utiliza para el crecimiento de *B. pertussis*. Con este medio de cultivo se consiguió el crecimiento de las cepas *B. cepacia* y *C. violaceum* CV026 más allá del óptimo crecimiento de *B. pertussis*. Sin embargo, no se logró visualizar la producción de violaceína en la cepa biosensora por acción de la cepa productora de AHLs como así tampoco por la cepa Tohama I.

A continuación se testeó el medio ABG suplementado con suero fetal bovino (PAA Laboratories GmbH, Alemania) en distintas concentraciones (2,5%, 5%, 10%, $v v^{-1}$). Con este medio se obtuvo un adecuado crecimiento de las 3 cepas sembradas, sin embargo no se detectó la inducción de la cepa biosensora por parte de *B. pertussis* ni por *B. cepacia*. Del mismo modo se analizó el medio ABG sin el suplemento de sangre ni suero fetal, obteniendo como resultado el crecimiento de la cepa biosensora y de la cepa productora de AHLs, pero con ausencia del crecimiento de *B. pertussis*. Asimismo, con este medio no se detectó la inducción de la cepa CV026 por parte del cultivo sólido de *B. cepacia*. Estos resultados sugieren que el medio ABG contiene algún componente que podría inhibir la difusión de las moléculas AHLs a través del medio sólido impidiendo de este modo la inducción de la cepa bioindicadora *C. violaceum* CV026. La actividad inhibitoria exhibida por el medio Agar Bordet-Gengou sobre la inducción de la cepa CV026, también podría presentarse sobre la inducción de las cepas biosensoras de *A. tumefaciens*.

En la Tabla 21 se resumen los resultados conseguidos al examinar el crecimiento de las cepas *B. pertussis* Tohama I, *C. violaceum* CV026 y *B. cepacia* ATCC 25416, y la inducción de la cepa biosensora al emplear las variantes del medio de cultivo Agar Bordet-Gengou.

Se analizaron entonces otros medios de cultivo con el fin de encontrar uno que cumpliera con los requerimientos planteados. Se testeó una modificación del medio SS al cual se le adicionó 1,5% ($p v^{-1}$) de agar, 0,05% ($p v^{-1}$) de casaminoácidos y concentraciones variables de metil- β -cyclodextrina (Heptakis) (0,025%, 0,05%, 0,1% $v v^{-1}$) (Sigma). El agregado de ciclodextrina se realizó debido a que esta molécula favorece el crecimiento al secuestrar ciertos componentes, como ácidos grasos producidos por *B. pertussis*. Dicho medio de cultivo fue denominado por sus siglas en inglés: CSM (Ciclodextrine Solid Medium). Con este medio de cultivo se consiguió un óptimo crecimiento de las cepas *C. violaceum* CV026 y

Tabla 21. Crecimiento de las cepas *B. pertussis* Tohama I, *C. violaceum* CV026 y *B. cepacia* ATCC 25416 e inducción de la cepa biosensora en medios conteniendo Agar Bordet-Gengou

Medio de cultivo	Crecimiento de cepas	Inducción cepa biosensora
ABG Sangre 14%	Óptimo crecimiento de <i>C. violaceum</i> , <i>B. cepacia</i> y <i>B. pertussis</i> .	Negativo
ABG Suero 2,5%	Óptimo crecimiento de <i>C. violaceum</i> , <i>B. cepacia</i> y <i>B. pertussis</i> .	Negativo
ABG Suero 5%	Óptimo crecimiento de <i>C. violaceum</i> , <i>B. cepacia</i> y <i>B. pertussis</i> .	Negativo
ABG Suero 10%	Óptimo crecimiento de <i>C. violaceum</i> , <i>B. cepacia</i> y <i>B. pertussis</i> .	Negativo
ABG	Óptimo crecimiento de <i>C. violaceum</i> y <i>B. cepacia</i> . Sin crecimiento de <i>B. pertussis</i>	Negativo

La inducción de la cepa biosensora *C. violaceum* CV026 por acción de las cepas *B. cepacia* ATCC 25416 y *B. pertussis* Tohama I fue analizada mediante la producción del pigmento violeta violaceina por parte de la cepa biosensora. (ABG: Medio de cultivo Agar Bordet-Gengou)

B. cepacia ATCC 25416. No obstante, se obtuvo únicamente un aceptable crecimiento de *B. pertussis* Tohama I al emplear el medio CSM suplementado con 0,1% (v v⁻¹) de Heptakis. Por otro lado, la inducción de la cepa biosensora CV026 por acción de los cultivos sólidos de *B. cepacia* y *B. pertussis* no fue detectada en el medio CSM suplementado con las diferentes concentraciones de ciclodextrina.

Al utilizar el medio sólido SS (1,5% p v⁻¹ de agar) se alcanzó un adecuado crecimiento de *B. cepacia* y de la cepa biosensora CV026. En este caso se consiguió la inducción de la cepa CV026 por acción del cultivo sólido de *B. cepacia*. Sin embargo, la cepa Tohama I no logró crecer en dicho medio de cultivo.

Otra opción analizada fue el medio Agar Cerebro-Corazón (BHA, por sus siglas en Ingles) al cual se le adicionó suero fetal bovino (PAA Laboratories GmbH) en distintas concentraciones (2,5%, 5%, 7,5% v v⁻¹). El medio de cultivo BHA con las diferentes concentraciones de suero, permitió el óptimo crecimiento de *B. pertussis* Tohama I como así también de *C. violaceum* CV026 y *B. cepacia* ATCC 25416. Asimismo, este medio de cultivo permitió la inducción de la cepa biosensora CV026 por acción del cultivo sólido de *B. cepacia*, detectando dicho proceso a través de la formación de violaceina. En la Tabla 22 se resumen los resultados obtenidos al testear los medios de cultivo SS agar, CSM con agregado de Heptakis y BHA suplementado con suero.

Tabla 22. Crecimiento de las cepas *B. pertussis* Tohama I, *C. violaceum* CV026 y *B. cepacia* ATCC 25416 e inducción de la cepa biosensora en los medios CSM y BHA con suero

Medio de cultivo	Crecimiento de cepas	Inducción cepa Biosensora
CSM Heptakis 0,1%	Óptimo crecimiento de <i>C. violaceum</i> , <i>B. cepacia</i> y <i>B. pertussis</i> .	Negativo
CSM Heptakis 0,05%	Óptimo crecimiento de <i>C. violaceum</i> y <i>B. cepacia</i> . Sin crecimiento de <i>B. pertussis</i> .	Negativo
CSM Heptakis 0,025%	Óptimo crecimiento de <i>C. violaceum</i> y <i>B. cepacia</i> . Sin crecimiento de <i>B. pertussis</i> .	Negativo
SS agar	Óptimo crecimiento de <i>C. violaceum</i> y <i>B. cepacia</i> . Sin crecimiento de <i>B. pertussis</i> .	Inducción por acción de <i>B. cepacia</i>
BHA Suero 7,5%	Óptimo crecimiento de <i>C. violaceum</i> , <i>B. cepacia</i> y <i>B. pertussis</i> .	Inducción por acción de <i>B. cepacia</i>
BHA Suero 5%	Óptimo crecimiento de <i>C. violaceum</i> , <i>B. cepacia</i> y <i>B. pertussis</i> .	Inducción por acción de <i>B. cepacia</i>
BHA Suero 2,5%	Óptimo crecimiento de <i>C. violaceum</i> , <i>B. cepacia</i> y <i>B. pertussis</i> .	Inducción por acción de <i>B. cepacia</i>

La inducción de la cepa biosensora *C. violaceum* CV026 por acción de cultivos sólidos de las cepas *B. cepacia* ATCC 25416 y *B. pertussis* Tohama I, se determinó a través de la visualización del pigmento violeta violaceina producido por dicha cepa biosensora.

A partir de los resultados obtenidos se consiguió establecer al medio BHA suplementado con 2,5% (v v⁻¹) de suero fetal bovino, como el adecuado para ser utilizado en los ensayos de detección de AHLs en placa de Petri. Este medio fue seleccionado debido a que cumplió con el requerimiento de permitir el crecimiento de *B. pertussis* Tohama I, como de la cepa biosensora *C. violaceum* CV026 y de la cepa productora de AHLs *B. cepacia* ATCC 25416. Asimismo, dicho medio de cultivo cumplió con el requisito de admitir el proceso de inducción de la cepa biosensora CV026 por acción del cultivo sólido de la cepa de *B. cepacia*, y por ende la producción del pigmento violeta. Con el medio BHA suplementado con suero fetal bovino, en sus distintas concentraciones, no se detectó inducción de la cepa biosensora *C. violaceum* CV026 por acción del cultivo sólido de la cepa Tohama I a pesar de conseguir, como se precisó anteriormente, un adecuado crecimiento. Estos resultados sugieren que los cultivos en medio sólido de *B. pertussis* Tohama I no producirían AHLs

detectables por la cepa biosensora *C. violaceum* CV026, al menos bajo las condiciones de crecimiento aplicadas.

A partir de estos resultados surgió la alternativa de analizar cultivos de la cepa Tohama I, en el medio BHA suplementado con suero fetal bovino (2,5% v v⁻¹), empleando otras cepas biosensoras de AHLs en lugar de *C. violaceum* CV026. Asimismo, como consecuencia de este estudio, se decidió analizar la detección de AHLs, en el mencionado medio BHA, a partir de cultivos sólidos pertenecientes a aislados clínicos de *B. pertussis*, debido a la existencia de diferencias fenotípicas con respecto a la cepa de referencia Tohama I.

IV.3.5- Detección de Acil-homoserín-lactonas en *B. pertussis*

Luego de llevar a cabo la calibración del ensayo de detección de AHLs en placa de Petri y de encontrar un medio de cultivo sólido apropiado para aplicar dicho análisis con cultivos de *B. pertussis*, se realizaron los estudios de detección de AHLs en *B. pertussis*. Para tal fin se aplicaron: el ensayo de detección en placa de Petri, el ensayo de detección por difusión y el ensayo combinado, empleando las cepas biosensoras de *A. tumefaciens* y *C. violaceum*, tal como se describió en la sección IV.2.8.

IV.3.5.1- Ensayo de detección de AHLs en cultivos en medio sólido

La cepa *B. pertussis* Tohama I fue sembrada en placas de Petri conteniendo el medio BHA suplementado con 2,5% (v v⁻¹) de suero fetal bovino. En el caso de utilizar las cepas biosensoras de *A. tumefaciens*, placas con dicho medio fueron suplementadas con 50 µg ml⁻¹ de X-Gal. Seguidamente, las placas fueron incubadas 48 h a 37°C para permitir el crecimiento de *B. pertussis*. *A posteriori*, las cepas biosensoras fueron sembradas perpendicularmente al cultivo de *Bordetella*, incubando las placas a 30°C durante al menos 18 y 12 h al utilizar las cepas de *C. violaceum* y *A. tumefaciens* respectivamente, tal como se determinó en la calibración. La formación de color violeta y color azul por las cepas biosensoras, es indicador de la inducción por acción de AHLs. Cepas productoras de AHLs se sembraron en las placas como controles positivos de la inducción.

En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos al emplear las cepas biosensoras de *C. violaceum* (CV026 y VIR07) para la detección de AHLs. Se puede observar que tanto la cepa Tohama I como las cepas biosensoras y cepas productoras de AHLs utilizadas alcanzaron un adecuado crecimiento en el medio utilizado. Sin embargo los cultivos de *B. pertussis* Tohama I no lograron inducir a las cepas biosensoras, como si los hicieron los

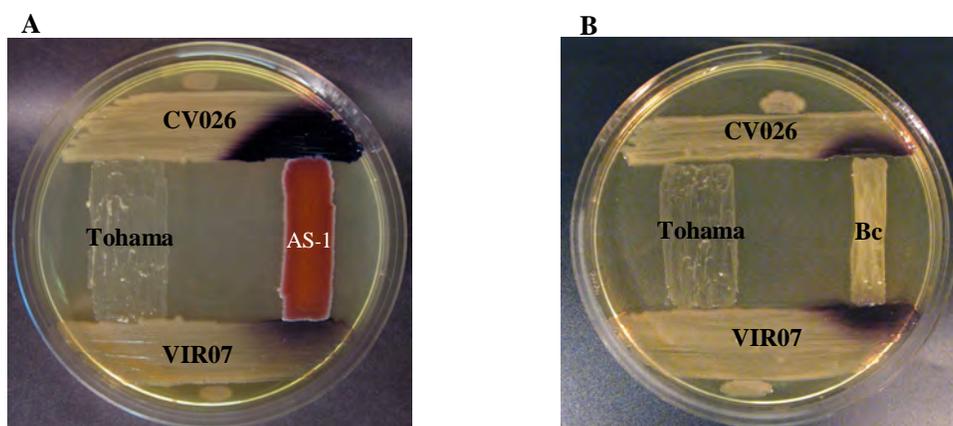


Fig. 14. Ensayo de detección de AHLs a partir de cultivos sólidos de *B. pertussis* Tohama I utilizando las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 y VIR07. Placas de Petri conteniendo medio BHA suplementado con 2,5% (v v⁻¹) de suero fueron utilizadas para sembrar *B. pertussis* Tohama I y las cepas *C. violaceum* CV026 y VIR07. Como control positivo se sembraron las cepas *S. marcescens* AS-1 (A) y *B. cepacia* ATCC 25416 (B). Las imágenes corresponden a placas incubadas durante 18 h a 30°C. CV026 y VIR07: cepas biosensoras de *C. violaceum*, Tohama: *B. pertussis* Tohama I, AS-1: *S. marcescens* AS-1 y Bc: *B. cepacia* 25416.

correspondientes a las cepas productoras de AHLs (*S. marcescens* AS-1 y *B. cepacia*). Las placas de Petri se mantuvieron a 30°C durante 24 h, pero aun así los cultivos de Tohama I no consiguieron la inducción de las cepas biosensoras. Debido a que la cepa Tohama I no logró inducir a las cepas biosensoras de *C. violaceum* se decidió aplicar el ensayo de detección de AHLs en placa de Petri, a cultivos sólidos del aislado clínico Bp 953 de *B. pertussis* bajo las mismas condiciones utilizadas con la cepa Tohama I. En la Figura 15 se puede observar que

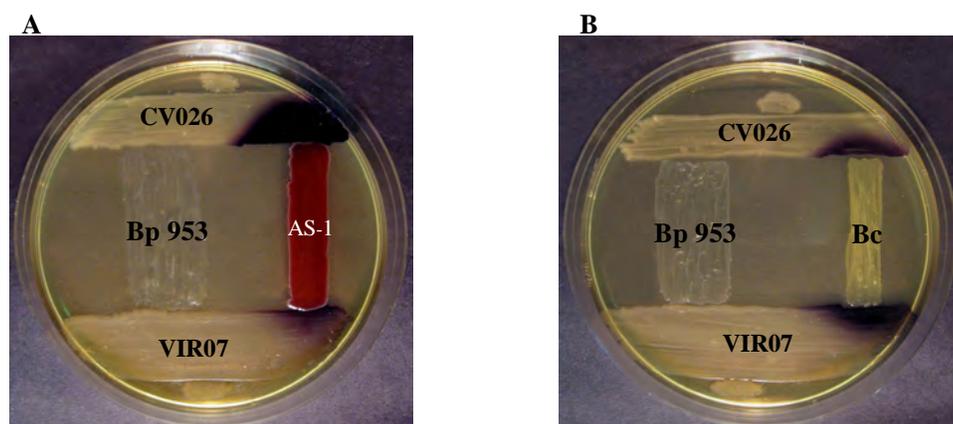


Fig. 15. Ensayo de detección de AHLs a partir de cultivos sólidos del aislado clínico Bp 953 de *B. pertussis* utilizando las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 y VIR07. En placas con medio BHA suplementado con 2,5% (v v⁻¹) de suero se sembró el aislado Bp 953 y las cepas CV026 y VIR07. Las cepas *S. marcescens* AS-1 (A) y *B. cepacia* ATCC 25416 (B) fueron sembradas como control positivo de la inducción de cepas biosensoras. Las imágenes corresponden a placas incubadas por 18 h a 30°C. CV026 y VIR07: cepas biosensoras de *C. violaceum*, Bp 953: aislado clínico de *B. pertussis*, AS-1: *S. marcescens* AS-1 y Bc: *B. cepacia* 25416.

los cultivos de Bp 953 crecieron adecuadamente en el medio BHA suplementado con suero. Sin embargo este aislado tampoco consiguió inducir a las cepas *C. violaceum* CV026 y VIR07. Las placas se mantuvieron a 30°C durante 24 h, pero aun así los cultivos del aislado clínico Bp 953 no lograron la inducción de las cepas de *C. violaceum*.

Dado los resultados obtenidos se decidió estudiar la expresión de señales de QS empleando las cepas biosensoras *A. tumefaciens* WCF47 y KYC55, las cuales presentan mayor rango de detección de AHLs como así también mayor sensibilidad a dichas moléculas. Si bien el crecimiento de *B. pertussis* Tohama I fue el adecuado, los cultivos de esta cepa no lograron inducir a las cepas biosensoras de *A. tumefaciens*, como sí lo hicieron los pertenecientes a las cepas productoras de AHLs (*S. marcescens* AS-1 y *A. tumefaciens* R10) (Fig. 16).

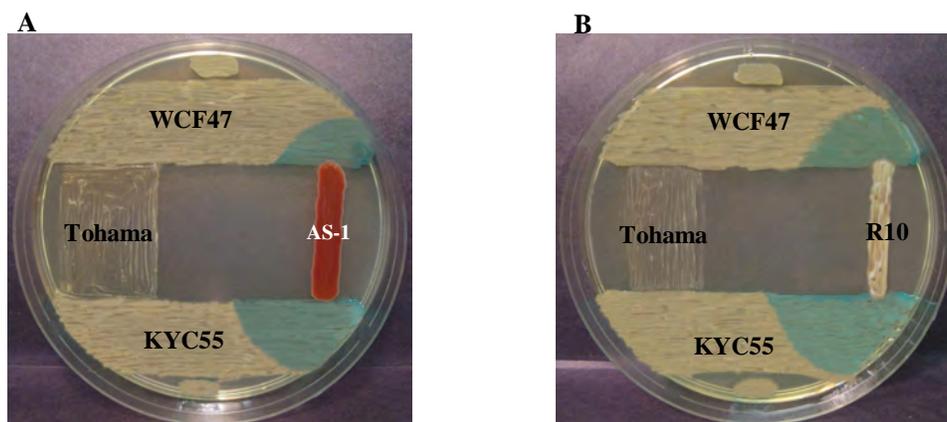


Fig. 16. Ensayo de detección de AHLs a partir de cultivos sólidos de *B. pertussis* Tohama I utilizando las cepas biosensoras *A. tumefaciens* WCF47 y KYC55. Placas con medio BHA suplementado con 2,5% (v v⁻¹) de suero y 50 µg/ml de X-Gal fueron sembradas con *B. pertussis* Tohama I y las cepas WCF47 y KYC55. Las cepas productoras de AHLs *S. marcescens* AS-1 (A) y *A. tumefaciens* R10 (B) se sembraron con el fin de obtener un control positivo de la inducción de las cepas biosensoras. El color azul es indicador de dicha inducción por acción de AHLs. Las imágenes corresponden a placas incubadas por 12 h a 30°C. WCF47 y KYC55: cepas biosensoras de *A. tumefaciens*, Tohama: *B. pertussis* Tohama I, AS-1: *S. marcescens* AS-1 y R10: *A. tumefaciens* R10.

De manera similar, el ensayo de detección de AHLs empleando las cepas biosensoras WCF47 y KYC55, fue aplicado a cultivos del aislado clínico Bp 953 tal como se realizó con la cepa Tohama I. También en este caso los resultados de inducción de las cepas biosensoras por parte de los cultivos de Bp 953 fueron negativos a pesar del óptimo crecimiento de este (Fig. 17). Las placas de Petri se mantuvieron durante 24 h a 30°C pero aún así los cultivos del aislado clínico Bp 953, como también ocurrió con Tohama I, no consiguieron la inducción de las cepas *A. tumefaciens* WCF47 y KYC55.

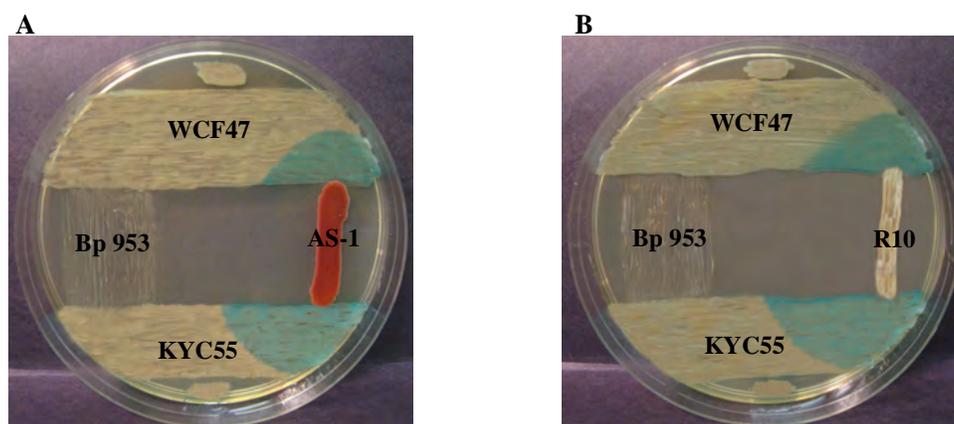


Fig. 17. Ensayo de detección de AHLs a partir de cultivos sólidos del aislado clínico Bp 953 utilizando las cepas biosensoras *A. tumefaciens* WCF47 y KYC55. En placas con medio BHA suplementado con 2,5% (v v⁻¹) de suero y 50 µg/ml de X-Gal se sembró *B. pertussis* Tohama I y las cepas WCF47 y KYC55. *S. marcescens* AS-1 (A) y *A. tumefaciens* R10 (B) fueron sembradas para obtener un control positivo de la inducción. Las imágenes corresponden a placas incubadas por 12 h a 30°C. WCF47 y KYC55: cepas biosensoras de *A. tumefaciens*, Tohama: *B. pertussis* Tohama I, AS-1: *S. marcescens* AS-1 y R10: *A. tumefaciens* R10.

Los resultados conseguidos mediante el ensayo de detección de AHLs en placa de Petri, utilizando tanto las cepas biosensoras de *C. violaceum* como las de *A. tumefaciens*, indicaron que los cultivos sólidos de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953 no inducen a dichas cepas biosensoras bajo las condiciones aplicadas en el bioensayo. Esto sugirió la alternativa de realizar la detección de AHLs a partir de extractos concentrados de cultivos líquidos y en biofilm de *B. pertussis*, mediante el bioensayo por difusión.

IV.3.5.2- Detección de AHLs a partir de extractos de cultivos de *B. pertussis*

Extractos de sobrenadantes de cultivos líquidos y en biofilm de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953 de *B. pertussis* fueron analizados mediante el ensayo de detección de AHLs por difusión. Extractos de sobrenadantes de cultivos de cepas productoras de AHLs se emplearon como controles positivos de la inducción de las cepas biosensoras. Se utilizaron placas conteniendo medio LB semi-sólido inoculado con las cepas biosensoras de *C. violaceum* y placas con medio AT semi-sólido suplementado con X-Gal e inoculado con las cepas biosensoras de *A. tumefaciens*. Los extractos de los cultivos líquidos y en biofilm de la cepa Tohama I y del aislado Bp 953 se obtuvieron a partir de 600 ml de cultivo y se concentraron 5000 veces. Dichos extractos fueron aplicados a discos de papel colocados en la superficie de los medios agarizados. La formación de halos de color violeta y de color azul

por parte de las cepas de *C. violaceum* y de *A. tumefaciens* respectivamente, fue indicador de la presencia de AHLs en los extractos. En la Figura 18 A se puede observar que el extracto obtenido a partir del cultivo líquido de Tohama I, causó la inducción de la cepa *C. violaceum* CV026, formando un halo de color violeta con un diámetro de 1,8 cm. El mismo extracto logró inducir a la cepa VIR07 de *C. violaceum* generando un halo con 1,4 cm de diámetro (Fig. 18 B). Un extracto obtenido a partir de 100 ml de un cultivo líquido de *B. cepacia* ATCC 25416 y concentrado 250 veces, originó la inducción de ambas cepas de *C. violaceum* formando halos con diámetros de 1,8 cm y 2,4 cm para CV026 (Fig. 18 A) y VIR07 (Fig. 18 B), respectivamente. Los resultados obtenidos a partir de este extracto constituyen un control positivo de la inducción de las cepas de *C. violaceum*. Un extracto obtenido a partir de 600 ml de medio SS sin inocular y concentrado 5000 veces, no activó la formación de halos de coloración por parte de la cepa CV026 como tampoco de VIR07 (Fig. 18 A y B), sugiriendo que dicho medio no contiene moléculas con actividad inductora de estas cepas biosensoras.

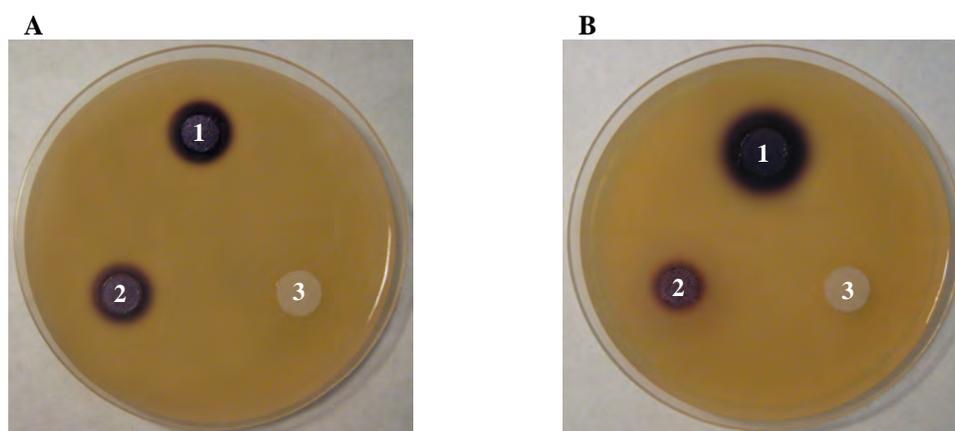


Fig. 18. Ensayo de detección de AHLs por difusión empleando las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 y VIR07. Extractos obtenidos a partir de cultivos líquidos fueron aplicados a discos de papel colocados sobre medio LB semi-sólido inoculado con las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 (A) y *C. violaceum* VIR07 (B). La formación de halos de color violeta es indicador de la presencia de AHLs en los extractos. 1: 1 μ l de extracto de *B. cepacia* 25416, concentrado 250 veces, obtenido a partir de 100 ml de cultivo líquido; 2: 50 μ l de extracto de *B. pertussis* Tohama I, concentrado 5000 veces, obtenido de 600 ml de cultivo líquido; 3: 50 μ l de extracto de 600 ml de medio de cultivo SS sin inocular, concentrado 5000 veces.

En la Figura 19 se muestran los resultados del análisis de extractos de cultivos líquidos y en biofilm de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953 de *B. pertussis*, empleando la cepa biosensora CV026 de *C. violaceum*. El extracto correspondiente al cultivo en biofilm de Tohama I logró la inducción de la cepa CV026, generando la formación de un halo de

coloración con un diámetro de 2,6 cm, comparativamente con el halo de 1,7 cm obtenido a partir del extracto del cultivo líquido de dicha cepa de referencia (Fig. 19 A). Asimismo, el extracto conseguido a partir del cultivo en biofilm del aislado Bp 953 causó la inducción de la cepa CV026 formando un halo de 4,1 cm de diámetro, mientras que el halo generado por el extracto perteneciente al cultivo líquido del mencionado aislado clínico fue de 2,7 cm (Fig. 19 B). El extracto control de *B. cepacia* generó halos de coloración con diámetros de 1,9 cm (Fig. 19 A y B). Los resultados obtenidos indican que los extractos de cultivos líquidos y en biofilm de la cepa Tohama I y al aislado clínico Bp 953 de *B. pertussis* podrían contener moléculas del tipo AHLs detectables por las cepas *C. violaceum* CV026 y VIR07.

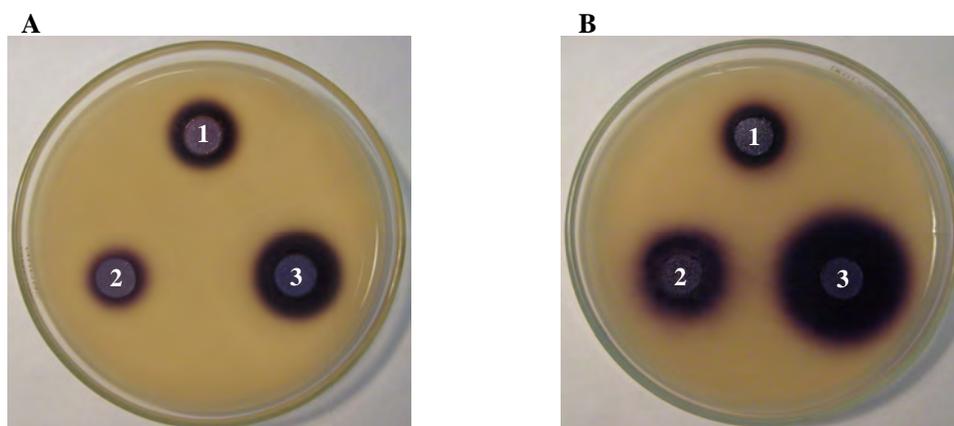


Fig. 19. Ensayo de detección de AHLs por difusión utilizando la cepa biosensora *C. violaceum* CV026. Extractos obtenidos a partir de cultivos líquidos y en biofilm correspondientes a la cepa Tohama I (A) y al aislado clínico Bp 953 (B) de *B. pertussis* fueron aplicados a discos de papel colocados sobre medio LB semi-sólido inoculado con la cepa *C. violaceum* CV026. La formación de halos de color violeta es indicador de la presencia de AHLs en los extractos. **1:** 1 μ l de extracto concentrado 250 veces, obtenido de 100 ml de cultivo líquido de *B. cepacia* ATCC 25416; **2:** 50 μ l de extracto concentrado 5000 veces, conseguido de 600 ml de cultivo líquido correspondiente a Tohama I (A) y Bp 953 (B); **3:** 50 μ l de extracto concentrado 5000 veces, obtenido de 600 ml de cultivo en biofilm correspondiente a Tohama I (A) y Bp 953 (B).

Posteriormente se decidió analizar la presencia de AHLs empleando las cepas biosensoras de *A. tumefaciens* KYC55 y WCF47. El extracto del cultivo líquido de la cepa Tohama I produjo la inducción de la cepa *A. tumefaciens* KYC55, dando lugar a un halo de color azul con un diámetro de 2,8 cm (Fig. 20 A). Del mismo modo, dicho extracto logró inducir a la cepa WCF47 de *A. tumefaciens* generando un halo con 2,6 cm (Fig. 20 B). Un extracto correspondiente a 100 ml de un cultivo líquido de *P. aeruginosa* PAO1 y concentrado 250 veces, causó la inducción de ambas cepas biosensoras de *A. tumefaciens*, con formación de halos de 2,5 cm de diámetro (Fig. 20 A y B). Los resultados conseguidos a través del

extracto de la cepa PAO1 conformaron un control positivo para la inducción de ambas cepas de *A. tumefaciens*. El extracto obtenido a partir de 600 ml de medio de cultivo líquido SS sin inocular y concentrado 5000 veces, no activó la formación de halos por parte de las cepas KYC55 y WCF47 indicando que dicho medio de cultivo tampoco contiene moléculas con actividad inductora de estas cepas biosensoras (Fig. 20 A y B).

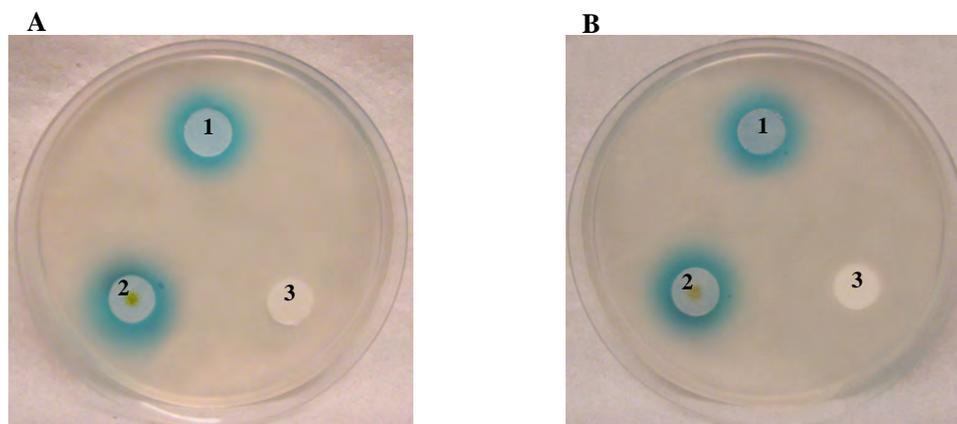


Fig. 20. Ensayo de detección de AHLs por difusión empleando las cepas biosensoras *A. tumefaciens* KYC55 y WCF47. Extractos obtenidos a partir de cultivos líquidos fueron aplicados a discos de papel colocados sobre medio LB semi-sólido suplementado con X-Gal e inoculado con la cepa biosensora *A. tumefaciens* KYC55 (A) y *A. tumefaciens* WCF47 (B). La formación de halos de color azul es indicador de la presencia de AHLs en los extractos. 1: 1 μ l de extracto concentrado 250 veces, obtenido de 100 ml de cultivo líquido de *P. aeruginosa* PAO1; 2: 50 μ l de extracto concentrado 5000 veces, conseguido de 600 ml de cultivo líquido de *B. pertussis* Tohama I; 3: 50 μ l de extracto concentrado 5000 veces, obtenido de 600 ml de medio de cultivo SS sin inocular.

La Figura 21 muestra los resultados del análisis de detección de AHLs a partir de extractos de cultivos líquidos y biofilm correspondientes a la cepa Tohama I y al aislado clínico Bp 953, utilizando la cepa biosensora KYC55 de *A. tumefaciens*. El extracto del cultivo en biofilm de Tohama I dio lugar a la formación de un halo de color azul con un diámetro de 5,2 cm, en comparación con el halo de 2,8 cm de diámetro conseguido a partir del extracto perteneciente al cultivo líquido de dicha cepa (Fig. 21 A). Además, el extracto del cultivo en biofilm perteneciente al aislado Bp 953 generó un halo de 6,3 cm, mientras que el halo formado a partir del extracto del cultivo líquido de dicho aislado fue de 4,7 cm (Fig. 21 B). El extracto correspondiente al cultivo líquido de *P. aeruginosa* PAO1 formó halos de coloración de 2,4 cm de diámetro (Fig. 21 A y B).

Los resultados obtenidos empleando las cepas biosensoras de *A. tumefaciens* sugieren que los extractos pertenecientes a la cepa Tohama I y al aislado clínico Bp 953 de *B. pertussis*

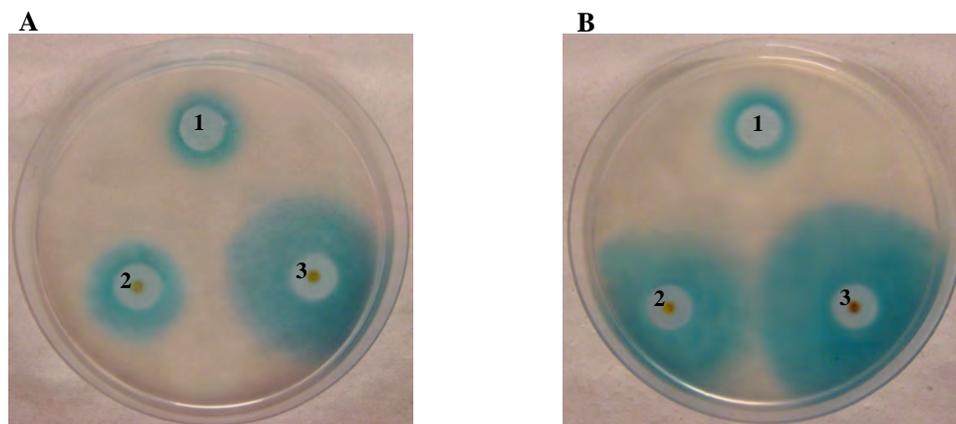


Fig. 21. Ensayo de detección de AHLs por difusión utilizando la cepa biosensora *A. tumefaciens* KYC55. Extractos de cultivos líquidos y biofilm correspondientes a la cepa Tohama I y al aislado clínico Bp 953 de *B. pertussis* fueron aplicados a discos de papel colocados sobre medio LB semi-sólido suplementado con X-Gal e inoculado con la cepa *A. tumefaciens* KYC55. La formación de halos de color azul es indicador de la presencia de AHLs en los extractos. **1:** 1 μ l de extracto concentrado 250 veces obtenido de 100 ml de cultivo líquido de *P. aeruginosa* PAO1; **2:** 50 μ l de extracto concentrado 5000 veces, obtenido de 600 ml de cultivo líquido correspondiente a la cepa Tohama I (**A**) y al aislado Bp 953 (**B**); **3:** 50 μ l de extracto concentrado 5000 veces, obtenido a partir de 600 ml de cultivo en biofilm correspondiente a la cepa Tohama I (**A**) y al aislado Bp 953 (**B**).

contendrían moléculas del tipo AHLs detectables por las cepas KYC55 y WCF47 de *A. tumefaciens*. La Tabla 23 resume los valores de los diámetros correspondientes a los halos de coloración, generados como resultado de la inducción de las cepas biosensoras empleadas.

Tabla 23. Diámetro de los halos de coloración obtenidos como resultado de los ensayos de detección de AHLs aplicados a extractos de cultivos de *B. pertussis*

Origen del extracto	<i>C. violaceum</i>		<i>A. tumefaciens</i>	
	CV026	VIR07	KYC55	WCF47
Cultivo líquido de la cepa Tohama I	1,7	1,4	2,8	2,6
Cultivo en biofilm de la cepa Tohama I	2,6	2,4	5,2	5
Cultivo líquido del aislado clínico Bp 953	2,7	2,5	4,7	4,5
Cultivo en biofilm del aislado clínico Bp 953	4	3,8	6,3	6,1

Los diámetros a los halos de coloración se expresan en centímetros. El volumen de los cultivos líquidos y en biofilm fue de 600 ml. Los extractos de dichos cultivos fueron concentrados 5000 veces. En todos los casos se analizaron 50 μ l de cada extracto concentrado.

IV.3.5.3- Detección de AHLs mediante ensayo combinado

En una placa con medio BHA suplementado con suero y X-Gal se sembraron de manera perpendicular la cepa biosensora *A. tumefaciens* KYC55 y *B. pertussis* Tohama I. Asimismo, en un disco de papel ubicado próximo al cultivo de la cepa biosensora se aplicaron 50 µl del extracto de un cultivo líquido de la cepa Tohama I. La formación del color azul por la cepa biosensora KYC55 es indicador de la inducción de dicha cepa por acción de AHLs. En la Figura 22 se observa que el cultivo de *B. pertussis* Tohama I no consiguió producir la inducción de la cepa biosensora KYC55 a pesar de alcanzar un óptimo crecimiento. No obstante, el extracto del cultivo líquido de Tohama I logró la inducción de la cepa biosensora dando lugar a la formación de color azul. El aislado clínico Bp 953 generó los mismos resultados que se consiguieron con la cepa de referencia Tohama I (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos confirman que *B. pertussis* produciría alguna molécula del tipo AHL pero en baja cantidad, por lo cual solo son detectadas a partir de extractos de cultivos líquidos o en biofilm altamente concentrados y no a través de cultivos en medio sólido. Debido a que la detección de AHLs solo ocurrió a partir de cultivos con elevada cantidad de biomasa se consiguió corroborar que la actividad inductora exhibida por *B. pertussis* podría estar causada por moléculas señal de Quórum Sensing cuya síntesis es dependiente de la densidad celular.

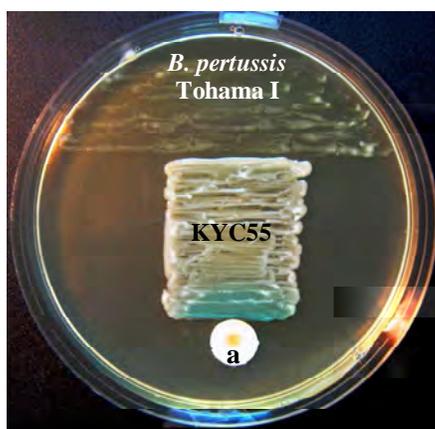


Fig. 22. Ensayo combinado para detección de AHLs. En una placa con medio BHA suplementado, se sembraron perpendicularmente la cepa *B. pertussis* Tohama I y la biosensora *A. tumefaciens* KYC55. En un disco de papel ubicado próximo al cultivo de KYC55 se aplicó 50 µl de un extracto de cultivo líquido de la cepa Tohama I (a). La producción de color azul en el cultivo de KYC55 indica la presencia de AHLs en el extracto del cultivo líquido de Tohama I.

IV.3.6- Análisis de la producción de AHLs durante el crecimiento de *B. pertussis* en medio líquido

La mayoría de los microorganismos que poseen un sistema de comunicación del tipo Quórum Sensing produce mayor concentración de moléculas autoinductoras durante la fase

de crecimiento exponencial tardío o en la fase estacionaria temprana (113, 121-122). Por este motivo, se decidió estudiar la producción de AHLs por parte de *B. pertussis* en función de las fases de crecimiento en cultivos líquidos operados en sistema *batch*. Extractos correspondientes a 3 cultivos líquidos de *B. pertussis* de 12, 24 y 36 h de incubación, fueron analizados mediante detección de AHLs por difusión, empleando la cepa biosensora *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). El nivel de AHL en cada fase de crecimiento fue evaluado por el diámetro de los halos de color azul formados por inducción de la cepa sensora. La Figura 23 muestra los halos de coloración correspondientes a los extractos del aislado clínico Bp 953. Los diámetros de dichos halos aumentan en función del tiempo de incubación.



Fig. 23. Producción de AHLs en función de la fase de crecimiento. Extractos de 3 cultivos líquidos del aislado clínico Bp 953 de *B. pertussis* incubados a distintos tiempos, fueron sujetos al ensayo de detección de AHLs por difusión, utilizando la cepa biosensora *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). **1:** Extracto de cultivo de 12 h de incubación. **2:** Extracto de cultivo de 24 h de incubación. **3:** Extracto de cultivo de 36 h de incubación.

En la Tabla 24 se muestran características de los cultivos líquidos del aislado clínico Bp 953 a partir de los cuales se obtuvieron los extractos analizados. Del mismo modo, en dicha Tabla se describen los diámetros de los halos de coloración formados por la acción inductora de los extractos.

Tabla 24. Características de los cultivos líquidos del aislado clínico Bp 953 de *B. pertussis* incubados a distintos tiempos y sus respectivos diámetros de los halos de coloración

Tiempo de incubación (h)	Cultivos líquidos de Bp 953		Halos de coloración
	DO ₆₅₀	pH	Diámetro (cm)
12	0,72	8,05	3
24	1,40	8,28	4,7
36	1,52	8,45	6

Los valores de biomasa (DO₆₅₀) y pH correspondientes a los cultivos líquidos empleados para el análisis de la producción de AHLs en función de las fases de crecimiento, como así también los diámetros de los halos de coloración obtenidos, se indican para los distintos tiempos de incubación.

Resultados similares fueron obtenidos con la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I. Se observa que el aumento del diámetro de los halos está relacionado con el incremento de biomasa (DO_{650}) de los cultivos líquidos. Es decir que la actividad inductora de los extractos de *B. pertussis* aumenta en función de las etapas del crecimiento de los cultivos, por lo que dicha actividad estaría ocasionada por moléculas de Quórum Sensing como las acil-homoserín lactonas cuya síntesis depende de la densidad poblacional.

IV.3.7- Cromatografía en placa delgada de extractos de cultivo

Con el fin de avanzar en la caracterización química de la/las moléculas de acil-homoserín lactona presentes en extractos de cultivos de *B. pertussis*, se utilizó la técnica de cromatografía en placa delgada (TLC), tal como se detalló en la sección IV.2.10. Las AHLs separadas por TLC fueron localizadas a través de spots azules y violetas generados por las cepas biosensoras de *A. tumefaciens* y *C. violaceum*, respectivamente. Se analizaron extractos concentrados de *B. pertussis* obtenidos a partir de cultivos en biofilm. Asimismo, un extracto concentrado correspondiente a un cultivo líquido de *B. cepacia* ATCC 25416 fue empleado como control positivo de AHLs debido a que esta cepa de referencia produce las moléculas C_6 -HSL (PM: 199) y C_8 -HSL (PM: 227) (82). En una primera etapa, los extractos fueron analizados empleando placas de Sílica gel 60 F₂₅₄ Fase Reversa C₁₈ junto con la cepa biosensora *A. tumefaciens* KYC55. A través de este análisis se consiguió la detección, para el extracto de la cepa *B. pertussis* Tohama I, de un spot ubicado en el punto de siembra ($R_f = 0$) y para el extracto control de *B. cepacia*, de un spot con un R_f de 0,5 (Fig. 24).

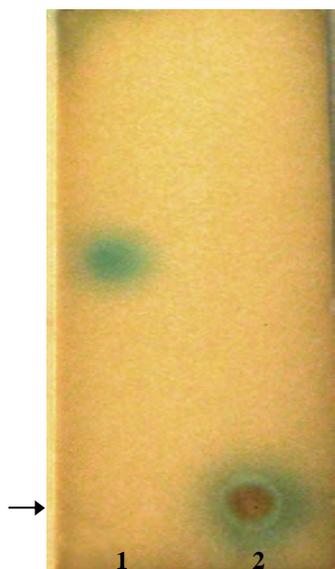


Fig. 24. Cromatografía en placa de fase reversa. La detección de las AHLs separadas mediante cromatografía en placa de fase reversa C₁₈ se realizó empleando la cepa biosensora *A. tumefaciens* KYC55. El extracto de *B. cepacia* generó la formación un spot con un R_f de 0,5 (**Línea 1**) y el extracto de *B. pertussis* Tohama I causó la aparición un spot ubicado en el punto de siembra ($R_f = 0$) (**Línea 2**). La flecha indica el punto de siembra de los extractos analizados. Estos resultados se observaron a las 10 h de incubación.

Evidentemente, por medio de placas de fase reversa no se consiguió una apropiada separación de las moléculas AHLs correspondientes al extracto de Tohama I. Por este motivo, se decidió reemplazarlas por placas de Sílica gel 60 F₂₅₄ Fase Normal y una mezcla de Acetona/Hexano (55:45, v v⁻¹). En estos casos, la detección de las AHLs se realizó utilizando las cepas biosensoras CV026 y VIR07 de *C. violaceum* y WCF47 y KYC55 de *A. tumefaciens*. El extracto correspondiente a *B. pertussis* Tohama I provocó la formación de un spot de gran intensidad con un R_f de 0,53 al llevar a cabo la detección con la cepa biosensora *C. violaceum* CV026 (Fig. 25 A) y un spot de mediana intensidad con R_f de 0,52 al aplicar la detección con la cepa biosensora VIR07 de *C. violaceum* (Fig. 25 B). El extracto de *B. cepacia* indujo la formación de un spot con R_f de 0,81 al realizar la detección con la cepa biosensora CV026 (Fig. 25 A) como también con VIR07 (Fig. 25 B). Cabe precisar que este spot resultó de mayor tamaño al emplear la cepa biosensora VIR07.

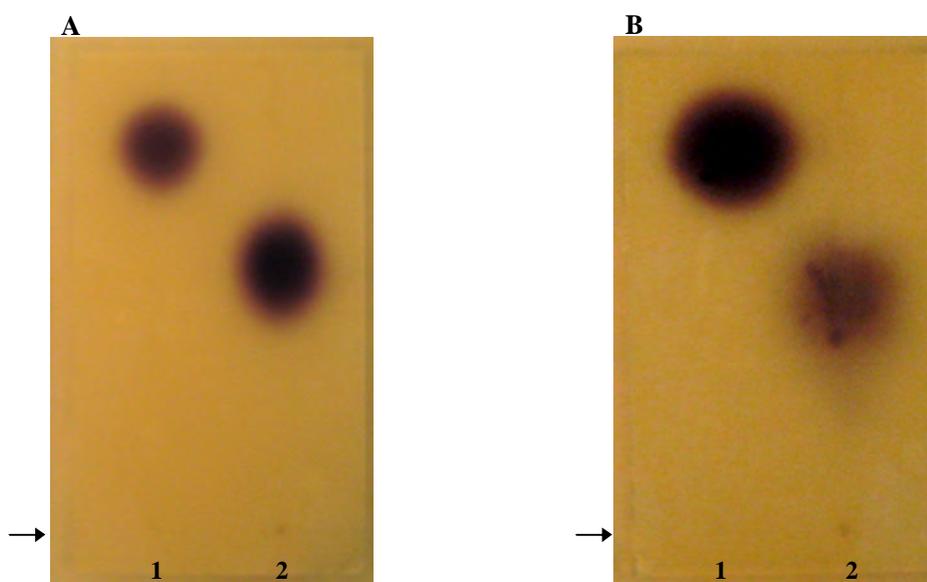


Fig. 25. Cromatografías en placas de fase normal y detección con cepas de *C. violaceum*. Las AHLs separadas mediante cromatografía en placa de fase normal fueron detectadas empleando las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 (A) y VIR07 (B). El extracto de *B. cepacia* generó la formación de un spot con un R_f de 0,81 al utilizar la cepa biosensora CV026 (Línea 1, A) como así también con la cepa VIR07 (Línea 1, B). El extracto de *B. pertussis* Tohama I provocó la formación de un spot intenso con R_f de 0,53 al aplicar la cepa CV026 (Línea 2, A) y un spot con R_f de 0,52 al emplear la cepa VIR07 (Línea 2, B). Las flechas indican los puntos de siembra de los extractos analizados. Estos resultados fueron observados a las 16 h de incubación.

Seguidamente, aplicando la cepa biosensora *A. tumefaciens* WCF47 para la detección de las AHLs separadas mediante cromatografía en placa de fase normal, se observó que el extracto de *B. pertussis* Tohama I activó la formación de un spot intenso con un valor R_f de 0,77 y

otro spot pequeño y de escasa intensidad con un R_f de 0,51 (Fig. 26 A). A su vez, el extracto de *B. cepacia* produjo un spot de gran tamaño e intensidad con un R_f de 0,80 (Fig. 26 A). Por otro lado, la utilización de *A. tumefaciens* KYC55 para la detección de AHLs, reveló que el extracto de Tohama I causó la formación de 2 spots cuyos R_f fueron de 0,74 y 0,50, ambos con mayor tamaño respecto a los obtenidos con la cepa WCF47 (Fig. 26 B). Asimismo, el extracto de *B. cepacia* generó un spot de gran intensidad y tamaño con un R_f de 0,83 y otro spot de menor tamaño con un R_f de 0,60; el cual no fue detectado con WCF47 (Fig. 26 B).

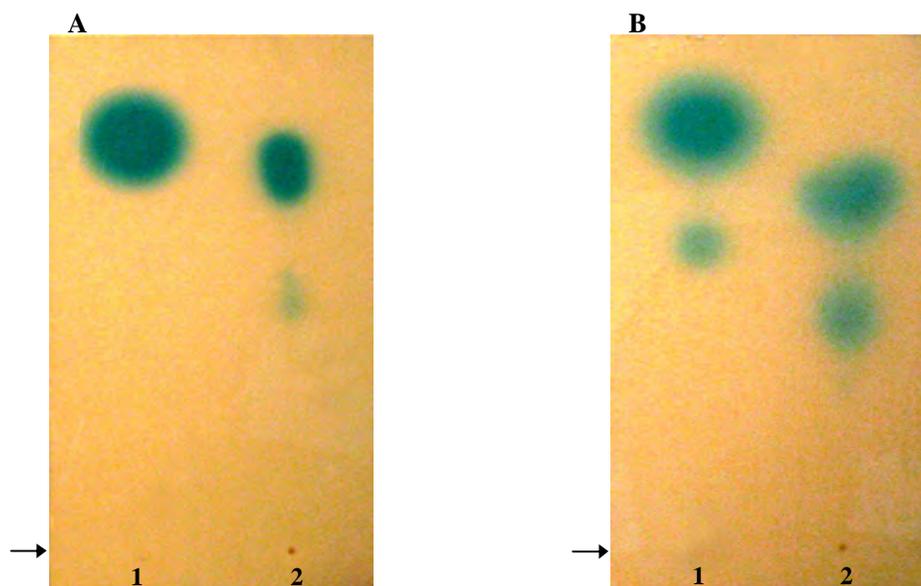


Fig. 26. Cromatografías en placas de fase normal y detección con cepas de *A. tumefaciens*. Las AHLs separadas mediante cromatografía en placa de fase normal se detectaron utilizando las cepas biosensoras *A. tumefaciens* WCF47 (A) y KYC55 (B). El extracto de *B. cepacia* indujo la formación de un spot con un R_f de 0,80 al emplear la cepa WCF47 para la detección de AHLs (Línea 1, A) y 2 spots con R_f de 0,83 y 0,6 al utilizar la cepa KYC55 (Línea 1, B). El extracto de *B. pertussis* Tohama I generó 2 spots con R_f de 0,77 y 0,51 al aplicar la cepa WCF47 (Línea 2, A) y 2 spots con R_f de 0,74 y 0,50 al emplear la cepa KYC55 (Línea 2, B). Las flechas indican los puntos de siembra de los extractos examinados. Estos resultados se obtuvieron a las 10 h de incubación.

Cabe mencionar que un extracto obtenido a partir de medio de cultivo SS no provocó la formación de spots al utilizar la cepa *A. tumefaciens* KYC55, confirmando que este medio no contiene moléculas con actividad inductora de las cepas biosensoras (resultado no mostrado). Asimismo, extractos obtenidos a partir de cultivos en biofilm del aislado clínico Bp 953, fueron analizados mediante cromatografía en placa de fase normal junto con la detección de AHLs a través de cepas biosensoras, bajo las mismas condiciones aplicadas con el extracto de la cepa Tohama I, obteniendo resultados similares a los de dicha cepa de referencia (resultados no mostrados). En la Tabla 25 se resumen los valores de R_f de los

spots obtenidos mediante cromatografía en placa delgada de fase normal y detección con cepas biosensoras, a partir de los extractos de *B. pertussis* Tohama I y de *B. cepacia* ATCC 25416.

Tabla 25. Valores R_f de los spots obtenidos por cromatografía en placa delgada de fase normal a partir de extractos de *B. pertussis* Tohama I y *B. cepacia* ATCC 25416

Extracto de cultivo	Biosensor	Nº de Spots	R_f
<i>B. pertussis</i> Tohama I	CV026	1	0,53
	VIR07	1	0,52
	WCF47	2	0,77; 0,51
	KYC55	2	0,74; 0,50
<i>B. cepacia</i> ATCC 25416	CV026	1	0,81
	VIR07	1	0,81
	WCF47	1	0,80
	KYC55	2	0,83; 0,60

Las cepas biosensoras de *C. violaceum* (CV026 y VIR07) y de *A. tumefaciens* (WCF47 y KYC55) fueron empleadas para la detección de las AHLs separadas mediante cromatografía en placa de fase normal. Los spots son indicadores de la presencia de AHLs en los extractos de *B. pertussis* Tohama I y *B. cepacia* ATCC 25416.

Los resultados obtenidos indican que los extractos correspondientes a cultivos de *B. pertussis* contendrían al menos 2 moléculas diferentes de acil-homoserín lactonas detectables por las cepas biosensoras de *C. violaceum* y *A. tumefaciens*. Los valores R_f de los spots obtenidos en las cromatografías, sugieren que estas 2 moléculas tendrían un peso molecular similar a las AHLs pertenecientes a la cepa *B. cepacia* ATCC 25416.

IV.3.8- Estimación de la concentración de AHLs producida por *B. pertussis*

Con el fin obtener una estimación de la concentración de AHLs en cultivos líquidos y en biofilm de *B. pertussis* Tohama I y del aislado clínico Bp 953, se construyó una curva de calibración empleando como patrón el estándar sintético C₁₀-HSL (10mM). Para tal fin, 6 diluciones de dicho estándar fueron analizadas mediante el ensayo de detección de AHLs por difusión. En la Figura 27 se pueden observar los halos de color azul formados como resultado de la inducción de la cepa biosensora *A. tumefaciens* KYC55 por acción de las distintas concentraciones de C₁₀-HSL ensayadas. Los diámetros de los halos de coloración fueron medidos con el objeto de construir la curva de calibración.

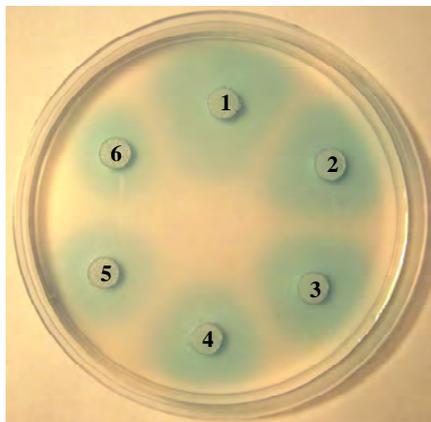


Fig. 27. Halos de coloración generados por la acción de diluciones seriadas de C₁₀-HSL. Diluciones del estándar C₁₀-HSL se sembraron en discos de papel colocados sobre medio AT semi-sólido suplementado con X-Gal e inoculado con la cepa biosensora *A. tumefaciens* KYC55. Los halos de coloración con distinto diámetro fueron generados por acción de las concentraciones variables de dicho estándar. Diluciones de C₁₀-HSL: 1: 1/50, 2: 1/60, 3: 1/70, 4: 1/80, 5: 1/90, 6: 1/100.

La Figura 28 muestra la curva de calibración obtenida a partir de los diámetros de los halos y de las concentraciones de C₁₀-HSL analizadas. Aplicando el cálculo de regresión lineal a la curva de calibración, se consiguió determinar la ecuación de la recta correspondiente.

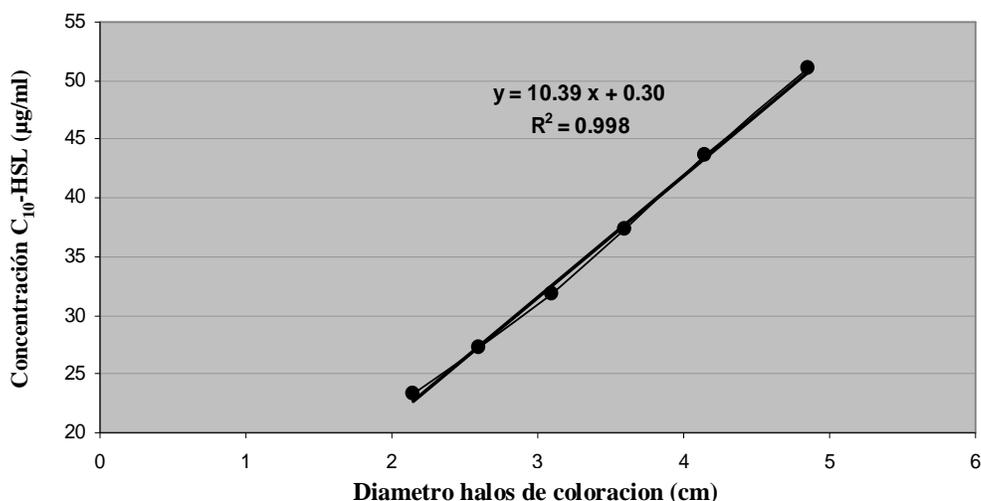


Fig. 28. Diámetro de los halos de coloración en función de las concentraciones de C₁₀-HSL. Las distintas concentraciones del estándar C₁₀-HSL, analizadas por medio del ensayo de detección por difusión, y los respectivos diámetros de los halos de coloración, generados por inducción de la cepa biosensora KYC55, fueron utilizados para la construcción de la curva de calibración: diámetro de halos de coloración (cm) en función de la concentración de C₁₀-HSL (µg/ml).

La concentración de AHLs presente en los sobrenadantes de cultivos líquidos y en biofilm de *B. pertussis* fue estimada aplicando la mencionada ecuación a los halos obtenidos mediante el ensayo de detección (sección IV.3.5.2). De la misma manera, se estimó la concentración de AHLs presente en cultivo líquido de *P. aeruginosa* PAO1. Los resultados detallados en la Tabla 26 indican que la cepa Tohama I como también el aislado clínico Bp 953, producen mayor concentración de AHL al ser cultivadas en biofilm respecto a la

conseguida bajo condiciones de crecimiento planctónico (volúmenes de operación similares). Evidentemente, dicho aislado clínico alcanza niveles de concentración de AHL más elevados que Tohama I, ya sea a partir de cultivos líquidos como en biofilm. Sin embargo, se puede observar que los distintos cultivos de *B. pertussis* alcanzan concentraciones de AHL entre 10 a 20 veces menores en comparación con el cultivo líquido de *P. aeruginosa* PAO1.

Tabla 26. Concentraciones de AHLs presente en cultivos líquidos y en biofilm de *B. pertussis*

Extracto	Diámetro halo de coloración (cm)	Concentración AHL (ng/ml)
Cultivo líquido de la cepa Tohama I	2,8	5,9
Cultivo en biofilm de la cepa Tohama I	5,2	10,8
Cultivo líquido del aislado clínico Bp 953	4,7	9,6
Cultivo en biofilm del aislado clínico Bp 953	6,3	13,2
Cultivo líquido de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	2,5	105,2

Los diámetros de los halos corresponden a los obtenidos mediante la detección por difusión aplicada a extractos de cultivos de la cepa Tohama I, aislado clínico Bp 953 y *P. aeruginosa* PAO1 (sección IV.3.5.2). La ecuación de la recta, determinada por medio de la curva de calibración, fue aplicada a dichos diámetros obteniendo la concentración de AHL en los respectivos cultivos.

IV.3.9- Análisis de inducción de cepas biosensoras por acción de ácidos grasos

Con el objeto de descartar la posibilidad de que otras moléculas producidas por *B. pertussis* y extraíbles por solventes no polares fueran la causa de la inducción de las cepas biosensoras, ácidos grasos de cadena larga fueron examinados mediante el análisis de detección por difusión. Los ácidos tetradecanoico, hexadecanoico y octadecanoico fueron seleccionados para tal fin debido a que presentan un elevado nivel de síntesis y secreción en *B. pertussis*. Se testearon 3 concentraciones distintas para cada uno de los ácidos grasos mencionados. La inducción de las cepas biosensoras fue comprobada a través de la formación de halos de color violeta y de color azul, al utilizar las cepas de *C. violaceum* y *A. tumefaciens* respectivamente. Estándares de AHLs (10 mM) fueron empleados como controles positivos de dicha inducción. Los resultados obtenidos mostraron que en nuestras condiciones de ensayo estos ácidos grasos no generan la inducción de las cepas biosensoras de *C. violaceum* y *A. tumefaciens* (datos no mostrados).

IV.3.10- Identificación de acil-homoserín lactonas

IV.3.10.1- Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier

Extractos de cultivos en biofilm de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953 fueron analizados mediante espectroscopía FT-IR con el fin de elucidar el tipo de AHL sintetizada por *B. pertussis*. Asimismo, extractos de cultivos líquidos de cepas productoras de AHLs fueron analizados mediante esta metodología. A partir de los espectros IR adquiridos en el intervalo 4000 a 650 cm^{-1} , se calcularon las derivadas segundas con el fin de aumentar la resolución de los picos de absorción. Dichas derivadas fueron utilizadas para la detección de picos correspondientes a grupos funcionales característicos de las AHLs, ubicados en rangos específicos del espectro IR (Tabla 8, sección IV.2.13.1). En estos rangos no se sitúan otros grupos funcionales pertenecientes a moléculas biológicas solubles en solventes no polares. La Figura 29 muestra el espectro IR de un extracto concentrado correspondiente a un cultivo líquido de *B. cepacia* y la derivada segunda obtenida a partir del mencionado espectro. A su vez, en la Figura 30 se presenta específicamente la región con rango 1820-1620 cm^{-1} de dicha derivada segunda. En esta región se identificó un pico de absorción situado a 1791 cm^{-1} , perteneciente al grupo carbonilo del anillo lactona de las acil-HSLs y de las 3-oxo-alcanoi-HSLs. Asimismo, en dicha zona se detectaron picos a 1644 y 1652 cm^{-1}

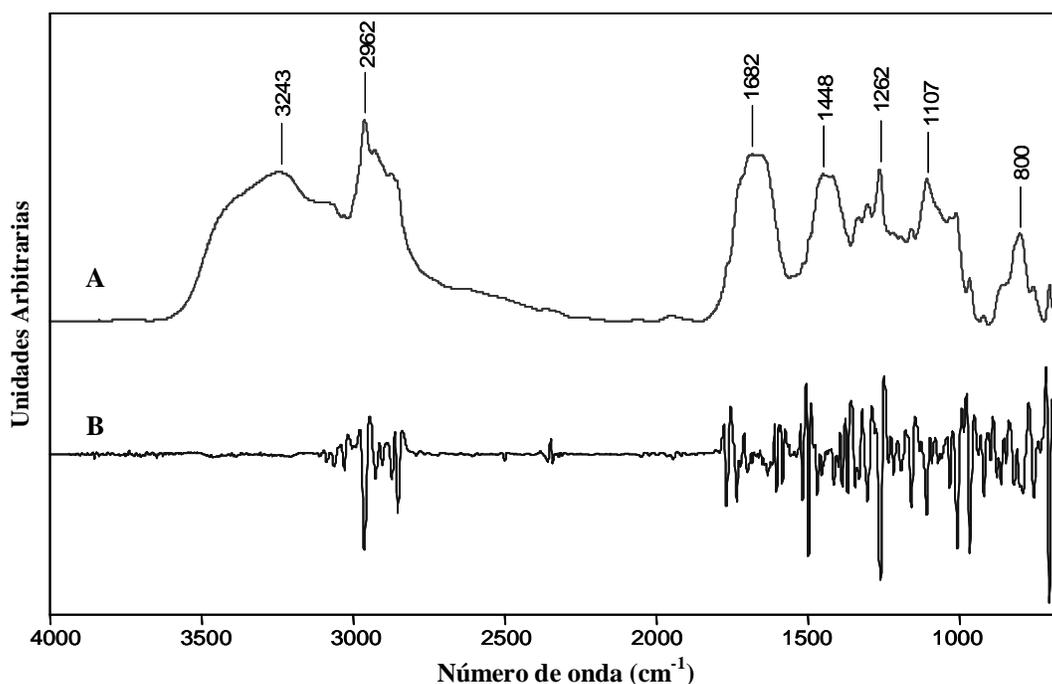


Fig. 29. Espectro IR y derivada segunda correspondientes a un extracto de cultivo de *B. cepacia* ATCC 25416. A partir del espectro IR se obtuvo la derivada segunda para ampliar la resolución de los picos de absorción. A) Espectro IR en el rango 4000-650 cm^{-1} y B) Derivada segunda del espectro IR.

correspondientes al carbonilo del grupo amida de las acil-HSLs y de las 3-oxo-alcanoil-HSLs, respectivamente. Se identificó además, un pico situado a 1723 cm^{-1} perteneciente al grupo cetona ubicado en el carbono 3 de las 3-oxo-alcanoil-HSLs. Extractos de otras cepas productoras de AHLs fueron analizados obteniendo los espectros IR y sus respectivas derivadas segundas, a partir de las cuales se identificaron los grupos funcionales característicos de los distintos tipos de AHLs (ver Tabla 27).

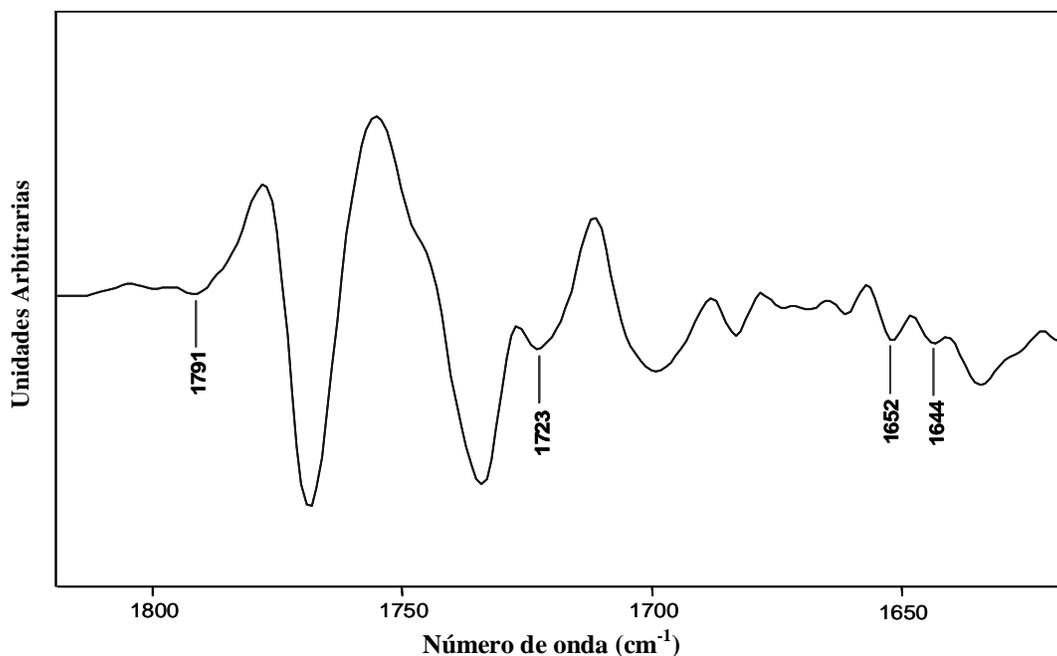


Fig. 30. Región $1820\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ de la derivada segunda del espectro IR de *B. cepacia*. En la región $1820\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ de la derivada segunda de *B. cepacia* se detectaron picos a 1791 , 1652 y 1644 cm^{-1} , los cuales son característicos de la estructura de acil-HSLs y de 3-oxo-alcanoil-HSLs. El pico a 1723 cm^{-1} corresponde al grupo cetona del carbono 3 de las 3-oxo-alcanoil-HSLs.

En la Figura 31 se puede observar el espectro IR adquirido a partir de un extracto concentrado de un cultivo en biofilm de *B. pertussis* Tohama I, junto con su correspondiente derivada segunda. A su vez, la Figura 32 muestra específicamente la región $1820\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ de dicha derivada donde se detectó un pico de absorción a 1791 cm^{-1} , el cual como se mencionó anteriormente, corresponde al carbonilo del anillo lactona de acil-HSLs y 3-oxo-alcanoil-HSLs. Asimismo, se identificó un pico a 1711 cm^{-1} correspondiente al grupo cetona del carbono 3 de las 3-oxo-alcanoil-HSLs y un pico a 1650 cm^{-1} perteneciente al grupo amida de dicho tipo de AHL. El análisis de extractos de cultivos en biofilm del aislado Bp 953 permitió identificar los mismos picos de absorción detectados con los extractos de la cepa Tohama I. En la Tabla 27 se describen los picos de absorción y sus respectivos grupos

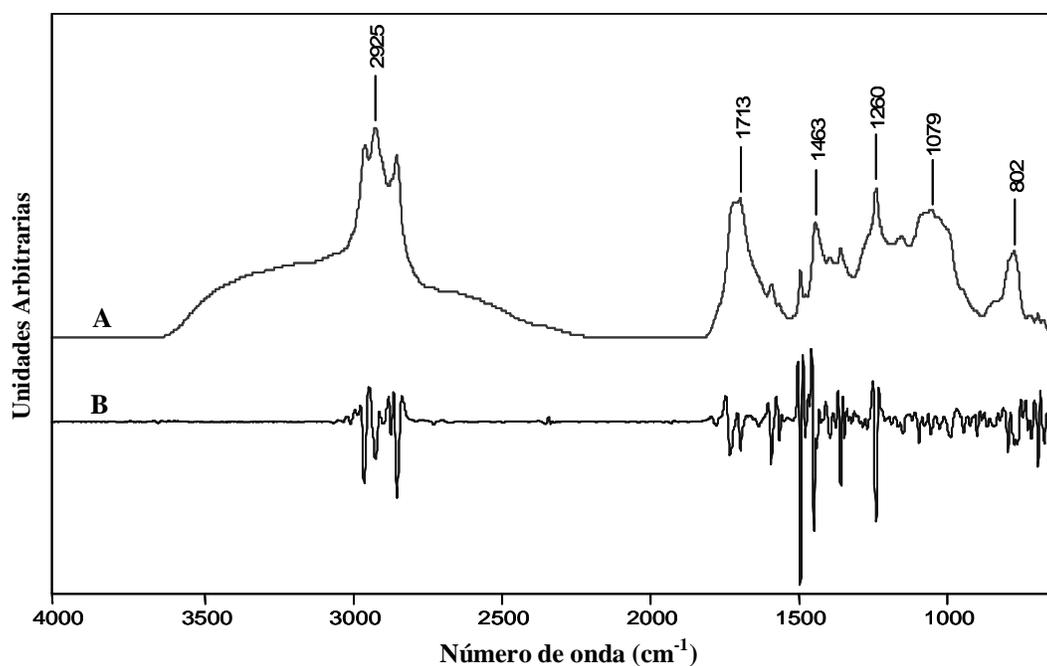


Fig. 31. Espectro IR y derivada segunda correspondiente a un extracto de *B. pertussis* Tohama I. La derivada segunda se obtuvo a partir del espectro IR perteneciente a un extracto en biofilm de la cepa Tohama I. (A) Espectro IR en el rango 4000-650 cm^{-1} y (B) Derivada segunda del espectro IR.

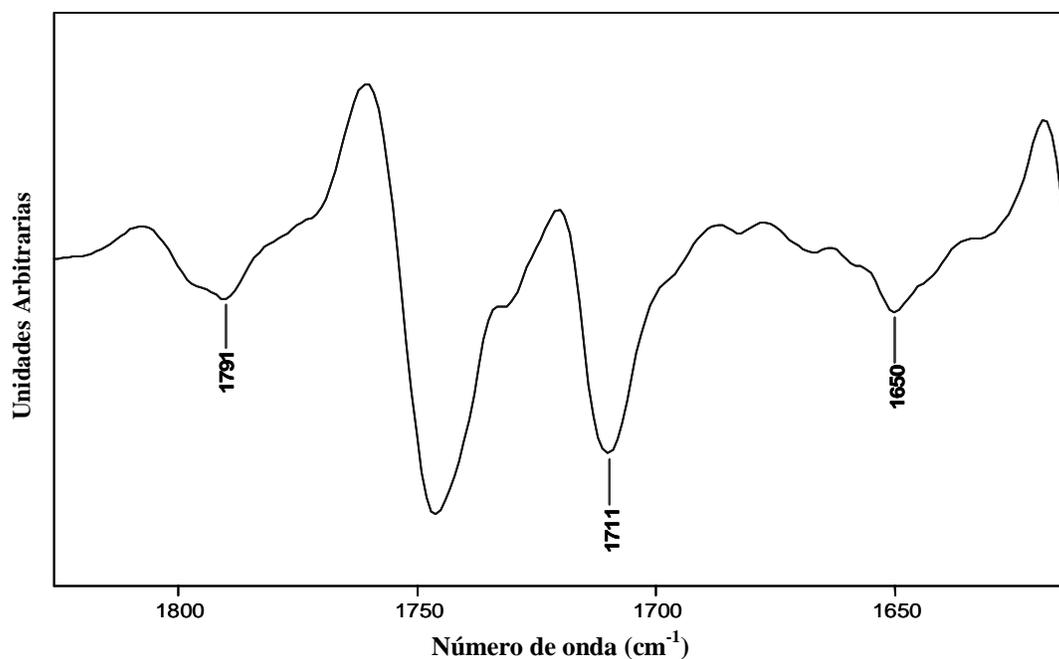


Fig. 32. Región 1820-1620 cm^{-1} de la derivada segunda correspondiente al espectro IR de *B. pertussis* Tohama I. En esta imagen se muestra la región 1820-1620 cm^{-1} de la derivada segunda correspondiente al espectro IR adquirido a partir del extracto de un cultivo en biofilm de *B. pertussis* Tohama I. En dicha región se identificó un pico a 1791 cm^{-1} correspondiente al anillo lactona de distintas AHLs, como así también los picos a 1711 cm^{-1} y 1650 cm^{-1} característicos de la estructura de las moléculas 3-oxo-HSLs.

funcionales identificados en los extractos de *B. pertussis* y de las cepas productoras de AHLs analizadas. Cabe mencionar que, por medio del análisis de un extracto obtenido a partir del medio de cultivo SS no se identificaron picos asociados a los grupos funcionales característicos de AHLs (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos a partir del análisis de los extractos correspondientes a la cepa Tohama I y al aislado clínico Bp 953 mediante espectroscopía FT-IR sugieren que las moléculas acil-homoserín lactonas sintetizadas por *B. pertussis* serían del tipo 3-oxo-alcanoil HSLs.

Tabla 27. Picos de absorción y sus correspondientes grupos funcionales identificados en extractos de *B. pertussis* y de cepas productoras de AHLs mediante espectroscopía FT-IR

Cepa bacteriana	Picos de absorción identificados (cm ⁻¹)	Grupo funcional asociado	Tipos de moléculas acil-homoserín lactonas
Tohama I y Bp 953 de <i>B. pertussis</i>	1791	C=O (Anillo lactona)	3-oxo-alcanoil HSLs
	1711	C=O (Cetona)	
	1650	C=O (Amida de AHLs)	
<i>B. cepacia</i> ATCC 25416	1791	C=O (Anillo lactona)	3-oxo-alcanoil HSLs acil-HSLs y
	1723	C=O (Cetona)	
	1652	C=O (Amida de AHLs)	
	1644	C=O (Amida de 3-oxo-AHLs)	
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	1783	C=O (Anillo lactona)	3-oxo-alcanoil HSLs acil-HSLs y
	1715	C=O (Cetona)	
	1651	C=O (Amida de AHLs)	
	1643	C=O (Amida de 3-oxo-AHLs)	
<i>S. marcescens</i> AS-1	1784	C=O (Anillo lactona)	3-oxo-alcanoil HSLs acil-HSLs y
	1716	C=O (Cetona)	
	1650	C=O (Amida de AHLs)	
	1644	C=O (Amida de 3-oxo-AHLs)	
<i>A. tumefaciens</i> NTL4	1787	C=O (Anillo lactona)	3-oxo-alcanoil HSLs acil HSLs y
	1717	C=O (Cetona)	
	1651	C=O (Amida de AHLs)	
	1643	C=O (Amida de 3-oxo-AHLs)	
<i>A. tumefaciens</i> R10	1781	C=O (Anillo lactona)	3-oxo-alcanoil HSLs acil-HSLs y
	1711	C=O (Cetona)	
	1654	C=O (Amida de AHLs)	
	1642	C=O (Amida de 3-oxo-AHLs)	
<i>S. meliloti</i> Rm8530	1782	C=O (Anillo lactona)	3-oxo-alcanoil HSLs acil-HSLs y
	1714	C=O (Cetona)	
	1651	C=O (Amida de AHLs)	
	1645	C=O (Amida de 3-oxo-AHLs)	

Los espectros IR adquiridos a partir de los extractos permitieron la identificación de picos de absorción correspondientes a distintos grupos carbonilos característicos de los diferentes tipos de moléculas AHLs.

IV.3.10.2- Cromatografía gaseosa-espectroscopía de masas

La identificación de AHLs presentes en extractos de *B. pertussis* se realizó mediante cromatografía gaseosa con ionización electrónica-espectroscopía de masas (GC/EI-MS), según se describió en la sección IV.2.13.2. En una primera etapa, se analizaron los estándares sintéticos de AHLs aplicando el modo de monitoreo de iones totales o *Full-Scan*, en el rango 15-800 m/z , con el fin de determinar sus tiempos de retención y obtener sus respectivos espectros de masas. A partir de dichos espectros se identificaron los iones característicos de los estándares examinados. La Figura 33 muestra el cromatograma de iones totales (TIC: *Total Ion Chromatogram*) adquirido a partir del estándar C₆-HSL, a través del cual se determinó que dicha molécula presenta un tiempo de retención de 7,7 min.

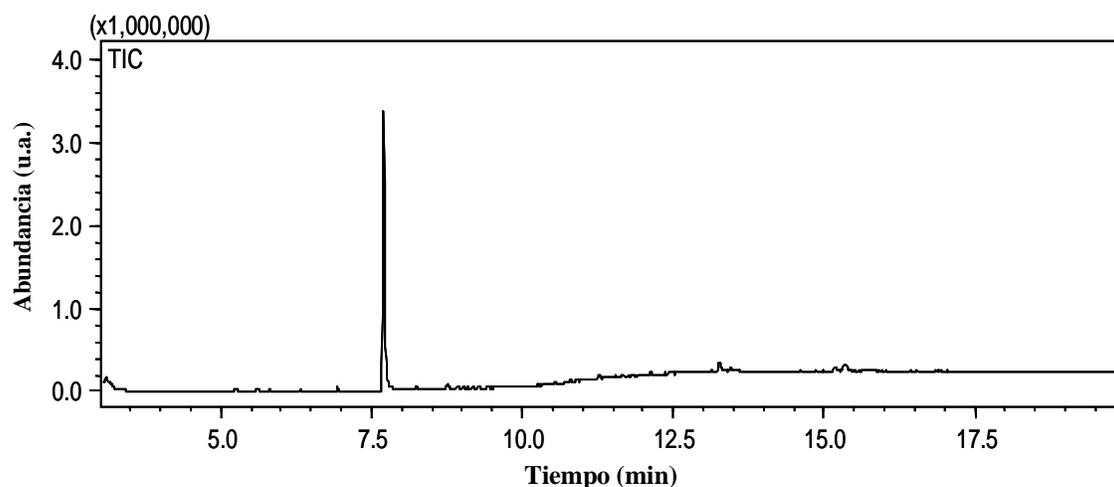


Fig. 33. Cromatograma GC-MS en modo *Full Scan* del estándar hexanoil-homoserín lactona. El análisis cromatográfico del estándar sintético C₆-HSL mediante el modo de monitoreo *Full Scan* permitió determinar que el tiempo de retención de dicha molécula es de 7,7 minutos.

En la Figura 34 se observa el espectro de masas correspondiente al estándar C₆-HSL, el cual presentó el patrón de fragmentación iónica común a las acil-homoserín lactonas no sustituidas (*N*-acil-HSLs), según fue descrito por Cataldi y *col* (118). Asimismo, en este espectro se identificó un ión de 199 m/z correspondiente al ión molecular de dicho estándar. El resto de los estándares de AHLs no sustituidas fueron analizados bajo las mismas condiciones operativas, obteniendo sus respectivos cromatogramas y espectros de masas (datos no mostrados). Estos espectros exhibieron, al igual que el correspondiente a la molécula C₆-HSL, el patrón de fragmentación común a las *N*-acil-HSLs. Dicho patrón está constituido por una serie de iones característicos, como el ión 143 m/z , el cual es el más abundante y los iones 43, 57, 71, 101, 125 y 156 m/z , con menor abundancia relativa (118).

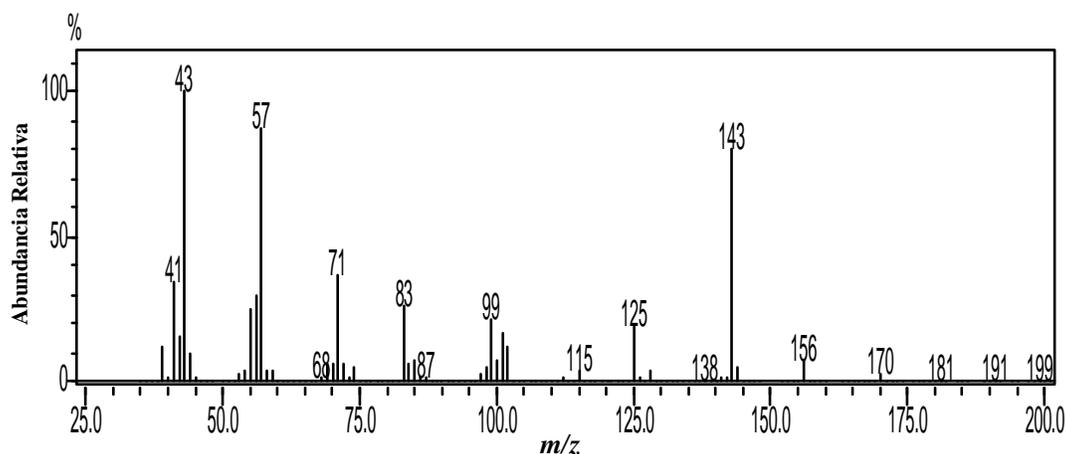


Fig. 34. Espectro de masas del estándar hexanoil-homoserín lactona. A través del espectro de masas del estándar C_6 -HSL se identificaron los iones característicos del patrón de fragmentación común a las AHLs no sustituidas. El ión más abundante de este patrón tiene un valor de 143 m/z y los otros iones, con menor abundancia, presentan valores de 43, 57, 71, 101, 125 y 156 m/z . Asimismo, se identificó el ión molecular (199 m/z) del estándar analizado.

Asimismo, el espectro de masas de cada estándar de acil-HSL analizado presentó su respectivo ión molecular. Cabe agregar que los estándares C_{10} -HSL, C_{12} -HSL, C_{14} -HSL y C_{16} -HSL exhibieron en sus cromatogramas picos cuyos espectros de masas poseen el patrón de fragmentación característico de sus correspondientes ácidos grasos sugiriendo que las AHLs de cadena larga son más susceptibles a una ruptura de la unión amida, respecto a las de cadena corta, provocando así la liberación del respectivo ácido graso.

El estándar 3-oxo- C_{10} -HSL fue analizado bajo las mismas condiciones operativas, logrando su detección a un tiempo de retención de 10,4 min (Fig. 35). Sin embargo, el pico de esta

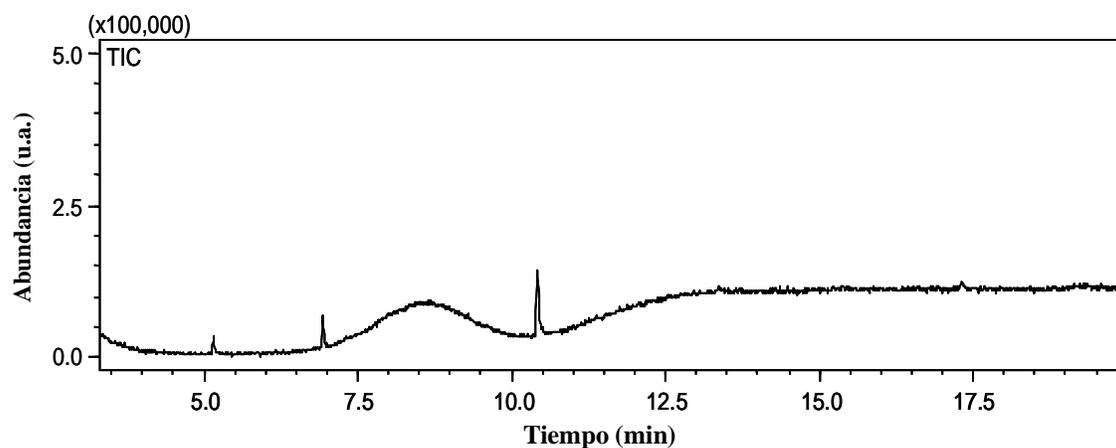


Fig. 35. Cromatograma GC-MS en modo Full Scan del estándar 3-oxo-decanoil-homoserín lactona. El análisis del estándar sintético 3-oxo- C_{10} -HSL mediante el modo Full Scan permitió determinar que el tiempo de retención de dicha molécula es de 10,4 minutos.

molécula presentó escasa intensidad en comparación con la exhibida por los picos de las AHLs no sustituidas. La reducida abundancia de este estándar se debe a la degradación térmica que experimentan las 3-oxo-alcanoi-HSLs durante la cromatografía gaseosa, debido a su elevada sensibilidad a las altas temperaturas (123-124). El espectro de masas de esta molécula exhibió un patrón de fragmentación diferente al perteneciente a las acil-AHLs, presentando el pico de 143 m/z con una reducida abundancia relativa. Cabe agregar que no se detectaron los otros iones característicos de este tipo de AHLs (43, 57, 71, 101, 102 y 185 m/z), como así tampoco su correspondiente ión molecular (269 m/z) (Fig. 36).

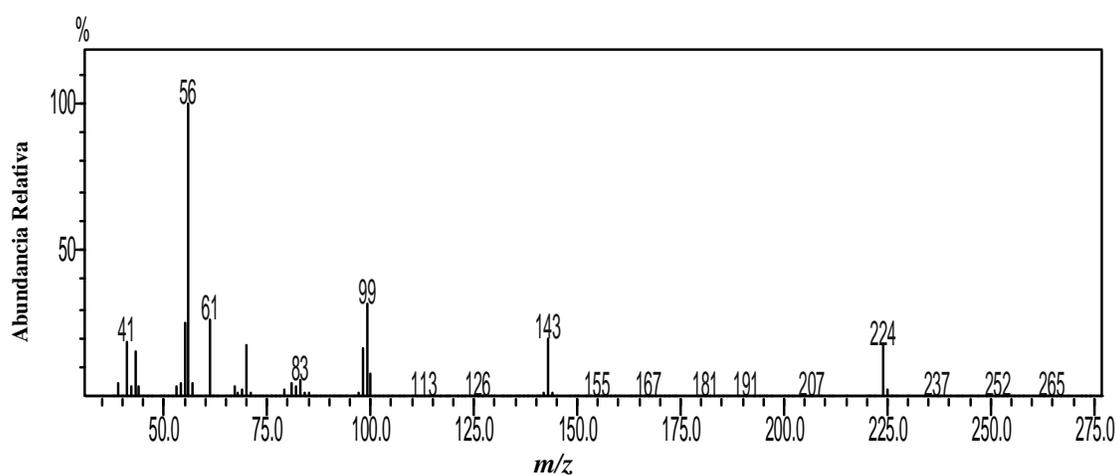


Fig. 36. Espectro de masas del estándar 3-oxo-decanoil-homoserín lactona. El espectro de masas del estándar 3-oxo- C_{10} -HSL presenta el ión característico de 143 m/z . En este espectro no se detectaron otros iones característicos de este tipo de AHL (43, 57, 71, 101, 102 y 185 m/z), como así tampoco su respectivo ión molecular (269 m/z).

El estándar 3-oxo- C_8 -HSL no fue detectado mediante esta metodología debido a la sensibilidad que presenta este tipo de AHLs a las elevadas temperaturas. Con el objeto de evitar la degradación térmica de las 3-oxo-alcanoi-HSLs, se realizó el análisis aumentando el flujo del gas carrier y así acortar el tiempo de permanencia en la columna. Para tal fin se testearon valores de flujo de 1,5 y 2,0 ml/min, manteniendo los valores de los restantes parámetros. Asimismo, el análisis fue llevado a cabo disminuyendo la temperatura del inyector de 200 a 170°C con el fin de evitar la degradación de los mencionados estándares. A pesar de los cambios efectuados, no se registró un aumento de la abundancia del pico de 3-oxo- C_{10} -HSL como tampoco se logró la detección de 3-oxo- C_8 -HSL (datos no mostrados).

La Tabla 28 detalla los tiempos de retención de los estándares de AHLs analizados y sus respectivos iones moleculares identificados a través de los espectros de masas. Los datos de

esta Tabla fueron utilizados para la identificación de AHLs en los extractos correspondientes a los distintos sobrenadantes de cultivo.

Tabla 28. Tiempos de retención de los estándares de AHLs analizados por GC/MS-EI

Acil-Homoserín Lactona	Ión Molecular [M] ⁺	Tiempo de Retención (min)
C ₆ -HSL	199	7,70
C ₇ -HSL	213	8,60
C ₈ -HSL	227	9,45
C ₉ -HSL	241	10,24
C ₁₀ -HSL	255	10,98
C ₁₂ -HSL	283	12,43
C ₁₄ -HSL	311	14,22
C ₁₆ -HSL	339	16,76
3-oxo-C ₁₀ -HSL	269	10,40

El ión molecular [M]⁺ y el tiempo de retención correspondientes a los estándares de AHLs fueron determinados a partir del espectro de masas y cromatograma en modo de *Full Scan* respectivamente.

Con el fin de corroborar la capacidad de GC/MS-EI en identificar moléculas AHLs, se analizaron extractos obtenidos de cultivos líquidos de las cepas productoras de AHLs. Primeramente, los extractos fueron examinados mediante el modo de monitoreo con ión selectivo (modo *SIM*) a 143 *m/z*, por ser este el fragmento iónico de las AHLs generado con mayor abundancia. Luego, los extractos fueron analizados por medio del modo *Full-Scan* en el rango 15-800 *m/z*, con el fin de obtener el espectro de masas correspondiente a los picos presentes en el cromatograma conseguido con el modo *SIM*.

La Figura 37 muestra el cromatograma obtenido en modo *SIM* a partir de un extracto de cultivo de la cepa *P. aeruginosa* PAO1, la cual sintetiza las moléculas C₄-HSL y 3-oxo-C₁₂-HSL (*III*). En este cromatograma se observó un pico de gran abundancia y con un tiempo de retención de 5,65 minutos, como así también otros picos con menor abundancia. El extracto de *P. aeruginosa* PAO1 fue analizado asimismo, mediante el modo *Full-Scan* obteniendo el cromatograma de iones totales con gran cantidad de picos de elevada intensidad (Fig. 38). Estos picos corresponden a los diferentes compuestos secretados por la mencionada cepa y extraíbles con el solvente DCM. A partir de este cromatograma se obtuvieron los espectros de masas de los picos identificados a través del modo *SIM* a 143 *m/z*. El pico con un tiempo de retención de 5,65 min exhibió un espectro de masas con los

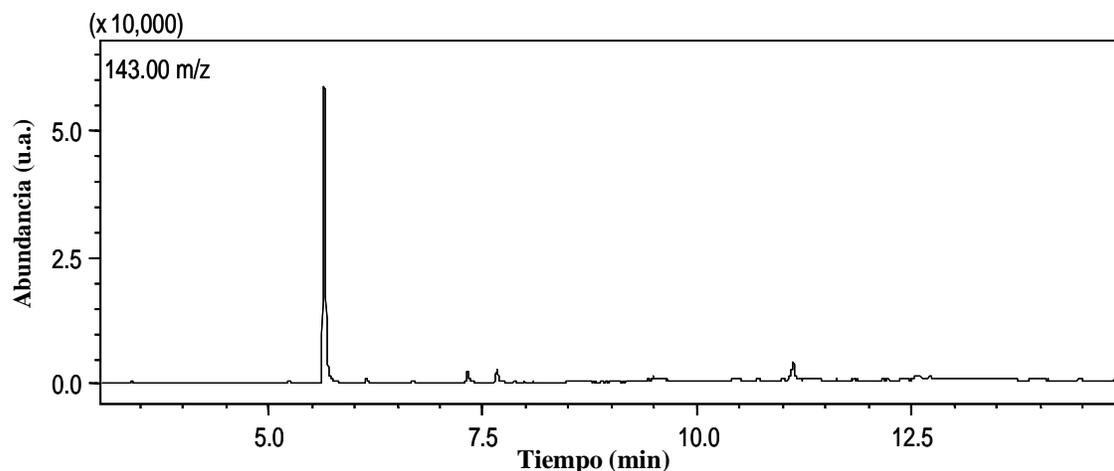


Fig. 37. Cromatograma GC-MS en modo SIM del extracto de la cepa *P. aeruginosa* PAO1. El análisis del extracto de cultivo de *P. aeruginosa* PAO1 mediante el modo de monitoreo SIM a 143 m/z permitió identificar un pico de gran intensidad y con un tiempo de retención de 5,65 minutos.

iones característicos del patrón de fragmentación común a las acil-HSLs, como así también un ión a 171 m/z (Fig. 39). Este resultado indica que dicho espectro corresponde a la molécula C₄-HSL, la cual posee el mencionado tiempo de retención y un peso molecular de 171. Los espectros de masas del resto de los picos cromatográficos no pertenecen a AHLs por no presentar los iones característicos de dichos compuestos. Estos resultados indican que mediante GC/MS-EI y bajo estas condiciones operativas no sería posible detectar la molécula 3-oxo-C₁₂-HSL en el extracto de *P. aeruginosa* PAO1 debido probablemente a la mencionada termosensibilidad que caracteriza a las 3-oxo-alcanoil-HSLs.

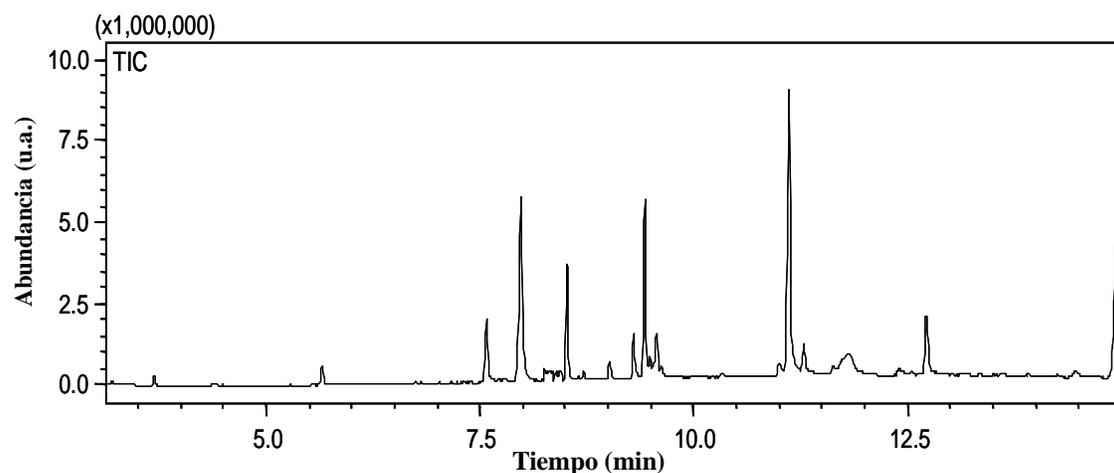


Fig. 38. Cromatograma GC-MS en modo Full Scan del extracto de *P. aeruginosa* PAO1. Con el análisis del extracto de *P. aeruginosa* PAO1 mediante el modo de monitoreo Full Scan se identificaron gran cantidad de picos de alta intensidad. A través de este cromatograma se obtuvieron los espectros de masas de los picos detectados con el modo SIM.

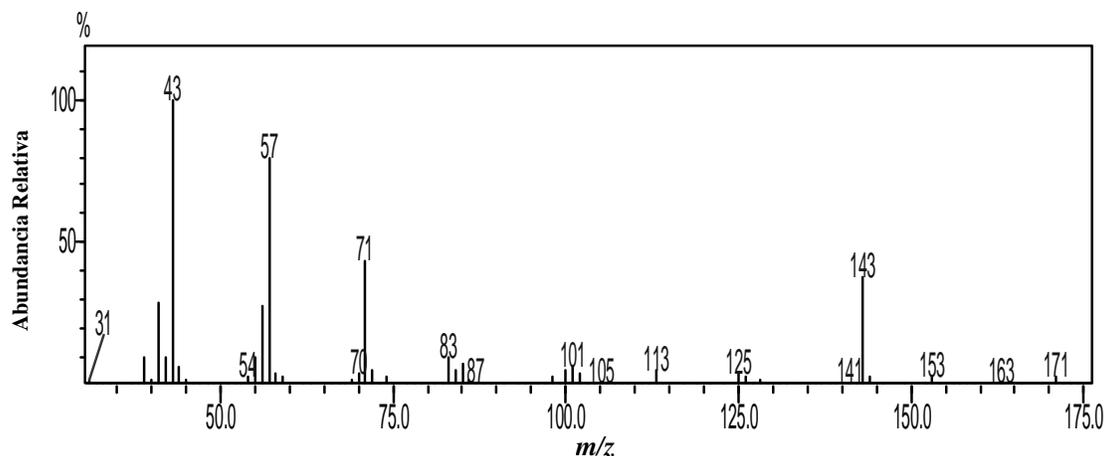


Fig. 39. Espectro de masas GC-MS del pico cromatográfico con tiempo de retención de 5,65 min. Se observan los iones característicos del patrón de fragmentación común a las acil-AHLs, como así también un ión a 171 m/z indicando que el espectro correspondería a la molécula *N*-butanoil-homoserín lactona (C_4 -HSL).

En la Figura 40 se presenta el cromatograma obtenido mediante el modo *SIM* a partir de un extracto de la cepa *S. marcescens* AS-1, la cual sintetiza las moléculas C_6 -HSL y 3-oxo- C_6 -HSL (97). En este cromatograma se identificó un pico de gran abundancia y con un tiempo de retención de 7,68 minutos, como así también otros picos con escasa intensidad. El análisis de este extracto mediante el modo *Full-Scan* permitió obtener un cromatograma con numerosos picos de gran intensidad (Fig. 41), a través del cual se consiguieron los espectros de masas. El pico con tiempo de retención de 7,68 min exhibió un espectro de masas con los iones característicos del patrón de fragmentación común a las acil-HSLs como así también

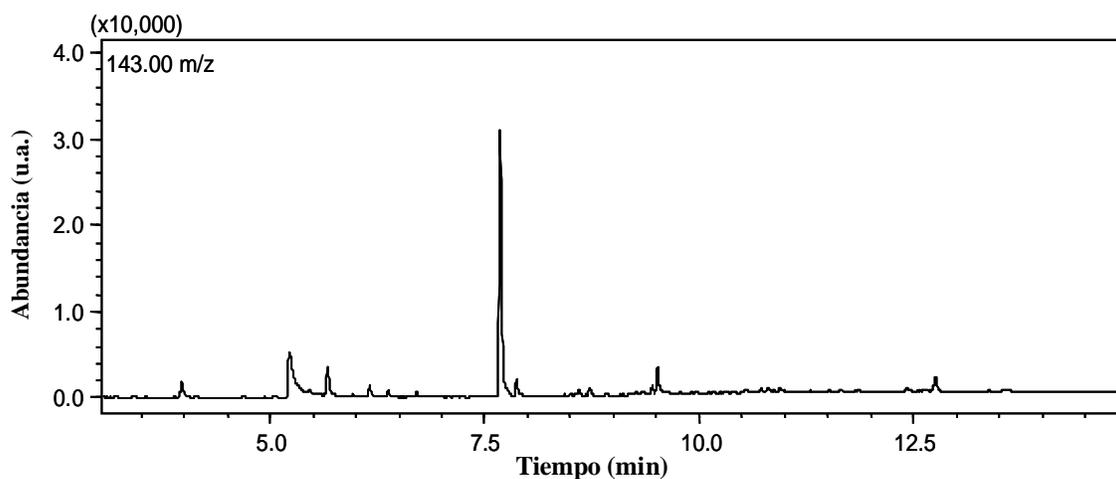


Fig. 40. Cromatograma GC-MS en modo *SIM* del extracto de la cepa *S. marcescens* AS-1. El análisis del extracto de *S. marcescens* AS-1 mediante el modo *SIM* a 143 m/z permitió identificar un pico de gran abundancia con tiempo de retención de 7,68 minutos.

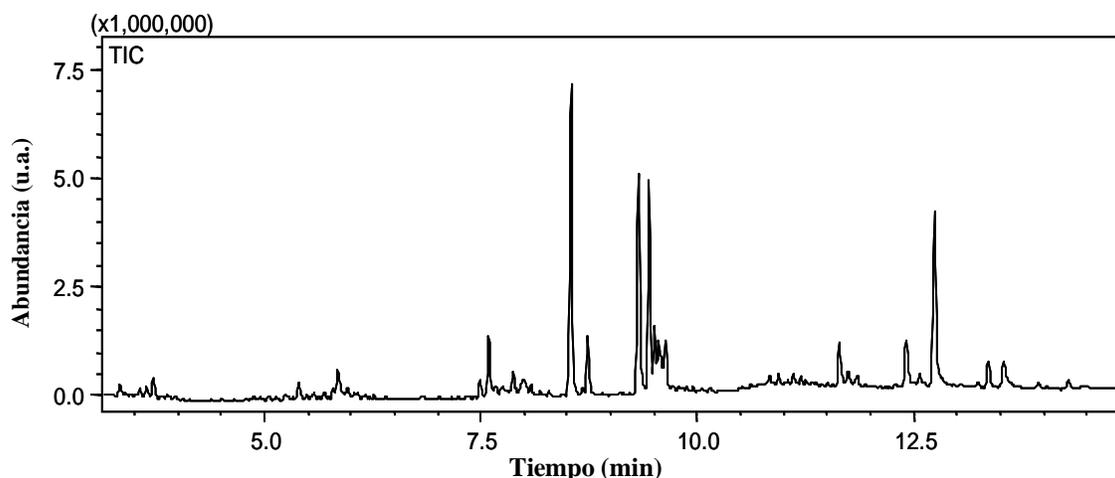


Fig. 41. Cromatograma GC-MS en modo Full Scan del extracto de *S. marcescens* AS-1. Con el análisis del extracto de *S. marcescens* AS-1 mediante el modo Full Scan se detectaron picos con elevada intensidad. A través de este cromatograma se obtuvieron los espectros de masas de los picos identificados con el modo SIM a 143 m/z .

un ión a 199 m/z (Fig. 42), indicando que el espectro correspondería a C_6 -HSL la cual posee dicho tiempo de retención y un peso molecular de 199. Los espectros de masas del resto de los picos cromatográficos no corresponden a AHLs por no exhibir los iones característicos de dichas moléculas. Estos resultados indican que mediante GC/MS-EI y bajo estas condiciones operativas, no es factible detectar 3-oxo- C_6 -HSL en el extracto de *S. marcescens* AS-1 debido posiblemente a la termosensibilidad de este tipo de AHLs.

Mediante el análisis de extractos de *A. tumefaciens* NTL4, cepa productora de C_6 -HSL y 3-oxo- C_8 -HSL, se consiguió detectar la molécula C_6 -HSL pero no 3-oxo- C_8 -HSL, lo

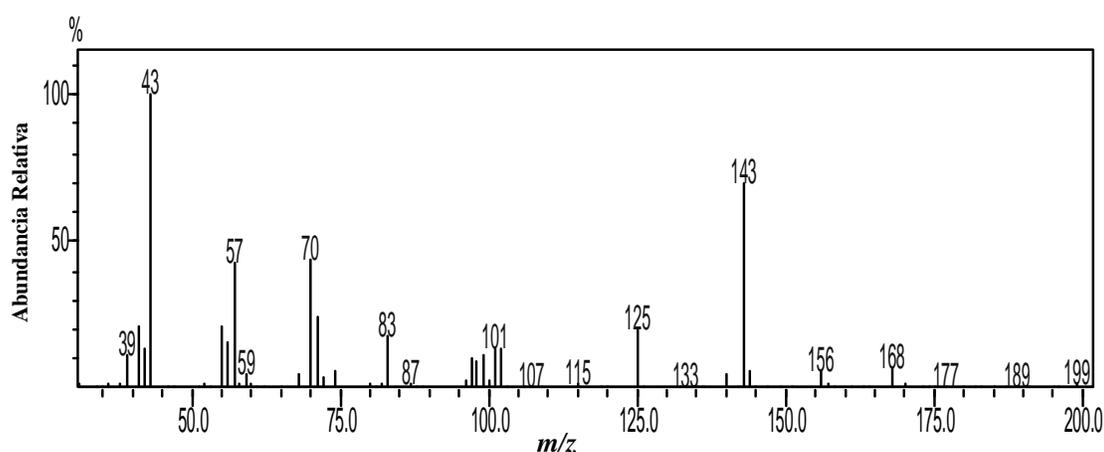


Fig. 42. Espectro de masas del pico cromatográfico con tiempo de retención de 7,68 min. Se observan los iones característicos del patrón de fragmentación común a las acil-AHLs, como así también un ión a 199 m/z indicando que el espectro correspondería a la molécula C_6 -HSL.

cual corrobora la dificultad que presenta la cromatografía gaseosa para la detección de 3-oxo-alcanoil-HSLs. A su vez, el análisis de extractos de cultivos de *B. cepacia* ATCC 25416, *S. meliloti* Rm8530 y *A. tumefaciens* R10, no permitió identificar ningún tipo de AHL. Este resultado pudo ocasionarse por la interferencia de intensas señales, generadas por la excesiva cantidad de compuestos presentes en estos extractos (datos no mostrados).

Seguidamente, extractos obtenidos a partir de cultivos en biofilm de *B. pertussis* fueron analizados con las condiciones operativas aplicadas anteriormente. En la Figura 43 puede observarse el cromatograma adquirido con el modo *SIM* a 143 m/z a partir de un extracto concentrado 5000 veces de la cepa Tohama I. Este análisis permitió detectar un pico de notoria intensidad con un tiempo de retención de 9,62 minutos, como así también otros picos con menor abundancia.

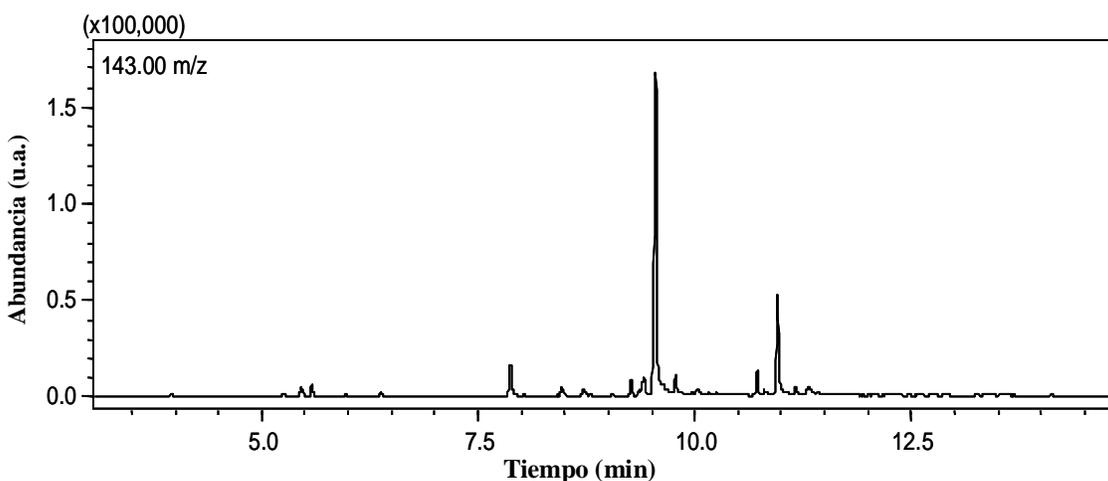


Fig. 43. Cromatograma GC-MS en modo *SIM* de un extracto de *B. pertussis* Tohama I. El análisis cromatográfico de 1 μ l de extracto de cultivo en biofilm de la cepa Tohama I, aplicando el modo *SIM* a 143 m/z, permitió identificar un pico de gran abundancia y con un tiempo de retención de 9,6 min, como así también otros picos cromatográficos con menor intensidad.

El extracto de la cepa Tohama I fue también examinado mediante el modo *Full-Scan* registrando un cromatograma con numerosos picos de gran intensidad (Fig. 44). A través del mismo se obtuvieron y evaluaron los espectros de masas pertenecientes a los picos registrados con el modo de *SIM*. Dichos espectros no correspondieron a moléculas AHLs ya que ninguno presentó el patrón de fragmentación característico de las acil-HSLs o 3-oxo-alcanoil-HSLs. Del mismo modo, un extracto concentrado del aislado clínico Bp 953 fue examinado mediante los modos *SIM* y *Full-Scan* registrando cromatogramas con perfiles de picos similares a los de la cepa Tohama I, pero con el doble de abundancia (datos no

mostrados). Los espectros de masas correspondientes a Bp 953 no pertenecieron a moléculas acil-HSLs como tampoco a 3-oxo-alcanoi-HSLs.

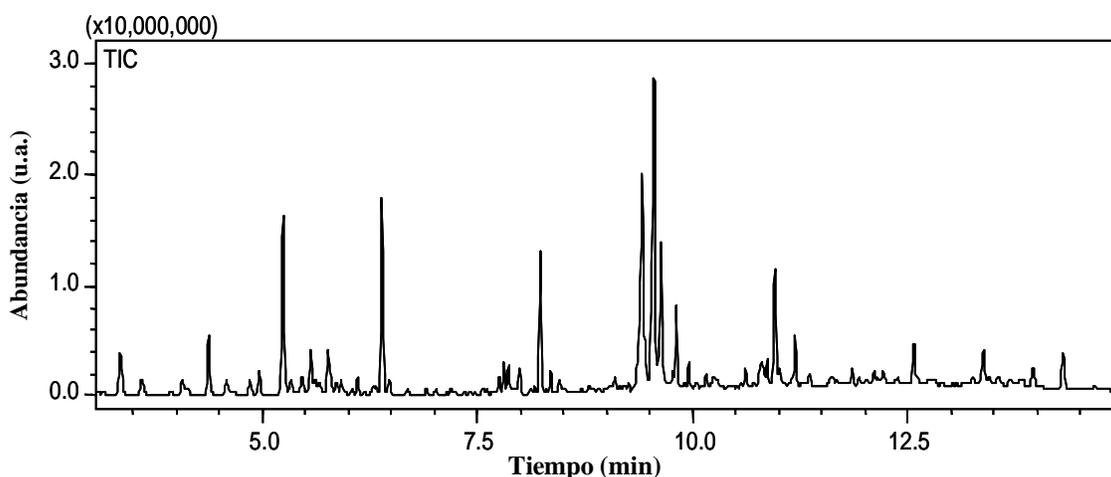


Fig. 44. Cromatograma GC-MS en modo *Full Scan* del extracto de *B. pertussis* Tohama I. El análisis cromatográfico de 1 μ l del extracto de cultivo en biofilm de la cepa Tohama I empleando el modo de *Full Scan*, admitió la detección de gran cantidad de picos con alta intensidad. A partir de este cromatograma se analizaron los espectros de masas de los picos registrados con el modo *SIM*.

Por último, el análisis se aplicó a extractos concentrados 10000 veces de la cepa Tohama I y del aislado Bp 953, empleando un tiempo de registro cromatográfico de 30 minutos. A pesar de estas modificaciones, ninguno de los espectros de masas presentó el patrón característico de los distintos tipos de AHLs (datos no mostrados). Los espectros de masas de los extractos de *B. pertussis* fueron comparados con espectros de la librería de referencias del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de Estados Unidos (NIST, National Institute of Standards and Technology). A través de este análisis se determinó que ciertos picos cromatográficos de los extractos de Tohama I y Bp 953 corresponden a los ácidos dodecanoico, tetradecanoico, pentadecanoico, hexadecanoico y octadecanoico.

En síntesis, el análisis mediante GC/MS-EI no permitió identificar AHLs en los distintos extractos de *B. pertussis*, a pesar de que esta metodología fue capaz de detectar acil-HSL en extractos de algunas cepas productoras de estas moléculas. Posiblemente, este resultado haya sido causado por la abundante cantidad de ciertos compuestos como ácidos grasos, presentes en los extractos de *B. pertussis*, que podrían interferir con la detección de AHLs y por la baja concentración de dichas moléculas señal. Estos resultados sugieren que los extractos de *B. pertussis* podrían contener alguna molécula del tipo 3-oxo-AHL en baja concentración, que al ser sometidas a las elevadas temperaturas de la cromatografía gaseosa son degradadas y por ende no serían detectadas mediante esta metodología.

IV.3.10.3- Identificación de AHLs mediante HPLC MS/MS-MRM

Con el fin de identificar acil-homoserín lactonas sintetizadas por *B. pertussis*, extractos de cultivos en biofilm de *B. pertussis* fueron analizados mediante HPLC MS/MS-MRM (Cromatografía Líquida-Espectroscopía de Masa en Tándem con Monitoreo de Reacción Múltiple). Como se detalló, el proceso de separación se realizó mediante elución por gradiente y la identificación de las AHLs, a través de las transiciones M+H del ión 102 correspondiente al anillo lactona. Estándares de AHLs y extractos de cultivos líquidos pertenecientes a las cepas productoras de AHLs, fueron analizados bajo las mencionadas condiciones, con el objeto de registrar los picos de las transiciones de masa de dichas moléculas y sus respectivos tiempos de retención.

En la Figura 45 se muestran los cromatogramas correspondientes a los estándares C₆-HSL, C₈-HSL, C₉-HSL, C₁₀-HSL, 3-oxo-C₈-HSL y 3-oxo-C₁₀-HSL. Estas moléculas fueron inyectadas con una concentración de 1 ppm y su análisis se realizó seleccionando sus respectivos valores de relación masa/carga (m/z).

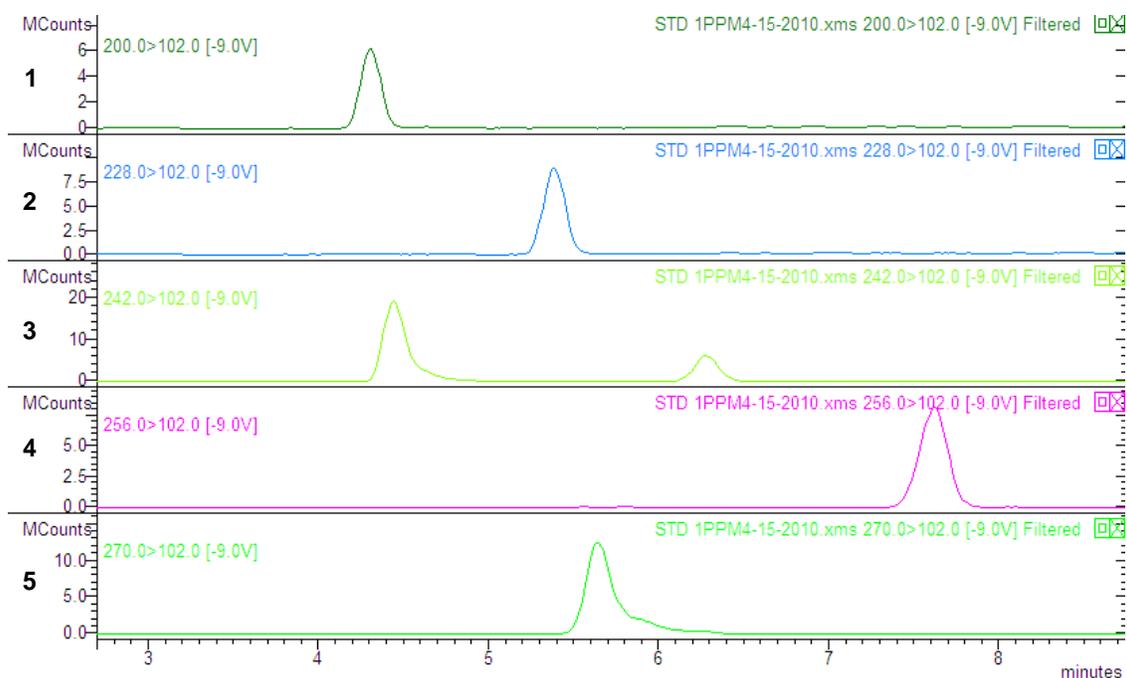


Fig. 45. Cromatogramas HPLC MS/MS-MRM obtenidos a partir de estándares de AHLs. Estándares de AHLs con una concentración de 1 ppm, fueron analizados por medio de HPLC MS/MS-MRM registrando sus respectivos tiempos de retención. El estudio se realizó a través de la selección de los valores de m/z correspondientes a cada estándar. **1:** C₆-HSL (200 m/z); **2:** C₈-HSL (228 m/z); **3:** 3-oxo-C₈-HSL y C₉-HSL (242 m/z); **4:** C₁₀-HSL (256 m/z); **5:** 3-oxo-C₁₀-HSL (270 m/z).

En la Tabla 26 se describen los valores m/z y los tiempos de retención concernientes a los estándares de AHLs examinados mediante HPLC MS/MS-MRM. Los mencionados tiempos de retención fueron utilizados para la identificación de AHLs a partir del análisis de los distintos extractos de cultivos pertenecientes a las cepas productoras de AHLs y a *B. pertussis*.

Tabla 26. Tiempos de retención de estándares de AHLs analizados por HPLC MS/MS-MRM

Estándar de AHL	Relación Masa/Carga (m/z)	Tiempo de Retención (minutos)
C ₆ -HSL	200	4,30
C ₈ -HSL	228	5,35
C ₉ -HSL	242	6,30
C ₁₀ -HSL	256	7,60
3-oxo-C ₈ -HSL	242	4,45
3-oxo-C ₁₀ -HSL	270	5,65

Los estándares de AHLs se inyectaron en una concentración de 1 ppm y su análisis cromatográfico fue realizado mediante la selección de sus respectivos valores de masa/carga (m/z). C₆-HSL: hexanoil-homoserín lactona; C₈-HSL: octanoil-homoserín lactona; C₉-HSL: nonoil-homoserín lactona; C₁₀-HSL: decanoil-homoserín lactona; 3-oxo-C₈-HSL: 3-oxo-octanoil-homoserín lactona; 3-oxo-C₁₀-HSL: 3-oxo-decanoil-homoserín lactona.

La Figura 46 muestra los cromatogramas obtenidos a partir del análisis HPLC MS/MS-MRM aplicado a un extracto de la cepa productora de AHLs *A. tumefaciens* NTL4. Dicho estudio se realizó a través de la selección de los valores m/z correspondientes a distintas moléculas acil-AHLs y 3-oxo-AHLs. Los perfiles de picos cromatográficos y los tiempos de retención obtenidos se compararon con los conseguidos mediante el análisis de los estándares sintéticos de AHLs. De esta manera se determinó que la cepa *A. tumefaciens* NTL4 produce, bajo las condiciones de cultivo aplicadas, las moléculas C₄-HSL, C₆-HSL, C₈-HSL y 3-oxo-C₈-HSL como así también trazas de C₉-HSL y 3-oxo-C₁₀-HSL. Algunas de estas moléculas señal fueron reportadas en *A. tumefaciens* por Zhu y *col* (103-104) y por Zhang y *col* (110).

Del mismo modo, se analizó un extracto de cultivo de la cepa *B. cepacia* ATCC 25416 identificando, por medio de los cromatogramas obtenidos, las moléculas C₄-HSL, C₆-HSL,

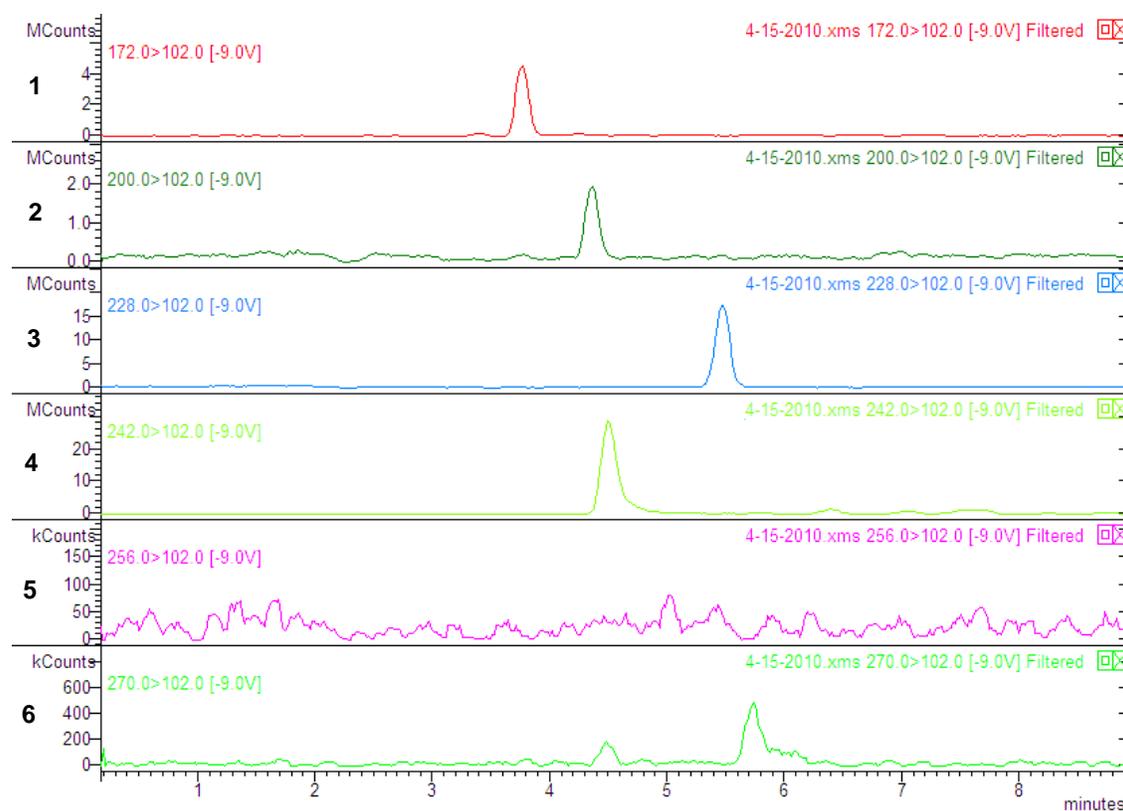


Fig. 46. Cromatogramas HPLC MS/MS-MRM de un extracto de *A. tumefaciens* NTL4. Un extracto concentrado obtenido a partir de un cultivo líquido de la cepa productora de AHLs *A. tumefaciens* NTL4, fue examinado mediante HPLC MS/MS-MRM a través de la selección de determinados valores de m/z concernientes a distintas AHLs. **1:** 172 m/z ; **2:** 200 m/z ; **3:** 228 m/z ; **4:** 242 m/z ; **5:** 256 m/z ; **6:** 270 m/z .

C_8 -HSL, C_9 -HSL y C_{10} -HSL (Fig. 47). Es importante destacar que la molécula C_8 -HSL fue detectada con una abundancia de 140 megacounts en comparación con C_4 -HSL, C_6 -HSL, C_9 -HSL y C_{10} -HSL, que exhibieron una intensidad de 400 Kcounts, 1,5 Mcounts, 1 Mcounts y 5 Mcounts, respectivamente. Asimismo, en este extracto se consiguió detectar trazas de 3-oxo- C_8 -HSL pero no de 3-oxo- C_{10} -HSL. Los resultados obtenidos indican que la cepa *B. cepacia* ATCC 25416 no solo produce C_6 -HSL y C_8 -HSL, tal como describieron Lewenza y col (79) y Gotschlich y col (80), sino que además es capaz de sintetizar otras AHLs en baja concentración.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de los extractos pertenecientes a cepas productoras de AHLs, aplicando HPLC MS/MS-MRM, permitieron corroborar la capacidad que presenta esta metodología para la detección e identificación de distintas AHLs en extractos de cultivos sin purificar, a pesar de que la concentración de dichas moléculas sea escasa.

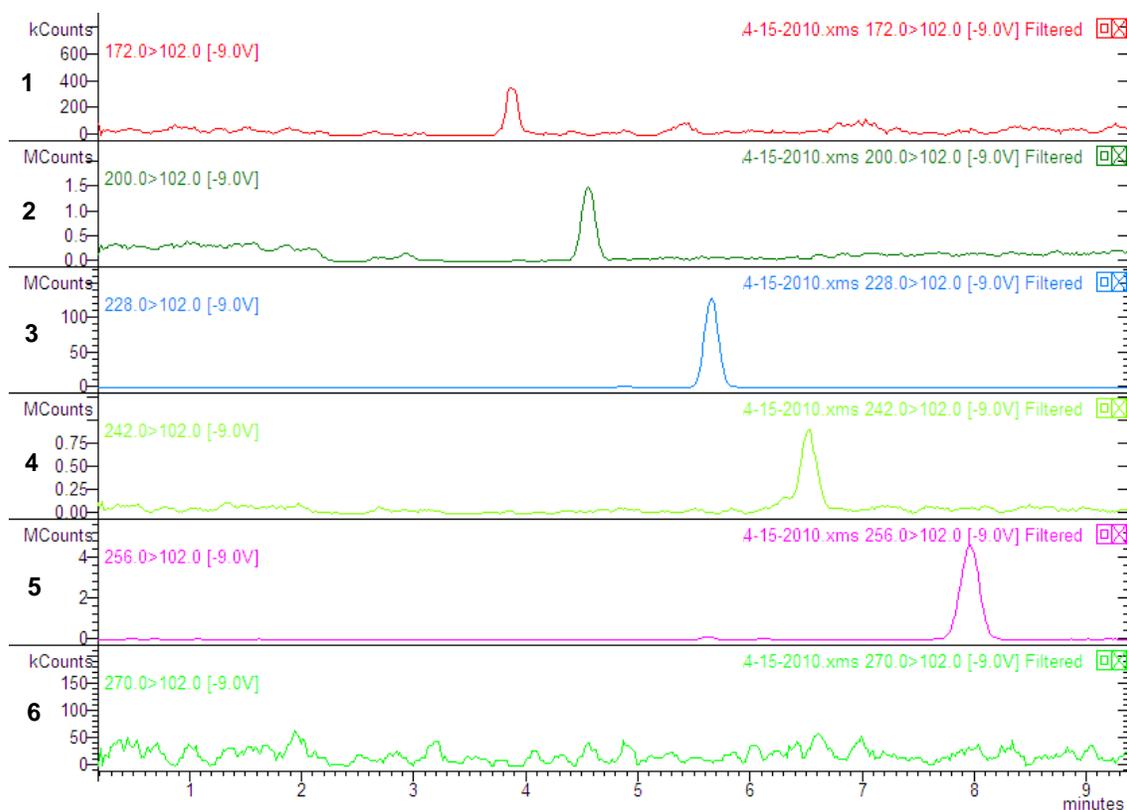


Fig. 47. Cromatogramas HPLC MS/MS-MRM de un extracto de *B. cepacia* ATCC 25416. Un extracto concentrado obtenido de un cultivo líquido de la cepa *B. cepacia* ATCC 25416 fue examinado mediante HPLC MS/MS-MRM, seleccionando determinados valores de m/z correspondientes a distintas AHLs. 1: 172 m/z ; 2: 200 m/z ; 3: 228 m/z ; 4: 242 m/z ; 5: 256 m/z ; 6: 270 m/z .

En la Figura 48 se exponen los cromatogramas obtenidos a partir del estudio de un extracto concentrado de cultivo en biofilm de la cepa *B. pertussis* Tohama I. Este análisis se realizó al igual que los anteriores, seleccionando determinados valores de m/z correspondientes a distintas moléculas AHLs. Los picos cromatográficos y tiempos de retención fueron comparados con los conseguidos a partir de los estándares y extractos de cepas productoras de AHLs. De esta manera se logró detectar la presencia de 2 picos de reducida intensidad y con tiempos de retención de 4,45 y 5,65 minutos, al realizar la selección a 242 m/z y 270 m/z , respectivamente. Estos resultados sugieren que el extracto de cultivo de la cepa Tohama I contiene trazas de las moléculas señal 3-oxo-C₈-HSL (242 m/z) y 3-oxo-C₁₀-HSL (270 m/z).

Con el objeto de confirmar el resultado obtenido con el extracto de la cepa *B. pertussis* Tohama I, se decidió analizar seguidamente el mismo extracto de cultivo, al cual se le agregaron los estándares sintéticos 3-oxo-C₈-HSL y 3-oxo-C₁₀-HSL. La detección de estas

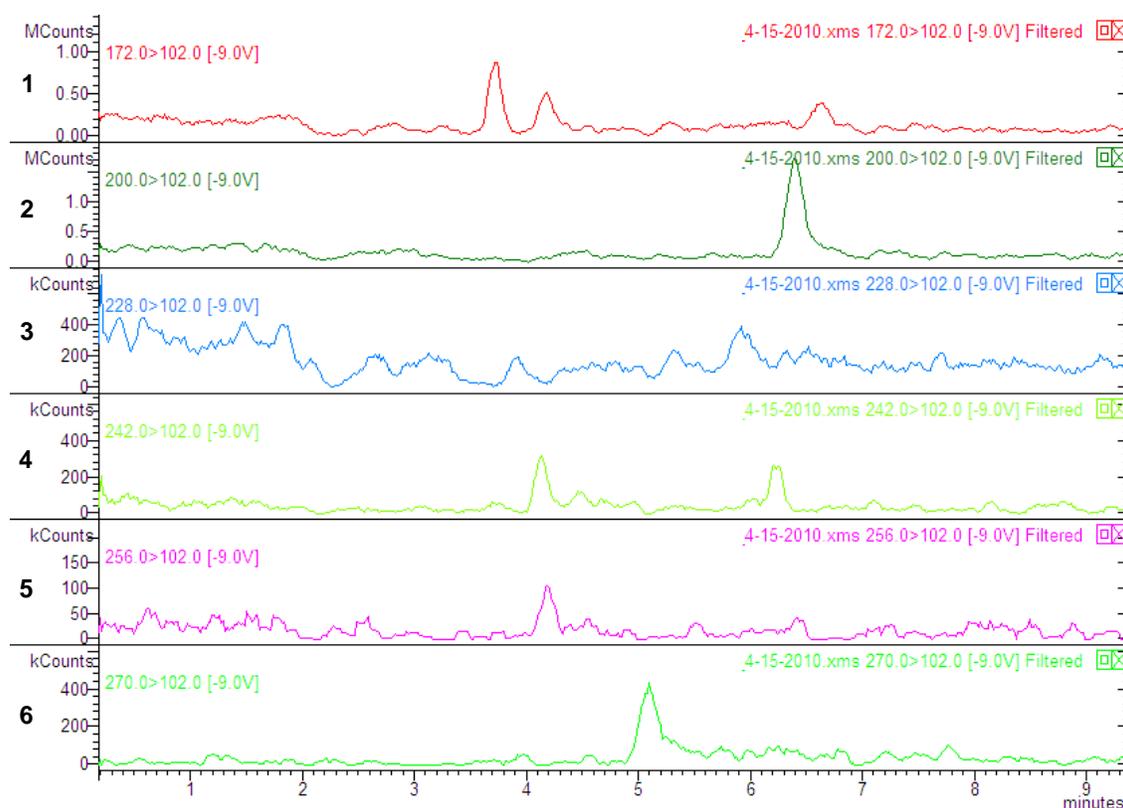


Fig. 48. Cromatogramas HPLC MS/MS-MRM de un extracto de *B. pertussis* Tohama I. Un extracto concentrado obtenido a partir de un cultivo en biofilm de *B. pertussis* Tohama I fue analizado por HPLC MS/MS-MRM, mediante la selección de determinados valores de m/z relativos a distintas AHLs. **1:** 172 m/z ; **2:** 200 m/z ; **3:** 228 m/z ; **4:** 242 m/z ; **5:** 256 m/z ; **6:** 270 m/z .

moléculas se llevó a cabo seleccionando los valores de 242 m/z y 270 m/z . Asimismo, el mencionado extracto fue adicionado con el estándar C₆-HSL con la finalidad de obtener un cromatograma control.

Por medio de los cromatogramas correspondientes al extracto de la cepa Tohama I adicionado con estándares se logró distinguir, en comparación con los cromatogramas del extracto sin adicionar, un aumento en la intensidad de los picos con tiempos de retención de 4,45 y 5,65 minutos al realizar la selección a 242 y 270 m/z , respectivamente (Fig. 49). El análisis de extractos de cultivos en biofilm del aislado clínico Bp 953 permitió obtener los mismos resultados que se consiguieron con los extractos de la cepa Tohama I (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos mediante HPLC MS/MS-MRM sugieren que las moléculas acil-homoserín lactonas presentes en los extractos de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp

953 de *B. pertussis*, y por ende producidas por estas, serían al menos las moléculas 3-oxo-C₈-HSL y 3-oxo-C₁₀-HSL.

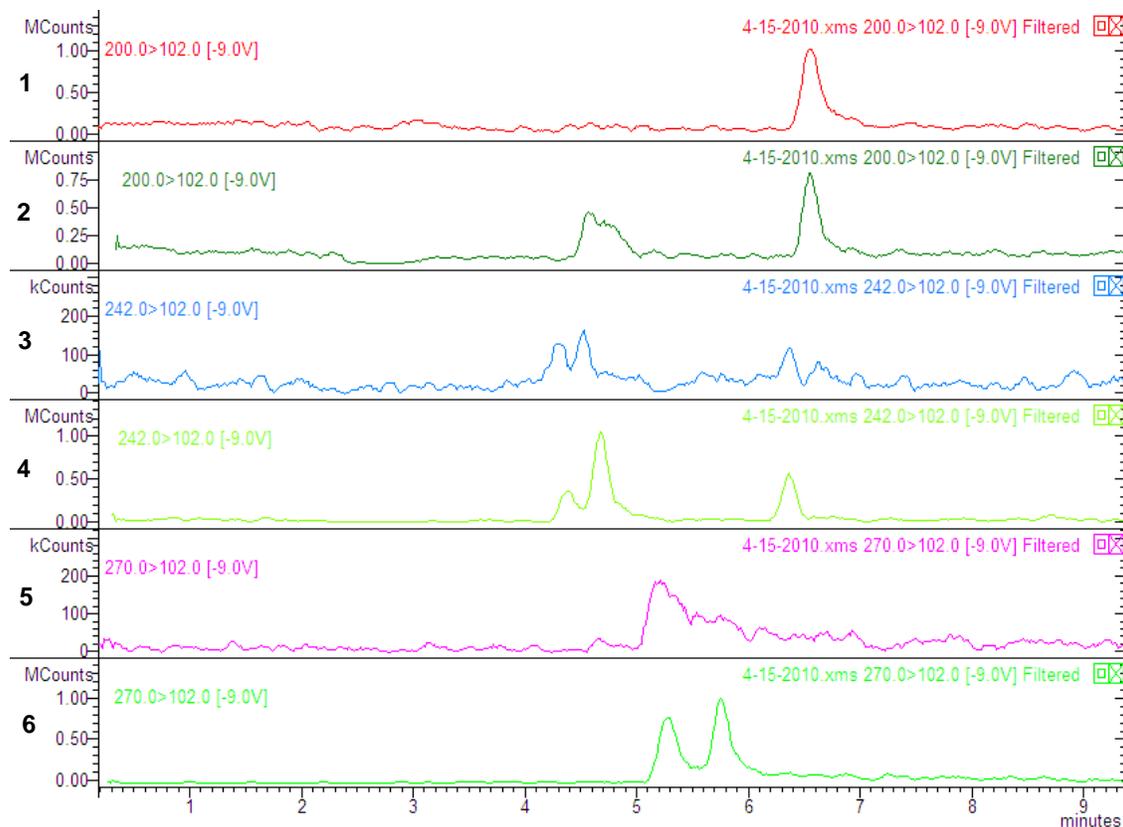


Fig. 49. Cromatogramas HPLC MS/MS-MRM del extracto de Tohama I con el agregado de estándares de AHLs. Un extracto de cultivo en biofilm de *B. pertussis* Tohama I fue adicionado con los estándares C₆-HSL, 3-oxo-C₈-HSL y 3-oxo-C₁₀-HSL para luego ser analizado por HPLC MS/MS-MRM, realizando la selección a 200, 242 y 270 *m/z*. **1:** Extracto (200 *m/z*); **2:** Extracto adicionado (200 *m/z*); **3:** Extracto (242 *m/z*); **4:** Extracto adicionado (242 *m/z*); **5:** Extracto (270 *m/z*); **6:** Extracto adicionado (270 *m/z*).

IV.4- DISCUSIÓN

El trabajo se inició con la búsqueda de homología entre proteínas correspondientes a la cepa Tohama I de *B. pertussis* y distintas sintasas de AHLs pertenecientes a las 3 familias descritas hasta la actualidad en otros organismos (32, 43, 58). A través de estos estudios se consiguió determinar que la proteína BP0036 de dicha cepa de referencia, presenta elevada homología con ciertas sintasas de la familia HdtS. Además mediante el alineamiento de secuencias se comprobaron elevados niveles de identidad y similitud entre BP0036 y sintasas de la mencionada familia. Esta herramienta permitió identificar que dicha proteína de *B. pertussis* contiene los dominios conservados y motivos de aminoácidos característicos de las sintasas homólogas a HdtS, los cuales fueron inicialmente descritos por Laue y col en la enzima HdtS de *P. fluorescens* (58). Estos resultados indican que la proteína BP0036 podría actuar como una aciltransferasa de la familia HdtS con la capacidad de acilar el sustrato SAM y, de esta manera, producir moléculas del tipo AHLs.

Los ensayos de detección e identificación de moléculas de Quórum Sensing a partir de extractos de cultivos de *B. pertussis*, implicó la necesidad de utilizar elevadas concentraciones de biomasa celular de dicha bacteria. Para tal fin, se desarrollaron cultivos líquidos y en biofilm de la cepa de referencia Tohama I y del aislado clínico Bp 953 seleccionado por su alta capacidad de crecimiento en biofilm. A partir de los cultivos en biofilm de dicho aislamiento clínico se obtuvo la mayor cantidad de biomasa de *B. pertussis* para ser empleada en los mencionados ensayos.

Los primeros estudios de detección de AHLs empleando cepas biosensoras se realizaron mediante ensayos en placas de Petri. Estos análisis implicaron la búsqueda de un medio de cultivo apropiado para conseguir el óptimo crecimiento de *B. pertussis*, cepas biosensoras y cepas productoras de AHLs, y que permitiera la inducción de las cepas biosensoras por parte de los cultivos analizados. Tras la examinación de diferentes medios de cultivo sólidos se seleccionó el medio BHA (Agar Cerebro-Corazón) suplementado con 2,5% v v⁻¹ de suero fetal bovino. En los ensayos de detección de AHLs en esta forma de crecimiento, se determinó que la cepa Tohama I y el aislado clínico Bp 953 no logran la inducción de las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 y VIR07 como así tampoco de *A. tumefaciens* KYC55 y WCF47, bajo las condiciones experimentales aplicadas. Esto podría ser el resultado de la escasa producción de moléculas señal durante el crecimiento de *B. pertussis* en medio sólido.

Mediante estudios de detección de AHLs por difusión se determinó que extractos concentrados de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953, obtenidos a partir de cultivos

líquidos y en biofilm, consiguen la inducción de las cepas biosensoras, lo cual sugirió que dichos extractos contienen moléculas de Quórum Sensing detectables tanto por las cepas *A. tumefaciens* KYC55 y WCF47 como también por las cepas *C. violaceum* CV026 y VIR07. Estos resultados indican que *B. pertussis* produciría alguna molécula del tipo AHL pero en baja concentración, por lo cual solo serían detectadas a partir de extractos de cultivos líquidos o en biofilm altamente concentrados y no a través de cultivos sólidos. En coincidencia con estos resultados, Taminiou y col (115) determinaron a partir de extractos concentrados de cultivos líquidos, que *Brucella melitensis* es capaz de producir AHLs; sin embargo su detección no fue posible en cultivos sólidos. Se consiguió demostrar que la producción de las moléculas señal de *B. pertussis* depende de la densidad celular poblacional aumentando en función de las fases de crecimiento, tal como fue determinado para *Yersinia pseudotuberculosis* por Yates y col (112) y para la bacteria halófila *Halomonas anticariensis* por Llamas y col (114).

Los estudios efectuados mediante cromatografía en placa delgada en combinación con la detección de AHLs empleando las cepas biosensoras de *C. violaceum* y de *A. tumefaciens*, mostraron que los extractos pertenecientes a cultivos en biofilm de *B. pertussis* contendrían al menos 2 moléculas diferentes de acil-homoserín lactonas. Los valores R_f de los spots obtenidos mediante dicho análisis sugirieron que estas 2 moléculas tendrían un peso molecular similar a las AHLs producidas por la cepa *B. cepacia* ATCC 25416, las cuales son C₆-HSL (PM: 199) y C₈-HSL (PM: 227) (79, 82). Asimismo, no se puede eliminar la posibilidad de que los extractos de la cepa Tohama I y del aislado clínico Bp 953 contengan más de 2 AHLs distintas, debido a que *B. pertussis* podría sintetizar otras moléculas AHLs con menor abundancia y no ser detectadas por medio de esta metodología.

Bajo condiciones de crecimiento en biofilm la cepa Tohama I así como Bp 953, producen mayor concentración de moléculas AHLs en comparación con el modo planctónico de crecimiento, para un mismo volumen de medio líquido. Asimismo, el aislado clínico logra generar mayores niveles de AHLs respecto a la cepa de referencia, bajo ambas condiciones de crecimiento. Estos resultados nos llevan a corroborar que la actividad inductora que exhiben los extractos de *B. pertussis* es causada por moléculas del tipo AHLs, ya que su concentración en el medio de cultivo se acrecienta cuando se consiguen elevados valores de biomasa como ocurre con el modo de crecimiento en biofilm.

A pesar de que las cepas biosensoras presentan una elevada especificidad para distintas AHLs, se analizó la posibilidad de que otras moléculas producidas por *B. pertussis* fueran la causa de la inducción de dichas cepas en los distintos ensayos de detección realizados. De

esta manera, se buscó descartar la posibilidad de que ácidos grasos de cadena larga sintetizados y secretados por *B. pertussis* fueran la causa de la inducción de las cepas biosensoras. Los resultados obtenidos corroboraron que la actividad inductora detectada estaría generada por moléculas del tipo AHLs y no por otras moléculas apolares presentes en los extractos de *B. pertussis*, como ácidos grasos de cadena larga.

En lo que respecta a los estudios mediante espectroscopía FT-IR, se consiguió identificar picos de absorción correspondientes a grupos funcionales característicos de las moléculas 3-oxo-alcenoil HSLs. Esta detección se basó en estudios realizados por Chhabra y *col* (116), quienes determinaron picos de absorción específicos para los grupos carbonilos pertenecientes al anillo lactona, a la amida y al sustituyente del carbono 3 de AHLs sintéticas. Nuestros resultados sugieren que las moléculas autoinductoras sintetizadas por *B. pertussis* serían del tipo 3-oxo-alcenoil HSLs.

La calibración del estudio de identificación de AHLs mediante GC/MS-EI, utilizando estándares sintéticos de acil-AHLs y 3-oxo-AHLs, permitió establecer sus tiempos de retención y obtener los respectivos espectros de masas con sus patrones de iones característicos. De esta manera pudimos corroborar, tal como describió Cataldi y *col* (118, 123), que las moléculas 3-oxo-AHLs sufren una degradación debida a la sensibilidad que presentan frente a elevadas temperaturas, como son las correspondientes a las condiciones operativas de GC/MS-EI. En consecuencia, la detección de AHLs por medio de esta metodología no resulta totalmente exitosa. Asimismo, mediante el análisis cromatográfico de extractos de cultivos líquidos pertenecientes a cepas productoras de AHLs, se consiguió identificar algunas acil-HSL. Sin embargo, en estos extractos no se logró la detección de las mencionadas AHLs sensibles a la temperatura. El análisis de los distintos extractos de cultivos de *B. pertussis* utilizando GC/MS-EI, no permitió la identificación de AHLs, probablemente por la presencia de una abundante cantidad de ciertos compuestos como ácidos grasos, los cuales causarían interferencias en la detección de AHLs. Los resultados también sugieren que los extractos de *B. pertussis* podrían contener moléculas del tipo 3-oxo-AHL en baja concentración, que al ser sometidas a las elevadas temperaturas de la cromatografía gaseosa son degradadas.

Los estudios realizados mediante HPLC MS/MS-MRM a partir de extractos de *B. pertussis*, posibilitaron la identificación de picos con tiempos de retención coincidentes con los correspondientes a los estándares sintéticos 3-oxo-C₈-HSL y 3-oxo-C₁₀-HSL. Estos resultados confirman los obtenidos anteriormente en referencia a la capacidad que presenta *B. pertussis* para sintetizar moléculas señal del tipo 3-oxo-AHLs.

IV.5- REFERENCIAS

1. Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C., and Camara, M. (2007) Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 362, 1119-1134.
2. Waters, C. M., and Bassler, B. L. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria, *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21, 319-346.
3. Lee, J., Jayaraman, A., and Wood, T. K. (2007) Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA, *BMC Microbiol.* 7, 42.
4. Lee, J., Zhang, X. S., Hegde, M., Bentley, W. E., Jayaraman, A., and Wood, T. K. (2008) Indole cell signaling occurs primarily at low temperatures in *Escherichia coli*, *Isme J.* 2, 1007-1023. Epub 2008 Jun 1005.
5. Camara, M., Williams, P., and Hardman, A. (2002) Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk, *Lancet Infect Dis.* 2, 667-676.
6. Williams, P. (2007) Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world, *Microbiology.* 153, 3923-3938.
7. Atkinson, S., and Williams, P. (2009) Quorum sensing and social networking in the microbial world, *J R Soc Interface.* 6, 959-978. Epub 2009 Aug 2012.
8. Fuqua, W. C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators, *J Bacteriol.* 176, 269-275.
9. Miller, M. B., and Bassler, B. L. (2001) Quorum sensing in bacteria, *Annu Rev Microbiol.* 55, 165-199.
10. Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J., and Salmond, G. P. (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria, *FEMS Microbiol Rev.* 25, 365-404.
11. White, C. E., and Winans, S. C. (2007) Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 362, 1135-1148.
12. Sanchez-Contreras, M., Bauer, W. D., Gao, M., Robinson, J. B., and Allan Downie, J. (2007) Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 362, 1149-1163.
13. Barnard, A. M., Bowden, S. D., Burr, T., Coulthurst, S. J., Monson, R. E., and Salmond, G. P. (2007) Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 362, 1165-1183.
14. Winzer, K., Hardie, K. R., and Williams, P. (2002) Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now - gone to lunch!, *Curr Opin Microbiol.* 5, 216-222.
15. Bassler, B. L. (1999) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing, *Curr Opin Microbiol.* 2, 582-587.
16. Winans, S. C., and Bassler, B. L. (2002) Mob psychology, *J Bacteriol.* 184, 873-883.
17. Nealson, K. H., Platt, T., and Hastings, J. W. (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system, *J Bacteriol.* 104, 313-322.
18. Chhabra, S. R., Philipp, B., Ebel, L., Givkov, M., Williams, P., and camara, M. (2005) Extracellular communication in Bacteria, *Topics in Current Chemistry.* 240, 279-315.
19. Kalogeraki, V. S., and Winans, S. C. (1995) The octopine-type Ti plasmid pTiA6 of *Agrobacterium tumefaciens* contains a gene homologous to the chromosomal virulence gene *acvB*, *J Bacteriol.* 177, 892-897.
20. Fuqua, C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. (1996) Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators, *Annu Rev Microbiol.* 50, 727-751.

21. Swift, S., Throup, J. P., Williams, P., Salmond, G. P., and Stewart, G. S. (1996) Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype, *Trends Biochem Sci.* 21, 214-219.
22. Bainton, N. J., Stead, P., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Salmond, G. P., Stewart, G. S., and Williams, P. (1992) N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*, *Biochem J.* 288, 997-1004.
23. Kaplan, H. B., and Greenberg, E. P. (1985) Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system, *J Bacteriol.* 163, 1210-1214.
24. Pearson, J. P., Van Delden, C., and Iglewski, B. H. (1999) Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals, *J Bacteriol.* 181, 1203-1210.
25. Reading, N. C., and Sperandio, V. (2006) Quorum sensing: the many languages of bacteria, *FEMS Microbiol Lett.* 254, 1-11.
26. Lazazzera, B. A., and Grossman, A. D. (1998) The ins and outs of peptide signaling, *Trends Microbiol.* 6, 288-294.
27. Sturme, M. H., Kleerebezem, M., Nakayama, J., Akkermans, A. D., Vaughn, E. E., and de Vos, W. M. (2002) Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81, 233-243.
28. Novick, R. P., and Jiang, D. (2003) The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with agr quorum sensing, *Microbiology.* 149, 2709-2717.
29. Lazazzera, B. A. (2001) The intracellular function of extracellular signaling peptides, *Peptides.* 22, 1519-1527.
30. Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczar, I., Bassler, B. L., and Hughson, F. M. (2002) Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron, *Nature.* 415, 545-549.
31. Surette, M. G., and Bassler, B. L. (1998) Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 7046-7050.
32. Bassler, B. L., Wright, M., and Silverman, M. R. (1994) Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway, *Mol Microbiol.* 13, 273-286.
33. Schauder, S., Shokat, K., Surette, M. G., and Bassler, B. L. (2001) The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule, *Mol Microbiol.* 41, 463-476.
34. Federle, M. J., and Bassler, B. L. (2003) Interspecies communication in bacteria, *J Clin Invest.* 112, 1291-1299.
35. Kendall, M. M., Rasko, D. A., and Sperandio, V. (2007) Global effects of the cell-to-cell signaling molecules autoinducer-2, autoinducer-3, and epinephrine in a luxS mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Infect Immun.* 75, 4875-4884. Epub 2007 Jul 4816.
36. Sperandio, V., Torres, A. G., Jarvis, B., Nataro, J. P., and Kaper, J. B. (2003) Bacteria-host communication: the language of hormones, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 8951-8956. Epub 2003 Jul 8957.
37. Holden, M. T., Ram Chhabra, S., de Nys, R., Stead, P., Bainton, N. J., Hill, P. J., Manefield, M., Kumar, N., Labatte, M., England, D., Rice, S., Givskov, M., Salmond, G. P., Stewart, G. S., Bycroft, B. W., Kjelleberg, S., and Williams, P. (1999) Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria, *Mol Microbiol.* 33, 1254-1266.

38. Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P., and Iglewski, B. H. (1999) Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 11229-11234.
39. Gamard, P., Sauriol, F., Benhamou, N., Belanger, R. R., and Paulitz, T. C. (1997) Novel butyrolactones with antifungal activity produced by *Pseudomonas aureofaciens* strain 63-28, *J Antibiot (Tokyo).* 50, 742-749.
40. Flavier, A. B., Clough, S. J., Schell, M. A., and Denny, T. P. (1997) Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*, *Mol Microbiol.* 26, 251-259.
41. Barber, C. E., Tang, J. L., Feng, J. X., Pan, M. Q., Wilson, T. J., Slater, H., Dow, J. M., Williams, P., and Daniels, M. J. (1997) A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule, *Mol Microbiol.* 24, 555-566.
42. Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., Jr., and Greenberg, E. P. (1999) Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 4360-4365.
43. More, M. I., Finger, L. D., Stryker, J. L., Fuqua, C., Eberhard, A., and Winans, S. C. (1996) Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates, *Science.* 272, 1655-1658.
44. Schaefer, A. L., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., Jr., and Greenberg, E. P. (1996) Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 9505-9509.
45. Sloock, J., VanRiet, D., Kolibachuk, D., and Greenberg, E. P. (1990) Critical regions of the *Vibrio fischeri* luxR protein defined by mutational analysis, *J Bacteriol.* 172, 3974-3979.
46. Stevens, A. M., Dolan, K. M., and Greenberg, E. P. (1994) Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 12619-12623.
47. Marketon, M. M., and Gonzalez, J. E. (2002) Identification of two quorum-sensing systems in *Sinorhizobium meliloti*, *J Bacteriol.* 184, 3466-3475.
48. Visick, K. L., Foster, J., Doino, J., McFall-Ngai, M., and Ruby, E. G. (2000) *Vibrio fischeri* lux genes play an important role in colonization and development of the host light organ, *J Bacteriol.* 182, 4578-4586.
49. Engebrecht, J., and Silverman, M. (1984) Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81, 4154-4158.
50. Stevens, A. M., and Greenberg, E. P. (1997) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes, *J Bacteriol.* 179, 557-562.
51. Nealson, K. H., and Hastings, J. W. (1979) Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance, *Microbiol Rev.* 43, 496-518.
52. Dunlap, P. V. (1999) Quorum regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*, *J Mol Microbiol Biotechnol.* 1, 5-12.
53. Hanzelka, B. L., and Greenberg, E. P. (1996) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis, *J Bacteriol.* 178, 5291-5294.
54. Val, D. L., and Cronan, J. E., Jr. (1998) In vivo evidence that S-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthases, *J Bacteriol.* 180, 2644-2651.

55. Hanzelka, B. L., Parsek, M. R., Val, D. L., Dunlap, P. V., Cronan, J. E., Jr., and Greenberg, E. P. (1999) Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein, *J Bacteriol.* *181*, 5766-5770.
56. Rodelas, B., Lithgow, J. K., Wisniewski-Dye, F., Hardman, A., Wilkinson, A., Economou, A., Williams, P., and Downie, J. A. (1999) Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (rhi) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *J Bacteriol.* *181*, 3816-3823.
57. Gilson, L., Kuo, A., and Dunlap, P. V. (1995) AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins, *J Bacteriol.* *177*, 6946-6951.
58. Laue, B. E., Jiang, Y., Chhabra, S. R., Jacob, S., Stewart, G. S., Hardman, A., Downie, J. A., O'Gara, F., and Williams, P. (2000) The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase, *Microbiology.* *146*, 2469-2480.
59. Rivas, M., Seeger, M., Jedlicki, E., and Holmes, D. S. (2007) Second acyl homoserine lactone production system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Appl Environ Microbiol.* *73*, 3225-3231. Epub 2007 Mar 3229.
60. Parsek, M. R., and Greenberg, E. P. (2000) Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms, *Proc Natl Acad Sci U S A.* *97*, 8789-8793.
61. McGowan, S., Sebahia, M., Jones, S., Yu, B., Bainton, N., Chan, P. F., Bycroft, B., Stewart, G. S., Williams, P., and Salmond, G. P. (1995) Carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* is regulated by CarR, a homologue of the LuxR transcriptional activator, *Microbiology.* *141*, 541-550.
62. Ortori, C. A., Atkinson, S., Chhabra, S. R., Camara, M., Williams, P., and Barrett, D. A. (2007) Comprehensive profiling of N-acylhomoserine lactones produced by *Yersinia pseudotuberculosis* using liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole-linear ion trap mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem.* *387*, 497-511. Epub 2006 Sep 2012.
63. Anderson, J. C., Clarke, E. J., Arkin, A. P., and Voigt, C. A. (2006) Environmentally controlled invasion of cancer cells by engineered bacteria, *J Mol Biol.* *355*, 619-627. Epub 2005 Nov 2014.
64. Greenberg, E. P. (2000) Bacterial genomics. Pump up the versatility, *Nature.* *406*, 947-948.
65. Bassler, B. L., Wright, M., Showalter, R. E., and Silverman, M. R. (1993) Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence, *Mol Microbiol.* *9*, 773-786.
66. Milton, D. L., Chalker, V. J., Kirke, D., Hardman, A., Camara, M., and Williams, P. (2001) The LuxM homologue VanM from *Vibrio anguillarum* directs the synthesis of N-(3-hydroxyhexanoyl)homoserine lactone and N-hexanoylhomoserine lactone, *J Bacteriol.* *183*, 3537-3547.
67. Cullinane, M., Baysse, C., Morrissey, J. P., and O'Gara, F. (2005) Identification of two lysophosphatidic acid acyltransferase genes with overlapping function in *Pseudomonas fluorescens*, *Microbiology.* *151*, 3071-3080.
68. West, J., Tompkins, C. K., Balantac, N., Nudelman, E., Meengs, B., White, T., Bursten, S., Coleman, J., Kumar, A., Singer, J. W., and Leung, D. W. (1997) Cloning and expression of two human lysophosphatidic acid acyltransferase cDNAs that enhance cytokine-induced signaling responses in cells, *DNA Cell Biol.* *16*, 691-701.

69. Shih, G. C., Kahler, C. M., Swartley, J. S., Rahman, M. M., Coleman, J., Carlson, R. W., and Stephens, D. S. (1999) Multiple lysophosphatidic acid acyltransferases in *Neisseria meningitidis*, *Mol Microbiol.* 32, 942-952.
70. De Kievit, T. R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C., and Iglewski, B. H. (2001) Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns, *Appl Environ Microbiol.* 67, 1865-1873.
71. Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L., and Iglewski, B. H. (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication, *Science.* 260, 1127-1130.
72. Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C., and Iglewski, B. H. (1997) Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol.* 179, 3127-3132.
73. Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., and Lazdunski, A. (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators *LasR* and *RhIR* (*VsmR*) to expression of the stationary-phase sigma factor *RpoS*, *Mol Microbiol.* 21, 1137-1146.
74. Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H., and Greenberg, E. P. (1995) A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc Natl Acad Sci USA.* 92, 1490-1494.
75. Brint, J. M., and Ohman, D. E. (1995) Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of *RhlR*-*RhlI*, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive *LuxR*-*LuxI* family, *J Bacteriol.* 177, 7155-7163.
76. Swift, S., Williams, P. and G. Stewart (1999) N-acylhomoserine lactones and quorum sensing in Proteobacteria. , *In Cell-cell signaling in bacteria . Dunny, G.M., Winans, S.C. American Society for Microbiology. Washington D.C. USA.,* 291-313.
77. Govan, J. R., and Deretic, V. (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*, *Microbiol Rev.* 60, 539-574.
78. Govan, J. R., Hughes, J. E., and Vandamme, P. (1996) *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues, *J Med Microbiol.* 45, 395-407.
79. Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E. P., and Sokol, P. A. (1999) Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the *LuxRI* homologs *CepRI*, *J Bacteriol.* 181, 748-756.
80. Gotschlich, A., Huber, B., Geisenberger, O., Togl, A., Steidle, A., Riedel, K., Hill, P., Tummler, B., Vandamme, P., Middleton, B., Camara, M., Williams, P., Hardman, A., and Eberl, L. (2001) Synthesis of multiple N-acylhomoserine lactones is wide-spread among the members of the *Burkholderia cepacia* complex, *Syst Appl Microbiol.* 24, 1-14.
81. Huber, B., Riedel, K., Hentzer, M., Heydorn, A., Gotschlich, A., Givskov, M., Molin, S., and Eberl, L. (2001) The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility, *Microbiology.* 147, 2517-2528.
82. Aguilar, C., Friscina, A., Devescovi, G., Kojic, M., and Venturi, V. (2003) Identification of quorum-sensing-regulated genes of *Burkholderia cepacia*, *J Bacteriol.* 185, 6456-6462.
83. Bassler, B. L. (2002) Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria, *Cell.* 109, 421-424.
84. Tateda, K., Ishii, Y., Horikawa, M., Matsumoto, T., Miyairi, S., Pechere, J. C., Standiford, T. J., Ishiguro, M., and Yamaguchi, K. (2003) The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils, *Infect Immun.* 71, 5785-5793.

85. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., and Lappin-Scott, H. M. (1995) Microbial biofilms, *Annu Rev Microbiol.* 49, 711-745.
86. Costerton, J. W., Stewart, P. S., and Greenberg, E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science.* 284, 1318-1322.
87. Parsek, M. R., and Greenberg, E. P. (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms, *Trends Microbiol.* 13, 27-33.
88. Asad, S., and Opal, S. M. (2008) Bench-to-bedside review: Quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection, *Crit Care.* 12, 236. Epub 2008 Nov 2025.
89. Parsek, M. R., and Greenberg, E. P. (1999) Quorum sensing signals in development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Methods Enzymol.* 310, 43-55.
90. Wolcott, R. D., and Ehrlich, G. D. (2008) Biofilms and chronic infections, *Jama.* 299, 2682-2684.
91. Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., and Greenberg, E. P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm, *Science.* 280, 295-298.
92. Eberl, L., Winson, M. K., Sternberg, C., Stewart, G. S., Christiansen, G., Chhabra, S. R., Bycroft, B., Williams, P., Molin, S., and Givskov, M. (1996) Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*, *Mol Microbiol.* 20, 127-136.
93. Lynch, M. J., Swift, S., Kirke, D. F., Keevil, C. W., Dodd, C. E., and Williams, P. (2002) The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*, *Environ Microbiol.* 4, 18-28.
94. Jayaraman, A., and Wood, T. K. (2008) Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease, *Annu Rev Biomed Eng.* 10, 145-167.
95. Zhang, L. H., and Dong, Y. H. (2004) Quorum sensing and signal interference: diverse implications, *Mol Microbiol.* 53, 1563-1571.
96. Janssens, J. C., Steenackers, H., Robijns, S., Gellens, E., Levin, J., Zhao, H., Hermans, K., De Coster, D., Verhoeven, T. L., Marchal, K., Vanderleyden, J., De Vos, D. E., and De Keersmaecker, S. C. (2008) Brominated furanones inhibit biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Appl Environ Microbiol.* 74, 6639-6648. Epub 2008 Sep 6612.
97. Morohoshi, T., Shiono, T., Takidouchi, K., Kato, M., Kato, N., Kato, J., and Ikeda, T. (2007) Inhibition of quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by synthetic analogs of N-acylhomoserine lactone, *Appl Environ Microbiol.* 73, 6339-6344. Epub 2007 Aug 6333.
98. Dong, Y. H., Gusti, A. R., Zhang, Q., Xu, J. L., and Zhang, L. H. (2002) Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species, *Appl Environ Microbiol.* 68, 1754-1759.
99. Kaper, J. B., and Sperandio, V. (2005) Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract, *Infect Immun.* 73, 3197-3209.
100. Jiang, Y., Camara, M., Chhabra, S. R., Hardie, K. R., Bycroft, B. W., Lazdunski, A., Salmond, G. P., Stewart, G. S., and Williams, P. (1998) In vitro biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-butanoyl-L-homoserine lactone, *Mol Microbiol.* 28, 193-203.
101. McClean, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B. W., Stewart, G. S., and Williams, P. (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones, *Microbiology.* 143, 3703-3711.

102. Morohoshi, T., Kato, M., Fukamachi, K., Kato, N., and Ikeda, T. (2008) N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472, *FEMS Microbiol Lett.* 279, 124-130.
103. Zhu, J., Chai, Y., Zhong, Z., Li, S., and Winans, S. C. (2003) Agrobacterium bioassay strain for ultrasensitive detection of N-acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: detection of autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*, *Appl Environ Microbiol.* 69, 6949-6953.
104. Zhu, J., Beaber, J. W., More, M. I., Fuqua, C., Eberhard, A., and Winans, S. C. (1998) Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*, *J Bacteriol.* 180, 5398-5405.
105. Tempe, J., Petit, A., Holsters, M., Montagu, M., and Schell, J. (1977) Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation: Possible relation to transformation in crown gall, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74, 2848-2849.
106. Fuqua, W. C., and Winans, S. C. (1994) A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite, *J Bacteriol.* 176, 2796-2806.
107. Miller, J. (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, CHS. New York.
108. Dessaux, Y., Petit, A., Ellis, J. G., Legrain, C., Demarez, M., Wiame, J. M., Popoff, M., and Tempe, J. (1989) Ti plasmid-controlled chromosome transfer in *Agrobacterium tumefaciens*, *J Bacteriol.* 171, 6363-6366.
109. Llamas, I., Keshavan, N., and Gonzalez, J. E. (2004) Use of *Sinorhizobium meliloti* as an indicator for specific detection of long-chain N-acyl homoserine lactones, *Appl Environ Microbiol.* 70, 3715-3723.
110. Zhang, L., Murphy, P. J., Kerr, A., and Tate, M. E. (1993) *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones, *Nature.* 362, 446-448.
111. Pearson, J. P., Pesci, E. C., and Iglewski, B. H. (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes, *J Bacteriol.* 179, 5756-5767.
112. Yates, E. A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S. R., Sockett, R. E., Goldner, M., Dessaux, Y., Camara, M., Smith, H., and Williams, P. (2002) N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect Immun.* 70, 5635-5646.
113. Shaw, P. D., Ping, G., Daly, S. L., Cha, C., Cronan, J. E., Jr., Rinehart, K. L., and Farrand, S. K. (1997) Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 6036-6041.
114. Llamas, I., Quesada, E., Martinez-Canovas, M. J., Gronquist, M., Eberhard, A., and Gonzalez, J. E. (2005) Quorum sensing in halophilic bacteria: detection of N-acyl-homoserine lactones in the exopolysaccharide-producing species of *Halomonas*, *Extremophiles.* 9, 333-341. Epub 2005 May 2021.
115. Taminiou, B., Daykin, M., Swift, S., Boschiroli, M. L., Tibor, A., Lestrade, P., De Bolle, X., O'Callaghan, D., Williams, P., and Letesson, J. J. (2002) Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*, *Infect Immun.* 70, 3004-3011.
116. Chhabra, S. R., Harty, C., Hooi, D. S., Daykin, M., Williams, P., Telford, G., Pritchard, D. I., and Bycroft, B. W. (2003) Synthetic analogues of the bacterial signal (quorum sensing) molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as immune modulators, *J Med Chem.* 46, 97-104.

117. Naumann, D. (2000) Infrared spectroscopy in microbiology, *Wiley, Chichester*, pp 1-29.
118. Cataldi, T. R., Bianco, G., Frommberger, M., and Schmitt-Kopplin, P. (2004) Direct analysis of selected N-acyl-L-homoserine lactones by gas chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom.* 18, 1341-1344.
119. McLafferty, F. (1956) Mass Spectrometric Analysis Broad Applicability to Chemical Research, *Anal Chem* 28 (3), 306-316.
120. Gould, T. A., Herman, J., Krank, J., Murphy, R. C., and Churchill, M. E. (2006) Specificity of acyl-homoserine lactone synthases examined by mass spectrometry, *J Bacteriol.* 188, 773-783.
121. Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H., and Greenberg, E. P. (1994) Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 197-201.
122. Cha, C., Gao, P., Chen, Y. C., Shaw, P. D., and Farrand, S. K. (1998) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria, *Mol Plant Microbe Interact.* 11, 1119-1129.
123. Cataldi, T. R., Bianco, G., Palazzo, L., and Quaranta, V. (2007) Occurrence of N-acyl-L-homoserine lactones in extracts of some Gram-negative bacteria evaluated by gas chromatography-mass spectrometry, *Anal Biochem.* 361, 226-235. Epub 2006 Dec 2020.
124. Byers, J. T., Lucas, C., Salmond, G. P., and Welch, M. (2002) Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule, *J Bacteriol.* 184, 1163-1171.

DISCUSIÓN GENERAL

A pesar de las altas tasas de vacunación la tos convulsa continúa siendo un problema de salud pública en todo el mundo. Las vacunas actualmente utilizadas si bien otorgan protección contra los síntomas de la enfermedad, no previenen eficazmente la infección, permitiendo el establecimiento de portadores asintomáticos e imposibilitando su erradicación (1). La reemergencia de pertussis en la última década y la concomitante aparición de casos atípicos de la enfermedad, principalmente en adolescentes y adultos (2-3), han puesto de manifiesto la necesidad de esclarecer aspectos vinculados con la patogénesis de *B. pertussis* con el fin de desarrollar estrategias más efectivas para el control de la enfermedad.

Entre las posibles causas del resurgimiento de pertussis a nivel mundial se reportan diferencias genotípicas entre cepas circulantes y cepas utilizadas para la producción de vacunas (4-5). Estas variaciones estarían asociadas principalmente al polimorfismo de los genes que codifican para factores de virulencia del patógeno, dificultando así su reconocimiento por el sistema inmune (6-7). Estas divergencias generarían la adaptación del patógeno a la vacunación, contribuyendo al aumento de la incidencia de la enfermedad y en consecuencia a su reemergencia (8). Se ha reportado que la vacunación con cepas de colección adaptadas al laboratorio ha contribuido a la selección de cepas circulantes que exhiben mayor virulencia y patogenicidad (9).

Para el desarrollo de nuestro trabajo se planteó como primer objetivo, estudiar diferencias fenotípicas entre aislados clínicos locales y cepas de referencia de *B. pertussis* aplicando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier en combinación con el método estadístico multivariado Análisis Jerárquico de Clusters. Asimismo, esta herramienta se utilizó para el análisis de discriminación fenotípica entre *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*, evaluando el grado de disimilitud entre las poblaciones. La espectroscopía FT-IR junto con el Análisis de Clusters ha sido empleada en variados trabajos de investigación para el estudio de identificación, caracterización y diferenciación fenotípica entre bacterias a nivel intra e interespecie como también intergénero (10-15). Los estudios presentados en el Capítulo II mostraron que es posible diferenciar fenotípicamente *Bordetella* spp. mediante espectroscopía FT-IR combinada con AJC. Asimismo, en este capítulo se demostró que aislados clínicos circulantes de *B. pertussis* exhiben un marcado nivel de heterogeneidad respecto a las cepas de referencia de este patógeno. A su vez, el grado de disimilitud fenotípica determinado entre los aislados clínicos analizados sugiere que entre estos habría variadas diferencias bioquímicas que deberían ser analizadas. Las diferencias fenotípicas

entre aislados clínicos locales de *B. pertussis* y cepas de referencia podrían ser una de las causas de la reducida efectividad exhibida por las vacunas actuales.

Otra causa de la reducida eficacia de las vacunas podría estar asociada con el hecho de que tradicionalmente estas se han formulado con células crecidas en condiciones de cultivo muy diferentes a las que las células encuentran *in vivo*, por lo que el fenotipo de los organismos vacunales podría diferir del que expresa la misma bacteria creciendo en su hospedador. Estas bacterias crecen *in vivo* al menos durante la primera etapa de colonización adheridas al epitelio ciliado del tracto respiratorio superior. Sin embargo para la producción de vacunas comerciales, se las hace crecer en reactores agitados mecánicamente donde los organismos se desarrollan en un medio sin limitaciones de nutrientes y alcanzando en fase exponencial la máxima velocidad de crecimiento.

La capacidad que exhibe *B. pertussis* en desarrollar biofilms, tal como se ha determinado en nuestro laboratorio (16-17), podría formar parte de una estrategia de colonización y de sobrevivencia dentro del hospedador. La formación de biofilms permite a los patógenos persistir en los hospedadores a través de la resistencia a terapias antimicrobianas convencionales y la evasión a la respuesta inmune (18). Estas características explican por qué ciertos programas de prevención y tratamiento llevados a cabo considerando solo el modo de crecimiento planctónico de las bacterias, han fracasado en el control de enfermedades persistentes asociadas a biofilm. En este contexto, en el Capítulo III se analizó el proceso de adhesión y la formación de biofilms de aislados clínicos circulantes de *B. pertussis* comparativamente con cepa de referencia Tohama I. Se determinó que la gran mayoría de los aislados clínicos analizados presenta no sólo mayor adherencia a superficies abióticas respecto de la cepa *B. pertussis* Tohama I, sino también mayor capacidad para crecer como biofilm. Esto podría ser el resultado de una mayor expresión de proteínas reguladas por el sistema BvgAS, como ciertas adhesinas. A partir del análisis de proteínas mediante electroforesis, se determinó la existencia de diferencias fenotípicas entre las células crecidas en condiciones planctónicas y sésiles para el aislado clínico Bp 953 al igual que para la cepa Tohama I, coincidiendo con el hecho de que el modo de crecimiento en biofilm aporta características fisiológicas específicas a las células sésiles (19). En particular, los estudios mediante FT-IR permitieron discriminar fenotípicamente la población de células sésiles del aislado clínico Bp 953 de su contraparte población planctónica, concordando con los resultados obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio con la cepa de referencia Tohama I (17, 20). Estos resultados confirman que la población sésil de los aislados clínicos de *B. pertussis* presentaría, al igual que la cepa de referencia, una fisiología distintiva respecto de la población planctónica. Las

diferencias fenotípicas registradas mediante FT-IR entre ambas poblaciones del aislado clínico fueron encontradas principalmente en la región correspondiente a carbohidratos, lo cual concuerda con resultados reportados para otras bacterias formadoras de biofilm (19, 21-22). En especial, se determinó que la población de células sésiles de Bp 953, al igual que para la cepa Tohama I, produce mayores niveles de carbohidratos respecto de su contraparte planctónica, destacándose para la población sésil de dicho aislamiento un mayor aumento en carbohidratos comparativamente con cepa de referencia. El alto contenido de exopolisacáridos en la matriz contribuiría a la protección de las células sésiles contra la acción de anticuerpos, células fagocíticas y tratamientos antimicrobianos, representando esto un incremento en la patogenicidad de las cepas circulantes de *B. pertussis*.

Teniendo en cuenta que *B. pertussis* es capaz de desarrollar biofilm y que numerosos trabajos han reportado que una gran cantidad de bacterias Gram-negativas controlan este evento fisiológico mediante sistemas de Quórum Sensing, con acil-homoserín lactona como moléculas señal (23-24), se realizaron estudios para determinar si este patógeno presenta la capacidad de sintetizar dichas moléculas. En el Capítulo IV se determinó por medio de herramientas bioinformáticas, que la proteína BP0036 de *B. pertussis* Tohama I presenta elevada homología con sintasas de AHLs pertenecientes a la familia HdtS (25), demostrando que posee los dominios y motivos característicos de este tipo de enzimas. Estos resultados sugieren que BP0036 funcionaría como una aciltransferasa del tipo HdtS produciendo moléculas AHLs a partir de S-adenosil metionina y ácidos grasos.

Mediante los ensayos de detección de AHLs empleando cepas biosensoras se determinó que la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I y el aislado clínico Bp 953 producen moléculas señal del tipo AHL pero en baja concentración, por lo que solo pueden ser detectadas a partir de extractos altamente concentrados correspondientes a cultivos líquidos o en biofilm. En el Capítulo IV también se comprobó que la actividad inductora de los extractos de *B. pertussis* aumenta en función de la densidad celular poblacional de sus cultivos, tal como fue determinado para otras especies bacterianas (26-27), lo cual permitió corroborar que dicha actividad estaría generada por moléculas de Quórum Sensing. Mediante cromatografía en placa delgada en combinación con la detección empleando cepas biosensoras, se determinó que *B. pertussis* sería capaz de producir al menos 2 tipos de acil-homoserín lactonas diferentes. Se demostró además que *B. pertussis* produce mayor concentración de AHLs al ser cultivada en biofilm que bajo condiciones planctónicas. Sin embargo, los niveles de concentración de estas moléculas resultaron ser de 10 a 20 veces menores respecto al valor determinado para la cepa *P. aeruginosa* PAO1.

Asimismo, en el Capítulo IV se llevaron a cabo estudios a través de los cuales se intentó dilucidar la estructura molecular de las AHLs producidas por *B. pertussis*. De este modo, empleando espectroscopía FT-IR se identificaron a partir de extractos de cultivo en biofilm de *B. pertussis* picos de absorción correspondientes a grupos funcionales característicos de las moléculas 3-oxo-alcenoil HSLs, lo cual indica que *B. pertussis* sintetizaría este tipo de AHL. En particular, mediante GC/MS-EI no se consiguió la identificación de AHLs en los extractos de cultivo de *B. pertussis*, sugiriendo que *B. pertussis* podría sintetizar 3-oxo-AHLs en baja concentración, las cuales sufren una degradación térmica al ser analizadas mediante dicha metodología. Específicamente, aplicando HPLC MS/MS-MRM a los extractos de *B. pertussis* se logró identificar las moléculas 3-oxo-C₈-HSL y 3-oxo-C₁₀-HSL, lo cual permitió corroborar la capacidad de *B. pertussis* para producir moléculas señal del tipo 3-oxo-AHLs.

La demostración de que *B. pertussis* es capaz de sintetizar moléculas señal del tipo AHL nos permite deducir que este patógeno respiratorio posee al menos un circuito de señalización del tipo Quórum Sensing, a través del cual podría regular la expresión de genes asociados con procesos fisiológicos. Este hallazgo permitirá el desarrollo de nuevas aplicaciones terapéuticas antipertussis, para lograr interrumpir la acción de las moléculas señal, reprimiendo así la posible expresión de genes vinculados con su virulencia y persistencia en el hospedador.

En síntesis, los estudios presentados en este trabajo de Tesis Doctoral han permitido investigar comparativamente aspectos fisiológicos de la cepa de referencia de *B. pertussis* Tohama I y aislados clínicos nacionales, los cuales están relacionados con la capacidad que presenta este patógeno para sobrevivir en su hospedador. Los resultados obtenidos nos plantean la necesidad de continuar llevando a cabo estudios con organismos circulantes de *B. pertussis* en estas líneas de investigaciones, con el fin de esclarecer aspectos básicos del proceso infeccioso y patogénesis de *B. pertussis* aún no comprendidos.

REFERENCIAS

1. Sandora, T. J., Gidengil, C. A., and Lee, G. M. (2008) Pertussis vaccination for health care workers, *Clin Microbiol Rev.* 21, 426-434.
2. Cherry, J., Heininger, U., Feigin, R., Demmler, G., and Kaplan, S. (2004) Pertussis and other Bordetella infections. Textbook of pediatric infectious diseases. Philadelphia, Pa.: The W. B. Saunders Co, 1588-1608.
3. Mattoo, S., and Cherry, J. D. (2005) Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to Bordetella pertussis and other Bordetella subspecies, *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 326-382.
4. Mastrantonio, P., Spigaglia, P., van Oirschot, H., van der Heide, H. G., Heuvelman, K., Stefanelli, P., and Mooi, F. R. (1999) Antigenic variants in Bordetella pertussis strains isolated from vaccinated and unvaccinated children, *Microbiology.* 145, 2069-2075.
5. Elomaa, A., Advani, A., Donnelly, D., Antila, M., Mertsola, J., Hallander, H., and He, Q. (2005) Strain variation among Bordetella pertussis isolates in Finland, where the whole-cell pertussis vaccine has been used for 50 years, *J Clin Microbiol.* 43, 3681-3687.
6. Mooi, F. R., van Oirschot, H., Heuvelman, K., van der Heide, H. G., Gaastra, W., and Willems, R. J. (1998) Polymorphism in the Bordetella pertussis virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution, *Infect Immun.* 66, 670-675.
7. Van Loo, I. H., Heuvelman, K. J., King, A. J., and Mooi, F. R. (2002) Multilocus sequence typing of Bordetella pertussis based on surface protein genes, *J Clin Microbiol.* 40, 1994-2001.
8. Mooi, F. R., van Loo, I. H., and King, A. J. (2001) Adaptation of Bordetella pertussis to vaccination: a cause for its reemergence?, *Emerg Infect Dis.* 7, 526-528.
9. Weber, C., Boursaux-Eude, C., Coralie, G., Caro, V., and Guiso, N. (2001) Polymorphism of Bordetella pertussis isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years, *J Clin Microbiol.* 39, 4396-4403.
10. Helm, D., Labischinsky, H., Schallehn, G., and Naumann, D. (1991) Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy, *J Gen Microbiol* 137, 69-79.
11. Van der Mei, H., Naumann, D., and Busscher, H. (1993) Grouping of oral streptococcal species using Fourier-transform infrared spectroscopy in comparison with classical microbiological identification, *Arch Oral Biol* 38, 1013-1019.
12. Johnsen, K., and Nielsen, P. (1999) Diversity of Pseudomonas strains isolated with King's B and Gould's S1 agar determined by repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction, 16S rDNA sequencing and Fourier transform infrared spectroscopy characterisation, *FEMS Microbiol Lett* 173, 155-162.
13. Gomez, J., Sockalingum, G., Aubert, D., Toubas, D., Pinon, J., Witthum, F., and Manfait, M. (1999) Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions, Kluwer, Dordrecht, 469-470.
14. Bastert, J., Korting, H., Traenkle, A., and Schmalreck, A. (1999) Identification of dermatophytes by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), *Mycoses* 42, 525-528.
15. Amiel, C., Mariey, L., Curk-Daubie, M., Pichon, P., and Travert, J. (2000) Potentiality of Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) for discrimination and identification of dairy lactic acid bacteria, *Lait* 80, 445-459.

16. Bosch, A., Serra, D., Prieto, C., Schmitt, J., Naumann, D., and Yantorno, O. (2006) Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy, *Appl Microbiol Biotechnol.* 71, 736-747. Epub 2005 Nov 2016.
17. Serra, D., Bosch A., Russo, D., Rodriguez, M., Zorreguieta, A., Schmitt, J., Naumann, D., and O. Yantorno. (2007) Continuous nondestructive monitoring of *Bordetella pertussis* biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy and other corroborative techniques, *Anal Bioanal Chem* 387, 1759-1767.
18. Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clin Microbiol Rev.* 15, 167-193.
19. Mikkelsen, H., Duck, Z., Lilley, K. S., and Welch, M. (2007) Interrelationships between colonies, biofilms, and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol.* 189, 2411-2416. Epub 2007 Jan 2412.
20. Serra, D. O., Lucking, G., Weiland, F., Schulz, S., Gorg, A., Yantorno, O. M., and Ehling-Schulz, M. (2008) Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*, *Proteomics.* 8, 4995-5010.
21. Vilain, S., and Brozel, V. S. (2006) Multivariate approach to comparing whole-cell proteomes of *Bacillus cereus* indicates a biofilm-specific proteome, *J Proteome Res.* 5, 1924-1930.
22. Vilain, S., Cosette, P., Hubert, M., Lange, C., Junter, G. A., and Jouenne, T. (2004) Comparative proteomic analysis of planktonic and immobilized *Pseudomonas aeruginosa* cells: a multivariate statistical approach, *Anal Biochem.* 329, 120-130.
23. Fuqua, W. C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators, *J Bacteriol.* 176, 269-275.
24. Miller, M. B., and Bassler, B. L. (2001) Quorum sensing in bacteria, *Annu Rev Microbiol.* 55, 165-199.
25. Laue, B. E., Jiang, Y., Chhabra, S. R., Jacob, S., Stewart, G. S., Hardman, A., Downie, J. A., O'Gara, F., and Williams, P. (2000) The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase, *Microbiology.* 146, 2469-2480.
26. Yates, E. A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S. R., Sockett, R. E., Goldner, M., Dessaux, Y., Camara, M., Smith, H., and Williams, P. (2002) N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect Immun.* 70, 5635-5646.
27. Llamas, I., Quesada, E., Martinez-Canovas, M. J., Gronquist, M., Eberhard, A., and Gonzalez, J. E. (2005) Quorum sensing in halophilic bacteria: detection of N-acylhomoserine lactones in the exopolysaccharide-producing species of *Halomonas*, *Extremophiles.* 9, 333-341. Epub 2005 May 2021.