

**MARÍA EUGENIA ZURITA**

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL 2015

ESTUDIO DE LA  
ESTIMULACIÓN DE  
LA RESPUESTA INNATA  
EN MUCOSAS INDUCIDA  
POR AGONISTAS EN  
LA PROTECCIÓN  
CONTRA ***PERTUSSIS***,  
UNA ENFERMEDAD  
CONSIDERADA  
RESURGENTE

DIRECTOR DRA. DANIELA HOZBOR  
CODIRECTOR DR. MARTÍN RUMBO

Universidad Nacional de La Plata.  
Facultad de Ciencias Exactas.  
Departamento de Ciencias Biológicas.







El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata bajo la dirección de la Dra. Daniela Hozbor y la codirección del Dr. Martín Rumbo.



## **Mi reconocimiento**

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) y a la Facultad de Ciencias Exactas, por haberme brindado el ámbito propicio para desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de las becas que posibilitaron mi dedicación exclusiva a la investigación científica.

## **Agradecimientos**

Quisiera aprovechar este espacio para agradecer a todos los que me han acompañado a lo largo de todos estos años.

A Daniela Hozbor, por haberme recibido en su grupo de trabajo y haberme dado la posibilidad de comenzar este camino en la ciencia, por todo su empuje y paciencia, muchas gracias.

A Martín Rumbo, por sus aportes en inmunología y por la buena predisposición que tiene siempre para ayudar.

A los mis compañeros los Bordetellos, gracias por el día a día!!! Las horas en el flujo laminar no serían lo mismo. Por el compañerismo ante todo, mil gracias!!!!

A Emi, porque siempre estar ahí para darme una mano, por las horas de charla y consejos y por el trabajo en equipo para lograr llegar a las clases de pilates!!!

A todos los chicos del LISIN, porque siempre me recibieron con buena onda, y en especial a Gri y Agus que me han ayudado tanto

A los IBBMeños, que cada vez que bajo me encuentro con una cara nueva!! Gracias a los que siempre dan una mano cuando uno aparece pidiendo algo, por las charlas de pasillo y porque vuelvan los PC<sup>2</sup>!!

A papá y mamá, porque apoyarme en cada decisión que he tomado y por estar siempre conmigo a pesar de la distancia!! Los quiero mucho!!

A mis hermanos, porque SIEMPRE me dan una mano!! por los mates post facu y las juntadas de los fin de semana, y por todas las veces que cuidaron a Lumo exiliado, je. Los quiero muchooooo!

Lu, gracias por el diseño de la tesis!! Te volví loca con los colores, pero quedó divina!!

A **Leandro**, por todos los años que llevamos compartidos, por el apoyo y el aguante siempre, pero más aún a lo largo de este último año!! Gracias por hacerme reír cuando más lo necesito y hacerme tan feliz!! **TE AMO!!!**





<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>13</b>
Introducción	17
El patógeno y la enfermedad	21
Interacción de <i>B. pertussis</i> con el huésped	23
Lipopolisacárido (LPS).	27
Respuesta inmune frente a <i>B. pertussis</i>	28
Vacunas contra pertussis	30
Fenómeno StIR como escenario útil para el desarrollo de nuevas estrategias de control	33
Mecanismos antimicrobianos de la mucosa respiratoria	35
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
Caracterización <i>in vivo</i> del fenómeno StIR en el marco de la infección por <i>Bordetella pertussis</i>	41
Inducción de la eliminación de <i>Bordetella pertussis</i> del huésped mediada por el LPS: definición de condiciones experimentales	43
<b>INTRODUCCIÓN</b>	45
<b>RESULTADOS</b>	47
Ensayo dosis-respuesta	47
Evaluación de la cinética de inducción del fenómeno StIR para <i>B. pertussis</i> por el lipopolisacárido	50
<b>DISCUSIÓN</b>	53
¿La respuesta desencadenada por el LPS ocurre a lo largo de todo el tracto respiratorio?	55
<b>INTRODUCCIÓN</b>	57
<b>RESULTADOS</b>	58
Análisis del perfil de expresión de citoquinas y quimoquinas a nivel del árbol respiratorio	58
Análisis de las poblaciones celulares que intervienen en la respuesta inmune inducida por el LPS	63
Análisis del perfil inflamatorio pulmonar como consecuencia del tratamiento con LPS	65
<b>DISCUSIÓN</b>	67
¿Quiénes son los actores principales del fenómeno StIR?	71
<b>INTRODUCCIÓN</b>	73
<b>RESULTADOS</b>	74

Rol de los neutrófilos en el escenario StIR para <i>B. pertussis</i>	74
Evaluación del rol las especies reactivas del oxígeno (ROS) en la eliminación de <i>B. pertussis</i>	77
Evaluación del rol de los ROS en la inducción del fenómeno StIR desencadenado por el LPS	83
Cuantificación de especies reactivas del nitrógeno en BAL	84
Rol de las Especies reactivas al nitrógeno en el StIR	86
DISCUSIÓN	87
Caracterización <i>in vitro</i> del fenómeno StIR en el marco de la infección por <i>Bordetella pertussis</i>	91
INTRODUCCIÓN	93
RESULTADOS	95
Evaluación de la capacidad bactericida de las células epiteliales inducida por la presencia de LPS	95
Análisis del poder bactericida <i>in vitro</i> sobre <i>B. pertussis</i> inducido por el LPS	101
Evaluación de la capacidad bactericida de los macrófagos alveolares inducida por la presencia de LPS	106
DISCUSIÓN	110
Estudio del Rol del lipopolisacárido como inmunógeno protector	113
INTRODUCCIÓN	115
RESULTADOS	116
Rol protector del lipopolisacárido de <i>B. pertussis</i> como inmunógeno vacunal	116
DISCUSIÓN	120
<b>DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>123</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>135</b>
Medios y condiciones de cultivo	137
Complemento (20 ml 1000X)	137
Aislamiento del lipopolisacárido de <i>Bordetella</i>	138
Electroforesis en SDS-PAGE y Tinción de LPS	138
Caracterización <i>in vivo</i> del fenómeno StIR empleando el modelo murino de infección intranasal	139
1-Cepas de animales	139
2-Ensayos de infección	140
3-Tipos de muestras colectadas	140
A-Muestras para análisis de colonización bacteriana	140
B-Muestras para análisis de expresión génica	140

<b>Obtención de muestras por Microdissección láser</b>	<b>141</b>
<b>C-Muestras para análisis histopatológico de pulmón</b>	<b>141</b>
<b>D-Muestras de lavado broncoalveolar</b>	<b>141</b>
<b>4-Determinaciones realizadas</b>	<b>142</b>
<b>A-Experimentos de expresión génica</b>	<b>142</b>
<b>B-Análisis y cuantificación de células reclutadas al espacio broncoalveolar</b>	<b>143</b>
<b>C-Cuantificación de ROS</b>	<b>144</b>
<b>D-Cuantificación de NOS</b>	<b>144</b>
<b>5-Tratamientos de depleción</b>	<b>144</b>
<b>Ensayos <i>in vitro</i> empleando la línea celular A549</b>	<b>146</b>
<b>1-Condiciones de cultivo</b>	<b>146</b>
<b>2-Ensayos de estimulación</b>	<b>146</b>
<b>3-Ensayos de expresión génica</b>	<b>146</b>
<b>4-Determinación de ROS en sobrenadante de cultivo</b>	<b>147</b>
<b>5-Determinación de ROS intracelular por el método de CM-H<sub>2</sub>DCFDA</b>	<b>147</b>
<b>6-Depleción de ROS</b>	<b>147</b>
<b>7-Co-cultivo de células A549 con <i>B. pertussis</i></b>	<b>148</b>
<b>Ensayos <i>in vitro</i> empleando macrófagos alveolares</b>	<b>149</b>
<b>1-Condiciones de cultivo</b>	<b>149</b>
<b>2-Ensayos de estimulación</b>	<b>150</b>
<b>3-Determinación de ROS en sobrenadante de cultivo</b>	<b>150</b>
<b>4-Determinación de ROS intracelular por el método de CM-H<sub>2</sub>DCFDA</b>	<b>150</b>
<b>5-Co-cultivo de macrófagos alveolares con <i>B. pertussis</i></b>	<b>150</b>
<b>Determinación del poder bactericida del agua oxigenada <i>in vitro</i></b>	<b>151</b>
<b>Estudios <i>in vivo</i> de la capacidad protectora del LPS empleando el modelo de desafío intranasal en ratón</b>	<b>151</b>
<b>1-Preparación de vacunas en el laboratorio</b>	<b>151</b>
<b>2-Ensayos de Inmunización activa</b>	<b>151</b>
<b>3-Ensayos de Inmunización pasiva</b>	<b>152</b>
<b>Análisis estadístico</b>	<b>153</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>155</b>



# INTRODUCCIÓN

MARÍA EUGENIA ZURITA. TRABAJO DE TESIS DOCTORAL 2015.



## OBJETIVO GENERAL

*Pertussis*, tos convulsa o coqueluche es una enfermedad respiratoria aguda que si bien puede afectar a toda la población independientemente de su edad, el grupo de los recién nacidos y los lactantes menores de 6 meses de edad constituyen la población más vulnerable con los mayores registros de hospitalización, internación y muerte [11, 12]. Para el control de esta enfermedad se emplean vacunas que están incluidas en los Calendarios Nacionales de Vacunación. La introducción de la vacunación en forma masiva en los años cincuenta redujo drásticamente la morbilidad y la mortalidad asociada a la enfermedad [13]. Sin embargo, en los últimos años la enfermedad ha resurgido en varios países incluidos aquellos con altas tasas de vacunación [14-16]. Argentina por su parte detectó a partir del año 2003 un aumento de casos sostenido presentando la mayor tasa de incidencia en el año 2011: 16/100.000 habitantes. En dicho año también se registró el mayor número de fallecimientos asociados a la enfermedad (76 fallecimientos). Todas las muertes ocurrieron en el grupo de menores de 1 año, excepto cinco casos que ocurrieron en el grupo de 1-4 años (3), 25 a 34 años (1) y mayor de 75 años (1).

La situación epidemiológica de la enfermedad en nuestro país y otros ha mostrado que la enfermedad representa en la actualidad un problema grave para la salud pública. Si bien las causas de esta situación se están debatiendo fuertemente, todas apuntan a debilidades en las vacunas: baja efectividad, corta duración de la inmunidad conferida por ellas, adaptabilidad del agente causal a la inmunidad inducida por las vacunas, débil protección contra la infección y la transmisión.

El desarrollo de una nueva vacuna requiere entre otros mejorar el conocimiento de la interacción bacteria huésped y de los mecanismos que gobiernan la eliminación por parte del huésped. En este contexto nuestro grupo ha detectado recientemente que la exacerbación de la respuesta innata es capaz de eliminar de los pulmones al agente causal de la enfermedad. Esta estimulación de la respuesta innata (StIR) ha demostrado afectar las infecciones pulmonares en modelos tan diversos como la gripe A, *Streptococcus pneumoniae* y *Aspergillus niger*. Nuestro objetivo es caracterizar este fenómeno que hemos detectado recientemente en el contexto de la infección causada por *Bordetella pertussis*. Este microorganismo es el agente causal de la tos convulsa,

una enfermedad resurgente que en la actualidad ocasiona en el mundo alrededor de 16 millones de casos de los cuales 200.000 resultan ser fatales. Esta situación epidemiológica ha profundizado la preocupación sobre esta patología y ha marcado aún más la necesidad de comprender más acabadamente los mecanismos que puedan llevar a la eliminación de *B. pertussis* del huésped. Para ello nos propusimos profundizar los estudios sobre el fenómeno StIR inducido por el agonista TLR4 (el lipopolisacárido, LPS) en la infección causada por *B. pertussis* ya que habíamos detectado que el mismo puede eliminar al microorganismo de manera muy efectiva. Para ello trabajamos en ensayos *in vivo* e *in vitro*. No sólo analizamos el efecto de StIR en la colonización de *B. pertussis* sino que caracterizamos a nivel molecular la respuesta desencadenante de dicho fenómeno.

Los **objetivos específicos** de este trabajo fueron los siguientes:

- Caracterización *in vivo* del fenómeno StIR inducido por el LPS en la infección causada por *B. pertussis*. Para desarrollar este objetivo empleamos el modelo de infección intranasal en ratones ya puesto a punto en nuestro laboratorio [17]. Específicamente, realizamos ensayos para establecer la dosis más adecuada del agonista TLR-4 requerida para desencadenar la respuesta StIR. Caracterizamos la cinética del fenómeno y establecimos la mejor condición para estudiarlo.

- Identificación de los principales actores y mecanismos involucrados en el fenómeno. Para ello identificamos empleando microscopia de disección laser la región del árbol respiratorio con mayor participación en el fenómeno que desencadena el LPS. Más aún, mediante citometría de flujo identificamos a las poblaciones celulares con potencialidad de jugar un rol clave en el fenómeno StIR.

- Evaluación de las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno como actores esenciales en la eliminación de *B. pertussis*. Identificación de las poblaciones celulares que podrían intervenir en la producción de aquellas especies.

- Evaluación de la capacidad protectora del agonista TLR utilizado en la inducción del fenómeno StIR. Para alcanzar este objetivo empleamos el modelo de desafío intranasal con 2 dosis de inmunógeno y posterior desafío con una suspensión subletal de *B. pertussis*. Evaluamos también si la inmunidad humoral podría tener un rol en la protección contra este patógeno. Finalmente repetimos estos estudios sobre



la infección causada por *B. paraptussis* por ser otra de las especies con implicancia en la epidemiología de la enfermedad.

Para una mejor comprensión de nuestro trabajo y de los resultados alcanzados incluiré a continuación una descripción de los aspectos más relevantes sobre la enfermedad, su epidemiología, su resurgencia así como también las estrategias de control en uso y los mecanismos de protección hasta ahora descritos.



## Introducción

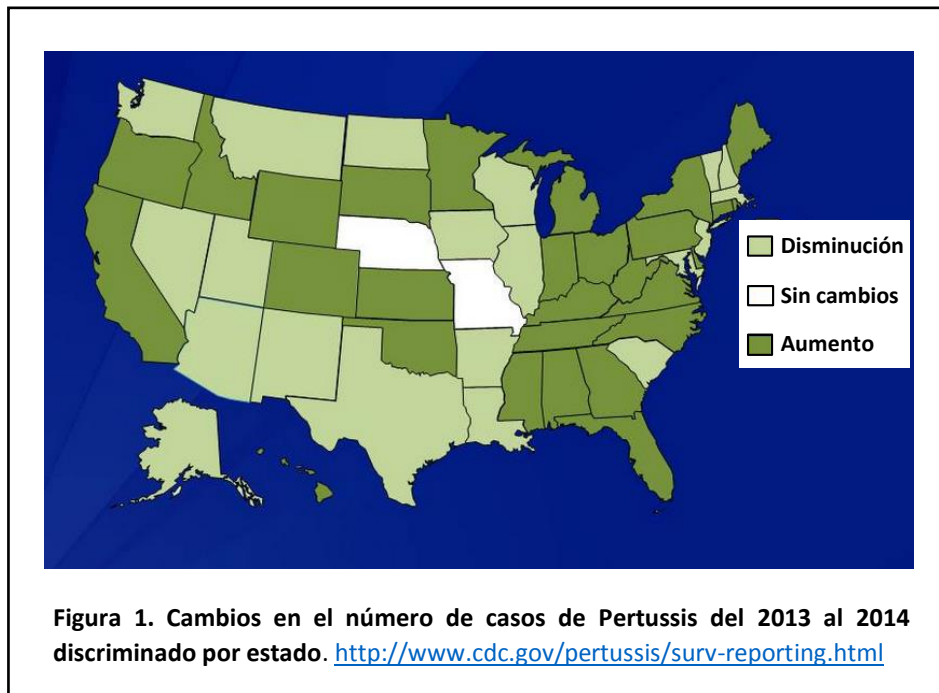
La tos convulsa, pertussis o coqueluche es una enfermedad respiratoria aguda que representa una causa importante de muerte en los bebés de todo el mundo, y sigue siendo una grave preocupación para la salud pública incluso en países con alta cobertura de vacunación. Así, las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud indican que en el año 2008 se produjeron alrededor de 16 millones de casos de pertussis de los cuales 195.000 resultaron ser fatales [18]. Esta enfermedad es causada principalmente por la bacteria *Bordetella pertussis* aunque también se registran casos por *B. parapertussis* y en menor medida por *B. holmesii* y *B. bronchiseptica*.

Pertussis es transmitida desde un individuo infectado a otro susceptible a través de gotitas o aerosoles. En su etapa sintomática temprana, pertussis es altamente contagiosa, con una tasa de ataque secundario de hasta al 90% entre los contactos familiares no inmunes. Si la enfermedad no es tratada, los pacientes pueden seguir contagiando durante 3 semanas o más después el inicio de los ataques típicos de tos, aunque la comunicabilidad disminuye rápidamente después de las 2 primeras semanas. Los portadores crónicos de *B. pertussis* son infrecuentes.

Antes del uso masivo de vacunas contra pertussis, la enfermedad era la más común de la infancia. Después de la introducción de la vacunación masiva en los países centrales durante los años 1950 y 1960, la incidencia de la enfermedad se redujo de manera dramática (> 90%). También fue drástica la reducción de la mortalidad de la enfermedad. Así, con estos exitosos resultados la vacuna contra pertussis (combinada con difteria y toxoide tetánico) fue incorporándose en los diferentes países a través del denominado Programa Ampliado de Inmunizaciones que fue creado en 1974. Este Programa consiste en la acción conjunta de las naciones del mundo y de organismos internacionales, interesados en apoyar acciones tendientes a lograr coberturas universales de vacunación, con el fin de disminuir las tasas de mortalidad y morbilidad causadas por las enfermedades inmunoprevenibles con fuerte compromiso de erradicar y controlar las mismas. Las enfermedades objeto del Programa son: Poliomiелitis, Sarampión, Tétanos, Difteria, Tos Ferina (Pertussis), Tuberculosis, Rubéola y Rubéola Congénita, Fiebre Amarilla, Haemophilus Influenzae y Hepatitis B. Gracias a estas formulaciones y este programa se logró que en el 2008 alrededor del

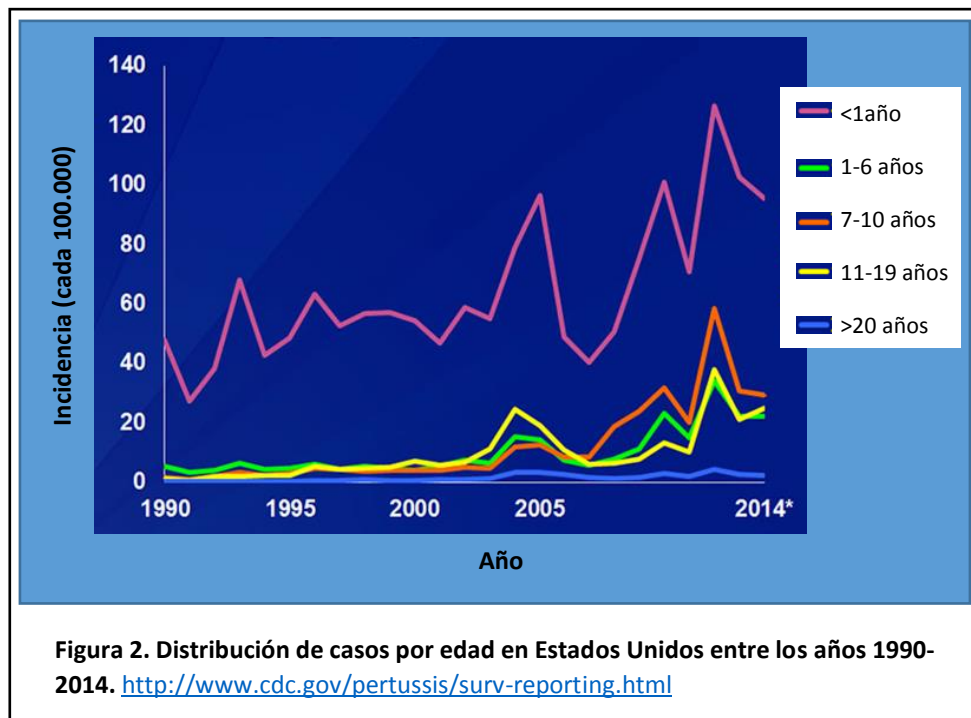
82% de todos los recién nacidos en el mundo hubieran recibido 3 dosis de la vacuna. Para ese año la OMS estimó que la vacunación mundial contra pertussis evitó alrededor de 687.000 muertes.

Esta situación auspiciosa comenzó a ensombrecerse ya que desde los años noventa se comenzó a registrar en muchos países, incluidos aquellos con alta cobertura de vacunación, un aumento sostenido de casos de *pertussis* [19-23].



Así por ejemplo en los últimos años, Estados Unidos ha experimentado el brote epidémico de coqueluche más grande de los últimos 50 años. Según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), el número de casos reportados durante el año 2012 superó los 48,277, más del doble de los registros del 2011 (18.719) y muy por encima del récord anterior de 27.550 en 2010. En 2012, la tasa de incidencia nacional era 13,4 por 100.000 con valores muy superiores en varios estados de Estados Unidos. En el año 2013, se registraron un total de 28.639 casos y en el 2014, 28660. En ambos años varios brotes fueron registrados en distintos estados. La Figura 1 fue publicada por el CDC, en la misma se muestran los estados de USA que registraron un incremento de casos en 2014 respecto al 2013 (Figura 1, <http://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting.html>).

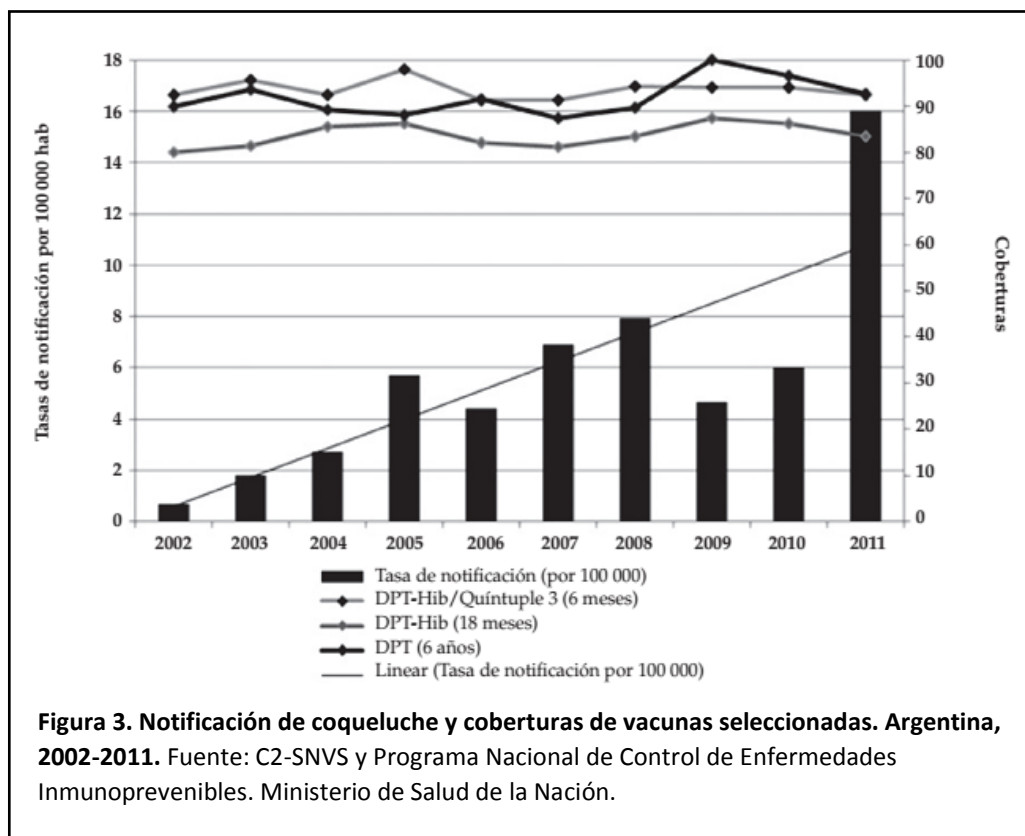
En ese país, pertussis es considerada un problema grave de salud que afecta más fuertemente a dos grupos de edades: a los menores de 5 meses y a los niños mayores de 10 años. Esta situación es diferente a lo que ocurría en la era prevacunal en donde el 93% de los casos se registraba en los niños menores de 10 años [21, 22, 24]. En la Figura 2 se muestra la distribución de casos por grupo de edad en Estados Unidos.



Además de Estados Unidos, varios son los países que han registrado esta situación, entre ellos se encuentran Australia, Bélgica, España, Alemania, Francia, Holanda, Canadá, y la Argentina [23, 25-32]. Argentina viene registrando desde el año 2003 un aumento sostenido del número de casos. Como puede observarse en la Figura 3, la mayor tasa se registró en el año 2011: 16/100.000 habitantes. En dicho año también se registró el mayor número de fallecimientos asociados a la enfermedad (76 fallecimientos) [31]. Todas las muertes ocurrieron en el grupo de menores de 1 año, excepto cinco casos que ocurrieron en el grupo de 1-4 años (3), 25 a 34 años (1) y un mayor de 75 años [31]. Entre 2002-2011, las coberturas de vacunación anti-pertussis a nivel nacional para la 3ra dosis de la serie primaria y para la correspondiente al ingreso escolar estuvieron por encima del 90 %, mientras que el refuerzo de los 18 meses presentó coberturas entre 80 y 90 % (Figura 3). El refuerzo de los 11 años, incluido en

el Calendario desde 2009, tuvo una cobertura del 54,6 % y 72,8 % en los años 2010 y 2011 respectivamente.

Las causas de esta situación epidemiológica se están debatiendo fuertemente, de forma que en base al conocimiento de las mismas se puedan dar respuestas efectivas que lleven a un mejor control de la enfermedad. La mayoría de ellas están asociadas con problemas en las vacunas como baja efectividad, corta duración de la inmunidad conferida e incapacidad para evitar la infección y transmisión, así como también la adaptación del patógeno a la inmunidad conferida por las vacunas. Todavía no se ha llegado a un consenso sobre los mismos, probablemente debido a que el peso de cada uno de ellos varía entre país y país. Más allá de la identificación de las causas es claro que se tienen que desarrollar nuevas estrategias para lograr el mejor control de la enfermedad hoy considerada resurgente.



## El patógeno y la enfermedad

El principal agente etiológico de la enfermedad es *B. pertussis*, aunque también se han descritos casos en los que el agente causal es *B. parapertussis* y más recientemente *B. holmesii*. Estas especies pertenecen al género *Bordetella* incluidas en la subclase  $\beta$  de las Proteobacterias. Las bacterias de este género son cocobacilos pequeños (0.2  $\mu\text{m}$  por 0.7-1  $\mu\text{m}$ ), gram negativos, aerobios estrictos (con excepción de *B. petrii*) con un metabolismo no fermentativo.

Actualmente el género *Bordetella* incluye diez especies: *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* (*humana*), *B. parapertussis* (*ovina*), *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. petrii* y *B. ansorpii* [33]. El rango de huéspedes susceptibles a estas especies es muy amplio (Tabla 1), siendo *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* las especies más estudiadas.

**Tabla 1. Especies del género *Bordetella***

Especie	Hospedador/Fuente	Enfermedad	Referencias
<i>B. pertussis</i>	Humano	Pertussis	(Bordet y Gengou, 1906)
<i>B. parapertussis</i> <i>hu</i>	Humano	Pertussis	
<i>B. parapertussis</i> <i>ov</i>	Oveja	Neumonía	(Eldering y Kendrick, 1938)
<i>B. bronchiseptica</i>	Varios mamíferos	Enfermedad respiratoria	(Cullinane et al., 1987; Porter et al., 1996)
<i>B. holmesii</i>	Humanos	Septicemia, tos	(Ferry, 1912)
<i>B. avium</i>	Aves	Rinotraqueitis	(Weyant et al., 1995)
<i>B. trematum</i>	Humanos	Infecciones de heridas, otitis	(Vandamme et al., 1996)
<i>B. hinzii</i>	Pollos, humanos	Infección oportunista en humanos	(Cookson et al., 1994)
<i>B. petrii</i>	Ambiental, humano	Infección oportunista	(Von Wintzingerode et al., 2001)
<i>B. ansorpii</i>	Humano	Infección oportunista	(Ko et al., 2005)

Desde el punto de vista evolutivo, se ha propuesto a *B. bronchiseptica* como el progenitor de *B. pertussis*. Por su parte, *B. pertussis* y *B. parapertussis* se consideran dos linajes separados adaptados al ser humano [34, 35].

*B. pertussis*, es un patógeno obligado del hombre aunque recientemente se ha podido evidenciar que también es capaz de infectar y desarrollar la enfermedad en monos babuinos [36, 37]. *B. pertussis* no fermenta los hidratos de carbono pero usa los aminoácidos como fuente de C, N y energía. Puede cultivarse en medios líquidos que contengan aminoácidos (ácido glutámico o prolina). De hecho en los años 70 se desarrolló un medio sintético, el medio de Stainer- Scholte, que aún se sigue usando [38]. Sin embargo, aunque *B. pertussis* no posee grandes requerimientos nutricionales, es muy difícil de cultivar debido a que es extremadamente sensible a los restos de detergente o ácidos grasos insaturados a menudo presentes en el material de laboratorio. En consecuencia, los medios sólidos que se emplean para cultivarlas contienen sangre o almidón, ya que son capaces de complejar a estos ácidos grasos.

Respecto de la enfermedad causada por este patógeno, la misma incluye un período de incubación de 9-10 días (rango 6-20 días). Luego de este período comienza la primera fase sintomática que se denomina **fase catarral**. Esta fase dura entre 1 y 2 semanas y cursa con rinorrea, lagrimeo y tos leve. Estos síntomas son similares a los de un resfrío común. En los siguientes 7 a 14 días, generalmente la tos empeora, tanto en frecuencia como en intensidad aunque la temperatura corporal es normal o ligeramente elevada. Durante este período, el agente causal *B. pertussis* puede ser aislado a partir de las secreciones nasofaríngeas de los pacientes. La siguiente fase es la denominada **fase paroxística** que tiene su inicio durante la segunda semana de la enfermedad y puede extenderse hasta 6 semanas. Se caracteriza por numerosos y rápidos paroxismos de tos, debido a la dificultad de expulsar el moco espeso del espacio broncoalveolar. Los ataques paroxísticos se producen con más frecuencia por la noche, con un promedio de 15 ataques cada 24 horas. Luego de un paroxismo, se produce un fuerte esfuerzo inspiratorio durante el cual se produce el silbido o estridor inspiratorio clásico. Además del paroxismo, pueden manifestarse síntomas como cianosis, ojos saltones, protrusión de la lengua, salivación, lagrimeo, y la distensión de las venas de cuello. Los paroxismos se asocian con mucosidad, pero la producción de esputo purulento no se produce. El vómito después de la tos es común, lo cual puede llevar a la pérdida de peso. Durante esta fase el paciente sufre un gran deterioro en su estado general de salud presentando cansancio extremo, deshidratación, pérdida del



apetito y descenso de peso. Puede presentarse con leucocitosis mayores a 100.000/mm<sup>3</sup> con prevalencia de linfocitos pero raramente fiebre. No se detecta bacteriemia.

La última etapa de la enfermedad se conoce como **convalecencia**, puede durar de 2 a 3 semanas o hasta varios meses y se caracteriza por un descenso gradual de los síntomas [39, 40].

Todo este cuadro clínico se corresponde con la presentación típica de la enfermedad. Sin embargo, existen distintos factores que lo condicionan como por ejemplo la edad del paciente, el estado de vacunación, el tratamiento con antibióticos y la coinfección con otros microorganismos [41]. Para los niños menores de 6 meses la enfermedad evoluciona generalmente a una tos cianósante, sin estridores y que habitualmente se acompaña de apneas y bradicardias profundas. La enfermedad en niños mayores, adolescentes y adultos jóvenes previamente inmunizados se presenta frecuentemente en forma atípica; los pacientes manifiestan tos persistente y prolongada (durante semanas o meses) o puede pasar completamente desapercibida. En un 13 a 20% de los adultos con tos prolongada, se ha encontrado que la causa es pertussis, frecuentemente con una duración media de la tos de 7 a 8 semanas [42, 43].

Existen ciertas complicaciones clínicas asociadas a pertussis que se dan principalmente en los niños menores a 1 año de edad, en niños no vacunados y en bebés prematuros. Entre las más frecuentes se encuentran neumonías (22%), convulsiones (3%), encefalopatía (1%) y muerte (0,3% en niños de 2 años a 6 meses y 1,3% en el primer mes de vida) [44-46].

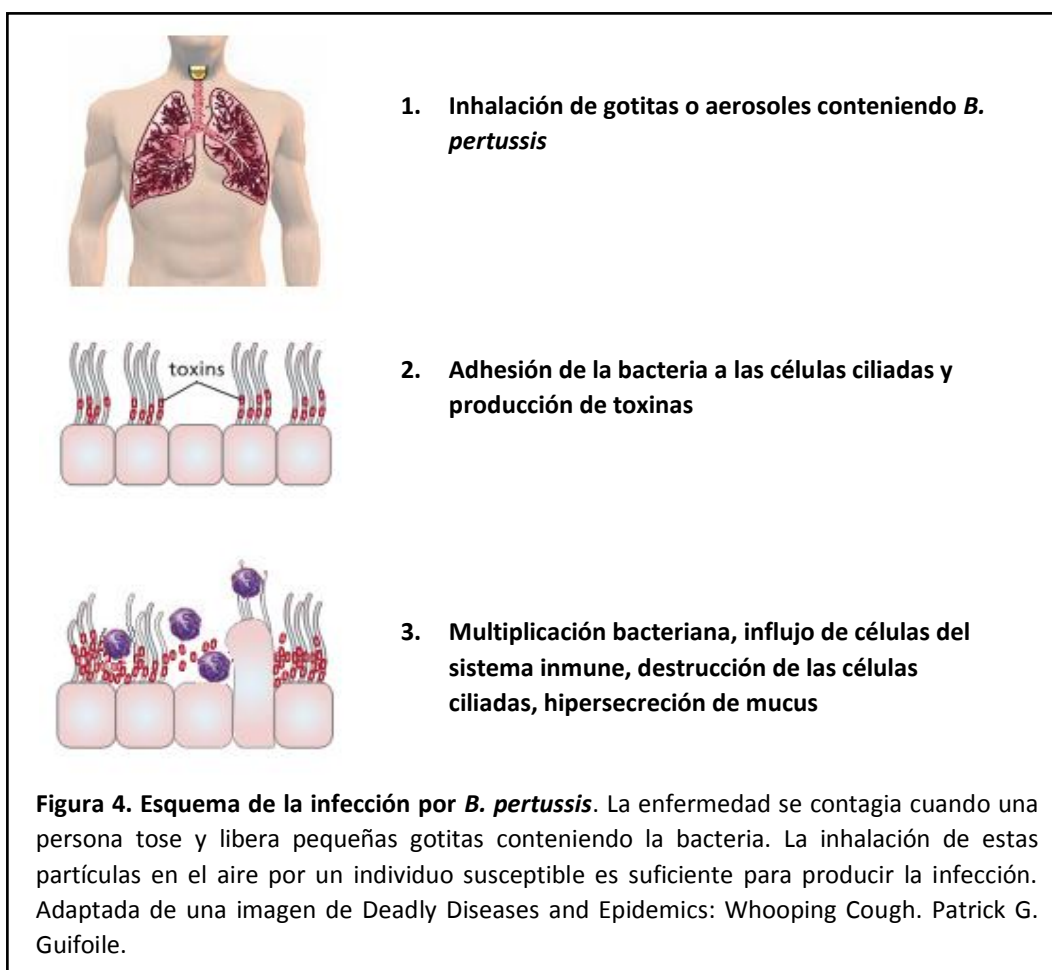
### **Interacción de *B. pertussis* con el huésped**

*B. pertussis* es un patógeno humano que es encontrado exclusivamente en el tracto respiratorio. El proceso infeccioso de esta bacteria comienza al ingresar a las vías aéreas del huésped mediante gotitas o aerosoles expelidos por un individuo infectado. Una vez dentro del mismo la bacteria se adhiere a la mucosa nasofaríngea causando una inflamación leve en la zona. *B. pertussis* muestra tropismo por el epitelio ciliado de la mucosa respiratoria aunque puede adherirse a otros tipos celulares como

los macrófagos alveolares y las células dendríticas [47]. Las bacterias adheridas proliferan y liberan una serie de toxinas causando ciliostasis, daño en el epitelio respiratorio, inducción de la liberación de mucus, inflamación en el lumen del tracto respiratorio e inhibición de funciones de células del sistema inmune del huésped (Figura 4).

La disrupción de la función normal de la mucosa ciliada y el daño del epitelio respiratorio son las patologías primarias asociada con la infección de *B. pertussis*. En los pulmones la primera lesión causada por pertussis parece ser la hiperplasia linfoide de los nódulos linfáticos peribronquiales y traqueobronquiales. Se ha reportado que pueden ocurrir incluso necrosis y descamación de las capas superficiales epiteliales de los bronquios pequeños [6].

A partir de la utilización del modelo de infección intranasal de *B. pertussis* en ratones se pudo profundizar en el conocimiento de las lesiones inducidas en el huésped [10, 48], encontrando así que *B. pertussis* causa bronconeumonía asociada a

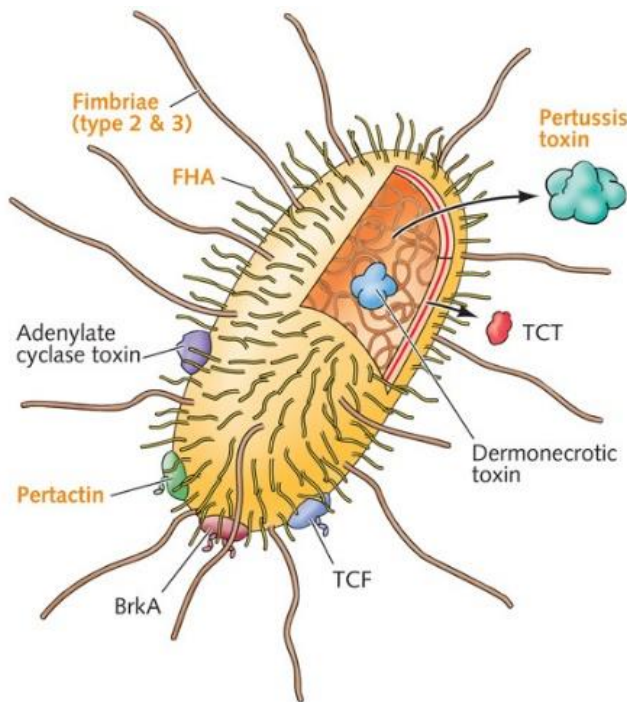


hemorragia alveolar con edema, pero sin evidencia de lesiones necróticas. A nivel del pulmón se observa inflamación perivascular y peribronquial generalizada, con gran aumento de infiltrados celulares, en su mayoría polimorfonucleares. Estas células están distribuidas en todo el pulmón. Se puede observar inflamación del parénquima pulmonar con aflujo de linfocitos, mientras que el exudado intra-alveolar está compuesto principalmente por monocitos. En la infección temprana también se ha observado una afluencia de células  $T\gamma\delta$  en pulmones de ratones así como un rápido reclutamiento de células dendríticas. En animales inmunizados el curso de la infección es menos prolongado y el influjo de células es más transitorio [49].

Para el desarrollo de las distintas etapas de infección la bacteria requiere de una serie de factores de virulencia, mucho de los cuales ya han sido identificados y caracterizados. A continuación se describen los aspectos más sobresalientes de cada uno de ellos (Figura 5). La descripción respecto de la estructura y funciones del lipopolisacárido de *B. pertussis* será analizada con más detalle por ser el agonista TLR-4 utilizado en el marco del presente trabajo de Tesis.

**Fimbria (Fim).** Son estructuras filamentosas de naturaleza proteica que se extienden de la superficie bacteriana y participan en la adhesión de este patógeno a las células epiteliales promoviendo la colonización a nivel de pulmón [5].

**Hemaglutinina filamentosa (FHA).** Participa en la adhesión a las células del huésped, así como en la formación de microcolonias y biofilms. FHA ha sido involucrada en la modulación de la respuesta inmune [10].



**Toxina pertussis (PTX).** Responsable de la mayor parte de los síntomas presentes en la tos convulsa. Su acción es clave en los estadios tempranos de la infección donde actúa sobre las células residentes del pulmón, incluidos los macrófagos alveolares, disminuyendo la producción de quimioattractantes de neutrófilos en respuesta a la infección [8, 9].

**Toxina citotraqueal (TCT).** Esta toxina es la responsable de la citopatología del epitelio respiratorio durante la infección por *Bordetella*, causando ciliostasis y tos persistente

**Toxina dermonecrótica (TDN).** Es una toxina citoplasmática que induce lesiones necróticas localizadas en ratones de laboratorio cuando es inyectada en forma intradérmica. Su rol en la patogénesis de la enfermedad es poco claro.

**Factor de colonización traqueal (TCF).** Es una proteína autotransportadora expresada únicamente por *B. pertussis* que contribuye a la adhesión y colonización bacteriana.

**Adenilato ciclasa-Hemolisina (AC-Hly).** Esta proteína posee un dominio con actividad adenilato ciclasa, responsable de los principales efectos citotóxicos, y un segundo dominio con actividad hemolisina que media la translocación de esta toxina a la célula blanco [4-7].

**Pertactina (Prn).** Es una proteína presente en la membrana externa de *B. pertussis* que participa en el proceso de adhesión de las bacterias al huésped, en particular a los monocitos y estaría implicada en las etapas tempranas de la infección [5].

**BrkA (*Bordetella* resistance to killing).** Implicada en la resistencia de *B. pertussis* a la lisis por la vía clásica del complemento, y contribuye en la adhesión a las células del hospedador [3].

**Figura 5. Adhesinas y toxinas de *B. pertussis***

(<http://www.museumofhealthcare.ca/explore/exhibits/vaccinations/pertussis.html>)

**Lipopolisacárido (LPS).** El LPS constituye el componente estructural mayoritario de las membranas externas de las bacterias Gram negativas. Es una molécula anfifílica formada por el lípido A, a través del cual se inserta en la membrana, un core o núcleo de naturaleza oligosacáridica y un extremo distal constituido por un polisacárido lineal denominado antígeno O [5, 6]. *B. pertussis* a diferencia de otras bacterias Gram negativas no presenta antígeno O, en su lugar presenta un trisacárido formado por N-acetil-N-metil-fucosamina (FucNAcMe), ácido 2,3-dideoxi-di-Nacetilmanosaminurónico (2,2-deNAcManA) y N-acetilglucosamina (GlaNAc). Cuando se somete el LPS de *B. pertussis* a corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida el perfil presenta dos bandas características de la especie: una banda denominada B, de mayor movilidad, compuesta por el lípido A y el core interno; y una banda de menor movilidad denominada banda A que corresponde a los componentes de la banda B más el trisacárido.

El LPS de *B. pertussis* al igual que otras endotoxinas es pirogénico, mitogénico, tóxico y puede activar e inducir la producción de factor de necrosis tumoral en macrófagos [50, 51]. Estudios con ratones defectivos en TLR-4 sugieren que la señalización del LPS mediada a través de los receptores es necesaria para inducir una respuesta innata robusta y generar una respuesta protectora contra *B. pertussis* en el modelo murino [52]. En los ratones defectivos en TLR-4, la colonización bacteriana en los pulmones fue mayor a la observada en los ratones salvajes, y con un mayor aumento de infiltrado celular y de patología pulmonar [53]. Recientemente, nuestro grupo de investigación encontró que la estimulación exacerbada de la respuesta inmune innata en los pulmones por el LPS confiere un alto nivel de protección frente al desafío con dosis altas de *B. pertussis* [17]. La participación de TLR-4 también ha sido establecida en el marco de protocolos de inmunización en donde la funcionalidad de este receptor condiciona el desarrollo de una respuesta adaptativa protectora frente a la infección por *B. pertussis* en el modelo murino de infección intranasal [54-56]. Algunos estudios clínicos también revelan la participación de este receptor en el desarrollo de la respuesta inmune frente a la inmunización con la vacuna celular. Aunque estos trabajos han señalado la participación de TLR-4 en la defensa del huésped ninguno ha analizado acabadamente cuál es su contribución. En este sentido,

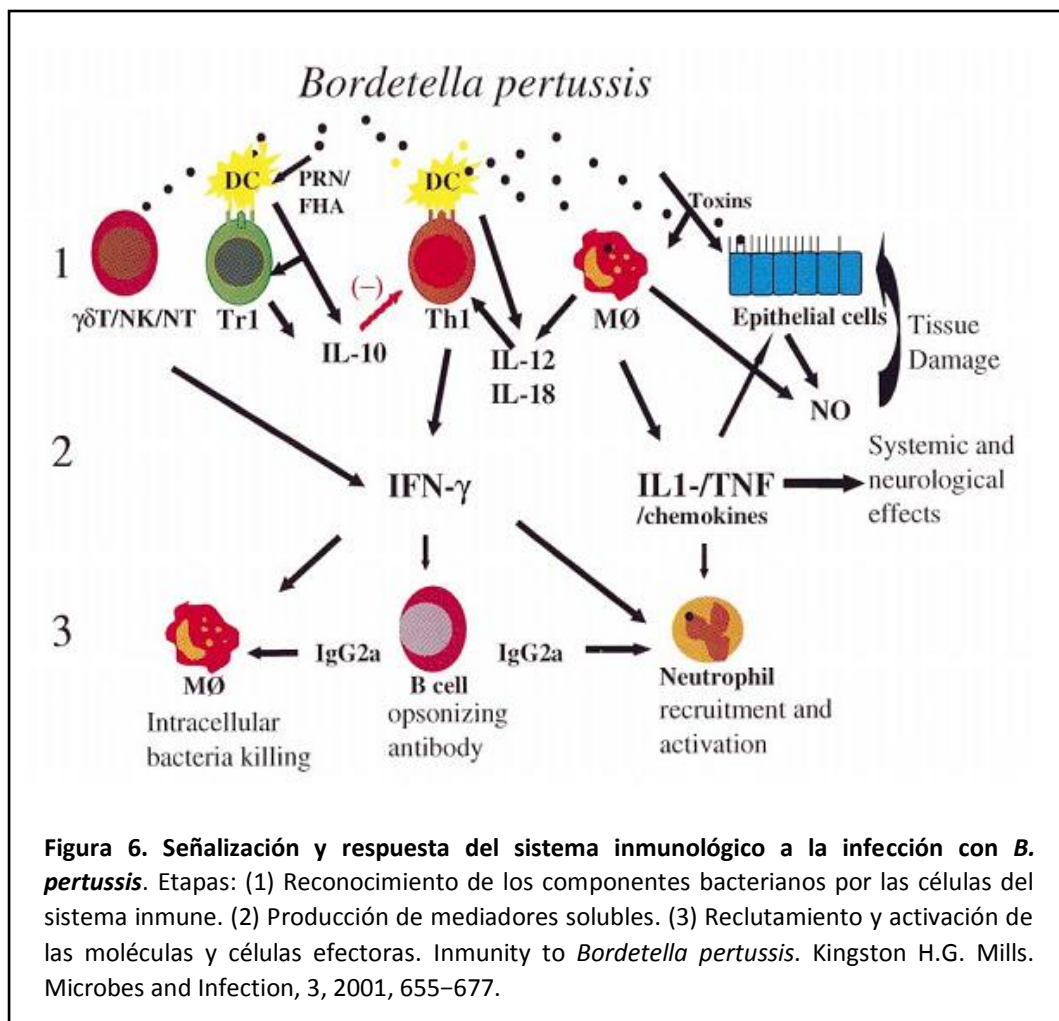
el conocimiento sobre los mecanismos que son desencadenados por su activación y cuáles de ellos son necesarios y/o suficientes para el establecimiento de la respuesta protectora aún es escaso. El estudio de tales aspectos resulta de interés ya que permitiría entender mejor los mecanismos de control contra este patógeno.

### **Respuesta inmune frente a *B. pertussis***

La complejidad de la infección por *B. pertussis* se condice con que no exista un único perfil de respuesta relevante sino que diversos mecanismos inmunológicos son capaces de brindar protección contra la enfermedad [57-61]. A diferencia de lo que ocurre frente a otros patógenos, en *B. pertussis* no existe un antígeno dominante sino que la respuesta a distintos antígenos y factores de virulencia de la bacteria parecen tener una contribución, existiendo cierto grado de redundancia entre los mismos. La infección por *B. pertussis* en los humanos desencadena una respuesta humoral y celular (Figura 6). Los primeros mecanismos de la respuesta inmune parecieran tener lugar mediante la activación de los receptores de tipo Toll 4 (TLR-4) y la vía alternativa del complemento [8, 52, 53]. La exposición al LPS y otros productos bacterianos promueve la expresión de IL-12 e IL-23 por las células dendríticas centinelas y macrófagos en las primeras horas después de la infección. En la infección, la toxina pertussis y la adenilato ciclasa presentes en *B. pertussis* parecieran aumentar, preferencialmente, la producción de IL-23 pero no de IL-12 [8, 62].

Cuando *B. pertussis* ingresa al tracto respiratorio se une a las células ciliadas del epitelio pero también es reconocida y capturada por células de la respuesta inmune innata como macrófagos, células dendríticas (DC), células T $\gamma\delta$ , células Natural Killer (NK) y células T naturales (NT). Las células dendríticas se encargan de procesar y presentar los antígenos bacterianos a las células T [10]. Mientras que la producción de IL-12 y IL-18 por las células de la respuesta innata polarizan hacia una respuesta del tipo Th1 (caracterizada por la secreción de INF- $\gamma$ ), la producción de IL-23 polarizaría la respuesta hacia la generación de una población de células Th17 (caracterizada por la producción de IL-17). Esta respuesta rápida de IL-17 por las células T residentes (T $\gamma\delta$  y NK) promueve la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ )

que reclutan neutrófilos al sitio de infección, controlando inicialmente la misma [63]. La respuesta Th1 sería suprimida en los estadios tempranos de la infección debido a los efectos de la secreción de IL-10 por las células T regulatorias (Tr o Treg) estimuladas por antígenos o macrófagos y las células dendríticas estimuladas por FHA. La señalización vía LPS/TLR-4, en sinergia con la acción enzimática de AC-Hly, parecen mediar la producción de IL-10 e IL-23 generando una polarización hacia la respuesta Th17 [8].



El NO y las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 y TNF- $\alpha$  inducidas por las toxinas de *B. pertussis*, especialmente LPS, TCT y PTx, además de contribuir a la eliminación bacteriana también median la patología local en el pulmón y son responsables de muchas de las consecuencias sistémicas y neurológicas de la infección. El IFN- $\gamma$  secretado por células de la respuesta innata en la infección temprana y más

tardíamente por células Th1, estimula el reclutamiento y la activación de macrófagos y neutrófilos y provee ayuda a las células B a secretar anticuerpos opsonizantes y fijadores del complemento (IgG2a en ratones). Las células Th2 también activarían la expansión clonal de células B. Las bacterias, opsonizadas o no opsonizadas, son internalizadas por neutrófilos y macrófagos y eliminadas por NO o especies reactivas a oxígeno [10]. La opsonización de la bacteria produce la activación de la vía clásica del complemento. Los neutrófilos expresan receptores que reconocen las bacterias marcadas por el complemento así como receptores que reconocen las regiones Fc de los anticuerpos unidos a los antígenos bacterianos. Ambos mecanismos resultan en la activación de neutrófilos que, en el contexto de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, atraen más fagocitos al sitio de infección. Éstos son activados y eliminan las bacterias unidas a anticuerpos. Se ha sugerido que las células Th2 controlarían también la secreción de IgA la cual es detectada en pulmones de ratones infectados previo a la detección de IgG en suero. Se ha sugerido que esta inmunoglobulina podría tener un rol en la eliminación de la infección primaria [61, 64, 65].

### **Vacunas contra pertussis**

La principal medida de prevención para la tos convulsa es la vacunación. Actualmente existen dos tipos de vacunas de uso regular, las vacunas celulares (wP) y las vacunas acelulares (aP).

Las vacunas celulares consistentes en una suspensión del agente causal muerto por calor y detoxificada fueron las primeras que se desarrollaron luego que Jules Bordet y Octave Gengou lograran en 1906 identificar a *B. pertussis* como agente causal de la enfermedad [66]. Las primeras evidencias de éxito con esta vacuna fueron obtenidas por el investigador danés Madsen durante un brote en la Islas Faroe, pertenecientes en ese momento al reino de Dinamarca (1923-1924). Pero fue durante los años 1930 que dos investigadoras Pearl Kendrick y Grace Elderling llevaron adelante varios ensayos clínicos rigurosamente diseñados, en los que establecieron los niveles de protección de las vacunas por ellas mismas desarrolladas. Estas vacunas estaban formuladas en base a una mezcla de cepas locales recientemente aisladas



[67]. Los resultados alcanzados con esta formulación fueron satisfactorios, y así para los años 1950 muchos países centrales adoptaron estas vacunas en una formulación vacunal que combinaba antígenos de difteria, tétanos y pertussis (DTP). En los lugares en que se aplicaron la incidencia de la enfermedad bajó en forma contundente y por ello su uso se extendió a nivel mundial.

A medida que el número de casos fue disminuyendo se hizo más notoria la preocupación por las reacciones adversas asociadas quizás sin mucho sustento a la vacunación. Los reportes sobre reacciones adversas describían desde fiebre, llanto persistente e irritabilidad hasta shock hipotónico, convulsiones, encefalitis y complicaciones neurológicas [88]. Aunque la vacunación luego se desestimó como causa de las reacciones más graves, las vacunas celulares quedaron fuertemente cuestionadas. De hecho varios países como Japón dejaron de utilizarlas con el consecuente aumento de casos. Esto motivó a nuevos desarrollos que llevaron a una nueva generación de vacunas que a diferencia de las anteriores sólo estaban constituidas por componentes proteicos purificados derivados de *B. pertussis*. Este tipo de vacunas, llamadas vacunas acelulares, son las que se usan actualmente en la mayoría de los países centrales para cubrir las dosis primarias, y en algunos países para los refuerzos en la población mayor de 7 años.

La primera vacuna acelular fue licenciada en Japón en 1981, luego otras formulaciones constituidas por más factores de virulencia fueron licenciadas en los siguientes años. En el año 2005 se licenciaron 2 nuevas formulaciones acelulares que contenían los mismos constituyentes que las anteriores pero en menor dosis para poder ser empleada en la población mayor de 7 años [24]. Actualmente existen vacunas acelulares (aP) de diferente composición en función del número de antígenos y la cantidad de los mismos que tienen. Así encontramos vacunas monovalentes que contienen solamente la toxina pertussis, bivalentes compuestas por PTX y FHA, trivalentes compuestas por PTX, FHA y pertactina y pentavalentes: PTX, FHA, PRN, fimbrias FIM2 y FIM3 [22, 68, 69]. Todas estas vacunas contienen la toxina pertussis, en algunos casos modificada genéticamente y en otros detoxificada por tratamiento químico.

En la actualidad no existe a nivel mundial un consenso respecto de que tipo de vacuna utilizar, ni que esquema de vacunación debe seguirse, así hay países que sólo emplean en sus Calendarios Nacionales de Vacunación vacunas celulares, otros que emplean en las primeras dosis vacunas celulares y luego realizan refuerzos con vacunas acelulares y otros usan vacunas acelulares en todo el esquema de vacunación. Aunque no existe consenso sobre cuál de las formulación es conveniente emplear, sí parecería que las formulaciones acelulares en las dosis primarias no serían convenientes ya que la duración de la inmunidad por ellas ejercidas es menor que las acelulares [70, 71]. La situación epidemiológica que hemos descripto al comienzo de este trabajo de tesis ha llevado a cuestionar fuertemente a las dos vacunas en uso. De hecho existe un consenso sobre la necesidad de una tercera generación de vacunas contra pertussis que supla las debilidades de las anteriores, mayor protección, menor reactogenicidad y mayor duración de la inmunidad conferida son las propiedades buscadas. Hasta tanto se alcance este nuevo desarrollo se deberá intentar hacer un uso más efectivo de las formulaciones actuales. De hecho diferentes organismos internacionales y nacionales han recomendado y ya están aplicando diferentes medidas que incluyen la incorporación de más refuerzos como la vacunación a los 11 años [72, 73]. También se han presentado otras alternativas, tales como la vacunación del personal de salud en contacto con niños y la vacunación selectiva de madres y parientes cercanos de los neonatos, la que parece ser una estrategia relevante para limitar la transmisión de la patología de adultos a niños [74, 75]. En nuestro país incluso se ha incorporado como estrategia la vacunación de las mujeres embarazadas.

Si bien la modificación de los planes de vacunación en ciertas regiones podría resultar beneficiosa, esto sólo parece ser una alternativa razonable a corto plazo. Por un lado, la introducción de múltiples dosis de refuerzo complejiza el diseño, la implementación y aplicabilidad de planes de vacunación destinados a la población general. Por otro lado, si bien las vacunas actuales han sido efectivas para disminuir la mortalidad infantil en relación a la era pre-vacunal los datos presentados señalan que no son lo suficientemente adecuadas para controlar la situación epidemiológica actual. Al respecto podemos recordar que aún en casos de coberturas poblacionales cercanas al 96% las vacunas actuales no han controlado de manera significativa la circulación de

*B. pertussis* en la población, manteniéndose los ciclos epidémicos cada 3-5 años. Por otra parte, la eficacia de estas formulaciones está siendo más limitada por la adaptación del patógeno y la aparición de cepas divergentes a las usadas en la producción de vacunas [76, 77].

Frente a esta situación, el desarrollo de nuevas formulaciones vacunales o el mejoramiento de las existentes resultan de gran interés. Entre otros el diseño de vacunas efectivas frente a *B. pertussis* requiere de la profundización en el conocimiento de la biología de la infección siendo fundamental el entendimiento no sólo de los mecanismos de patogenia, sino también de los mecanismos inmunológicos involucrados en la defensa del huésped y la resolución de la infección. En este sentido *B. pertussis* es un patógeno complejo con una gran capacidad inmunomoduladora y varios aspectos mencionados continúan en la actualidad sin ser comprendidos. El estudio de las vías involucradas en el reconocimiento del patógeno y su impacto en el establecimiento de la defensa del huésped es de sumo interés para el diseño racional de nuevas formulaciones vacunales pudiendo facilitar significativamente el desarrollo de las mismas.

### **Fenómeno StIR como escenario útil para el desarrollo de nuevas estrategias de control**

En la búsqueda de nuevas estrategias posibles para combatir infecciones respiratorias, recientemente se han reportado resultados interesantes respecto del efecto que tiene sobre los procesos infecciosos la estimulación inespecífica de la respuesta inmune innata. Mediante ensayos *in vivo* utilizando el modelo murino se ha puesto de manifiesto que la estimulación de la inmunidad innata local con agonistas de los receptores para PAMP (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) consigue evitar el progreso de infecciones letales producidas por hongos, virus y bacterias.

Los primeros reportes sobre este fenómeno, conocido como StIR (por su nombre en inglés, Stimulated Innate Resistance), fueron publicados en el marco de infecciones pulmonares producidas por *Streptococcus pneumoniae*, en las cuales pudieron evidenciar que como consecuencia de la estimulación de la mucosa respiratoria con

una mezcla compleja de agonistas Toll (utilizando un lisado de *Haemophilus influenzae* no tipificable (NTHi)) se lograba evitar la muerte de los animales infectados. En el marco de las infecciones por este patógeno se comenzó a caracterizar el fenómeno pudiendo evidenciar que la respuesta desencadenada frente al tratamiento con el lisado bacteriano era máxima luego de 4h, pero que sus efectos sobre la colonización bacteriana se extendían hasta por 48h. Interesantemente, el fenómeno StIR desencadenado en respuesta al tratamiento con NTHi no sólo confería protección frente a las infecciones producidas por *S. pneumoniae*, sino que también lo hacía frente otros patógenos bacterianos tales como *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *B. anthracis*, *Y. pestis* y *F. tularensis* [78-82].

En el marco del trabajo de nuestro laboratorio, pudimos poner de manifiesto la ocurrencia del fenómeno StIR en el marco de la infección por *B. pertussis* [17]. Para la evaluación del fenómeno StIR fueron ensayados diferentes agonistas TLR purificados: Poly IC para TLR-3, LPS para TLR-4 y flagelina para TLR-5. Mediante estos ensayos se logró, no sólo evidenciar el fenómeno en el marco de nuestro patógeno, sino que además pudo identificarse como responsable del mismo al lipopolisacárido purificado. Los resultados obtenidos concuerdan con lo publicado en bibliografía respecto del rol que tiene la vía de reconocimiento TLR-4 en la protección contra *B. pertussis* [52-54, 56, 83, 84].

El fenómeno StIR desencadenado por la estimulación de la vía TLR-4 se presenta como un modelo muy interesante de estudio en animales donde la infección por *B. pertussis* puede ser controlada completamente. Es destacable la magnitud de este efecto, eliminando completamente de vías aéreas un inóculo de  $1 \times 10^7$  de UFC en pocas horas, evidenciando una alta capacidad de inducción de efectores bactericidas. Esto contrasta con lo que ocurre con las formulaciones vacunales actuales, las cuales evitan los síntomas graves de la enfermedad, pero no logran impedir la colonización bacteriana.

De esta manera, el conocimiento acerca de los mecanismos de la inmunidad innata que son desencadenados en respuesta al LPS resultan de interés para identificar efectores bactericidas que puedan ser considerados como efectores a estimular en el

diseño de estrategias profilácticas y terapéuticas que permitan mejorar el control de pertussis en la población.

Antes de comenzar con la exposición de los resultados obtenidos en el marco de este trabajo de Tesis presentaremos a continuación un apartado detallando los mecanismos antimicrobianos descritos a nivel de pulmón y las vías aéreas que serán de utilidad para una mejor comprensión de los resultados presentados en los capítulos siguientes.

### **Mecanismos antimicrobianos de la mucosa respiratoria**

En respuesta al reconocimiento de las bacterias por las células epiteliales se induce la producción de quimoquinas y citoquinas que reclutan y activan células fagocíticas al sitio de infección que median la eliminación de los patógenos. Los principales receptores que median esta respuesta son los receptores de tipo Toll (TLRs).

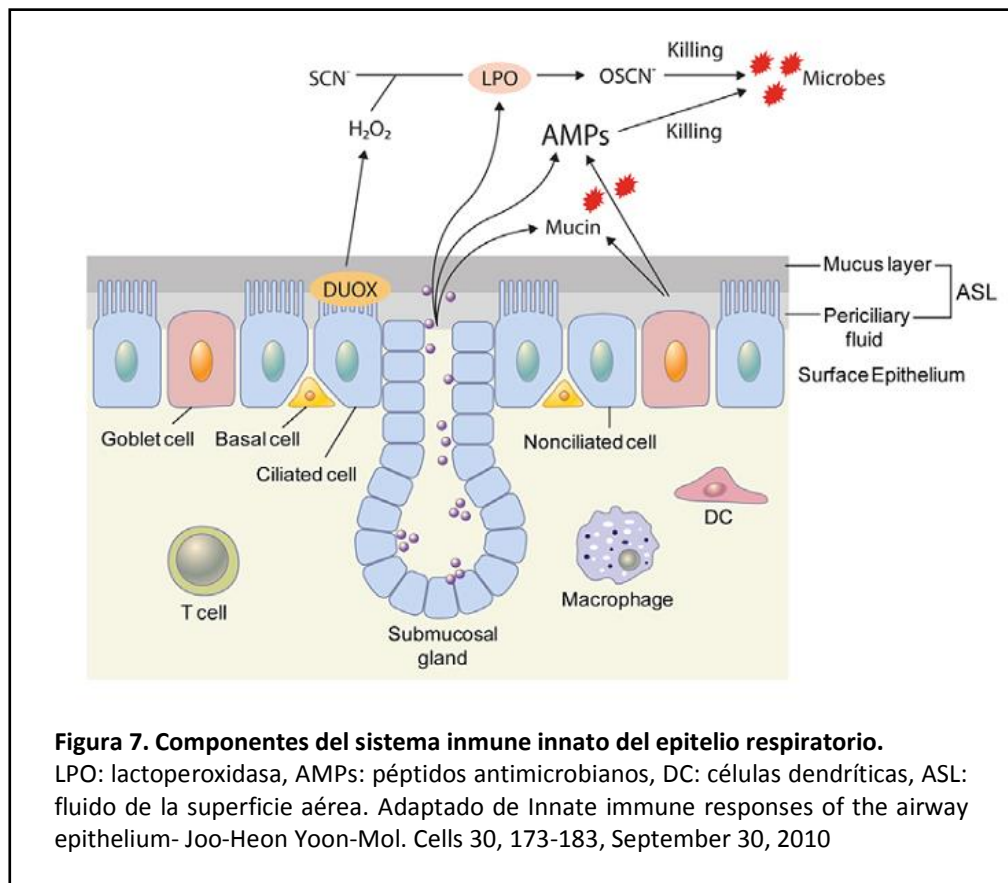
El epitelio respiratorio cuenta con una serie de efectores antimicrobianos que le permiten ejercer su acción en el control de las infecciones respiratorias (Figura 7). Entre ellos se encuentran la producción de glicoproteínas que forman el mucus protector, la secreción de péptidos y proteínas antimicrobianas y producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).

La presencia de mucus en la superficie del epitelio respiratorio evita el desecamiento de las células, la acumulación de partículas endógenas y exógenas y la invasión por patógenos. En respuesta a la estimulación por microorganismos, citoquinas inflamatorias y toxinas ambientales el epitelio respiratorio aumenta la producción de mucina. Se ha demostrado que diversos patógenos como *S. aureus*, *P. aereginosa*, *S. pneumoniae*, NTHi y *M. pneumoniae* inducen la expresión de genes de mucinas por activación de la vía de señalización NF- $\kappa$ B [85-89].

Además de la producción de las mucinas, las células epiteliales y las glándulas submucosas secretan péptidos antimicrobianos (AMPs) y proteínas a la superficie de las vías respiratorias. Estas secreciones ejercen su acción tanto frente a bacterias como

virus y hongos. Su mecanismo de acción tiene lugar mediante la disrupción de las paredes celulares, el secuestro de hierro y nutrientes, evitando además la adhesión de los patógenos [90-92].

El epitelio respiratorio humano expresa dos tipos de AMPs: la defensinas y las catelicinas. Ha sido reportado que las células epiteliales y los neutrófilos en respuesta a infecciones bacterianas y virales incrementan la expresión de  $\beta$ -defensinas, mediando



la protección frente a hongos y el virus de la influenza [93, 94]. Entre las proteínas antimicrobianas de mayor tamaño encontramos a la Lisozima que es secretada por las células epiteliales y las glándulas submucosas y ejerce su acción sobre las bacterias Gram positivas mediante la hidrólisis del enlace glicosídico del péptidoglicano de la pared celular [95]. También encontramos a la Lactoferrina que actúa indirectamente secuestrando el hierro y de forma directa sobre el patógeno produciendo su muerte [95] y a las Colectinas o lectinas de tipo-C (Sp-A y Sp-D) que se unen a secuencias de carbohidratos muy conservadas en los patógenos respiratorios, produciendo la muerte por opsonofagocitosis [96].

El epitelio respiratorio produce cantidades significativas de ROS, los cuales pueden ser detectados tanto en cultivos celulares como en el aire espirado de individuos sanos [97]. La principal fuente de los ROS son las Oxidasas DUOX1 y DUOX2 y la familia de las NADPH oxidas que se encuentran en las células epiteliales. Las enzimas del complejo DUOX se expresan principalmente en la cara apical de las células ciliadas del epitelio respiratorio [98], no así en las células no ciliadas o en las células basales [97]. Estudios recientes se han enfocado en la función antimicrobiana de los ROS generados por el sistema DUOX en las vías aéreas. Se ha visto que en respuesta a infecciones bacterianas se activa el complejo DUOX y secreta  $H_2O_2$  al lumen donde la lactoperoxidasa (LPO), expresada y secretada por las células calciformes y las glándulas submucosas, lo combina con  $SCN^-$  para convertirlo en el agente bactericida  $OSCN^-$ , conduciendo a la muerte bacteriana [99].





# RESULTADOS



## RESULTADOS

Caracterización *in vivo*  
del fenómeno StIR en el  
marco de la infección por  
*Bordetella pertussis*



## RESULTADOS

Caracterización *in vivo* del fenómeno StIR en el marco de la infección por *Bordetella pertussis*

Inducción de la  
eliminación de *Bordetella  
pertussis* del huésped  
mediada por el LPS:  
definición de condiciones  
experimentales



## INTRODUCCIÓN

Como hemos detallado a lo largo de la introducción de este trabajo de Tesis, desde hace más de 20 años se viene registrando un aumento sostenido del número de casos de coqueluche en varios países incluidos aquellos con altas coberturas de vacunación. Diferentes causas se han esgrimido para explicar el resurgimiento de esta enfermedad inmunoprevenible. Entre ellas la baja efectividad de las vacunas en uso, la pérdida de inmunidad inducida por ellas, y la adaptación de agente causal a la inmunidad inducida por las vacunas. El peso de cada uno de estos factores, aunque no necesariamente el mismo en todas las regiones, se está debatiendo intensamente. Independientemente de cual sea el factor primordial que determina esta situación epidemiológica es claro que se requieren nuevas estrategias y nuevas formulaciones vacunales que permitan mejorar el control de la enfermedad. Para el diseño de nuevas vacunas resulta clave realizar acciones que permitan profundizar el conocimiento sobre el patógeno, la infección, la interacción patógeno-huésped y los mecanismos inmunológicos involucrados en la protección contra el mismo, entre otros. Respecto a estos últimos existen evidencias que indican que tanto la inmunidad humoral como la celular son importantes al momento de combatir la enfermedad [58, 59, 65, 100-102], pero los factores determinantes de la eliminación de *B. pertussis* del tracto respiratorio aún son poco conocidos. De manera interesante, en nuestro laboratorio hemos logrado identificar un escenario de eliminación de *B. pertussis in vivo* que se presenta como muy atractivo para avanzar en aquel conocimiento. Específicamente hemos podido identificar el fenómeno conocido como estimulación de la respuesta innata (StIR), en el cual la infección por *B. pertussis* se ve severamente perturbada como consecuencia de la estimulación exacerbada del sistema inmune [17]. El fenómeno StIR fue descrito primariamente para otras infecciones pulmonares como la gripe A, *Streptococcus pneumoniae* y *Aspergillus niger* [78, 79, 81]. El mismo consiste en un aumento inespecífico de la respuesta innata de las vías respiratorias que evita el progreso de dichas infecciones. Evans y colaboradores, utilizando el modelo murino de infección, observaron que la administración por vía intranasal de un lisado de *Haemophilus influenzae* (NTHi) induce una respuesta inmune capaz de proteger frente a un inóculo *Streptococcus pneumoniae* que de otro modo resultaría letal.

En nuestro laboratorio pudimos detectar que el fenómeno StIR puede ser desencadenado en *B. pertussis* a través de la administración de lipopolisacárido (LPS) purificado [17]. Los resultados alcanzados mostraron que el fenómeno StIR para *B. pertussis* puede desencadenarse con LPS de diferentes microorganismos incluso con aquellos que no están involucrados en la colonización de huéspedes animales. Más aún, el tratamiento con flagelina o con otros PAMPs distintos al LPS tales como poli I:C no resultaron ser capaces de inducir este fenómeno en *B. pertussis*. Experimentos realizados en cepas de ratones defectivos en la señalización vía TLR-4 (cepa C3H/HeJ) y en consecuencia hiporrespondedores a LPS, permitieron confirmar que la respuesta TLR4-dependiente es el principal responsable del fenómeno StIR observado en *B. pertussis*. El fenómeno de StIR ha sido descrito para otros microorganismos, en general empleando una mezcla compleja de agonistas de la inmunidad como estímulo. En el caso de *B. pertussis* basta con la administración de un agonista TLR-4 purificado para inducir una respuesta suficiente para evitar el progreso de la infección.

En el marco de mi trabajo de Tesis nos hemos propuesto caracterizar molecularmente el fenómeno StIR en el marco de la infección por *B. pertussis*. Para ello primeramente trabajamos en la puesta a punto de las condiciones experimentales que nos permitan evidenciar clara y oportunamente el fenómeno StIR. Como hemos mencionado los experimentos que nos permitieron identificar la presencia de StIR y los que describiré en esta sección de este trabajo de Tesis se realizaron empleando el modelo de infección en ratones. Antes de avanzar específicamente en la metodología y los resultados de estos experimentos, nos parece oportuno hacer una breve reseña sobre el modelo animal de infección de *B. pertussis* utilizado.

Aunque el hombre es el único huésped natural de *B. pertussis*, se ha realizado una búsqueda intensa de un modelo animal que permita reproducir la enfermedad. Así se ha trabajado en conejos, cerdos, perros, monos, ratas y ratones [103]. De todos ellos, el modelo murino ha sido y es el más ampliamente empleado no sólo por la simplicidad sino a que en este modelo se logran visualizar características de la infección de *B. pertussis* en humanos: alta susceptibilidad a la infección en recién nacidos respecto a los adultos, períodos similares de infección pulmonar y manifestaciones clínicas tales como hipoglucemia, leucocitosis y sensibilización a la histamina [58, 103].



Más aún, al igual que en el hombre la respuesta pato-fisiológica en ratones depende de la edad y de la dosis de *B. pertussis* utilizada en la infección [5, 6, 10, 104].

Dada todas estas características y la experiencia de nuestro laboratorio, para este trabajo de Tesis hemos decidido emplear el modelo de infección intranasal en ratones [58]. A continuación se describen los resultados alcanzados.

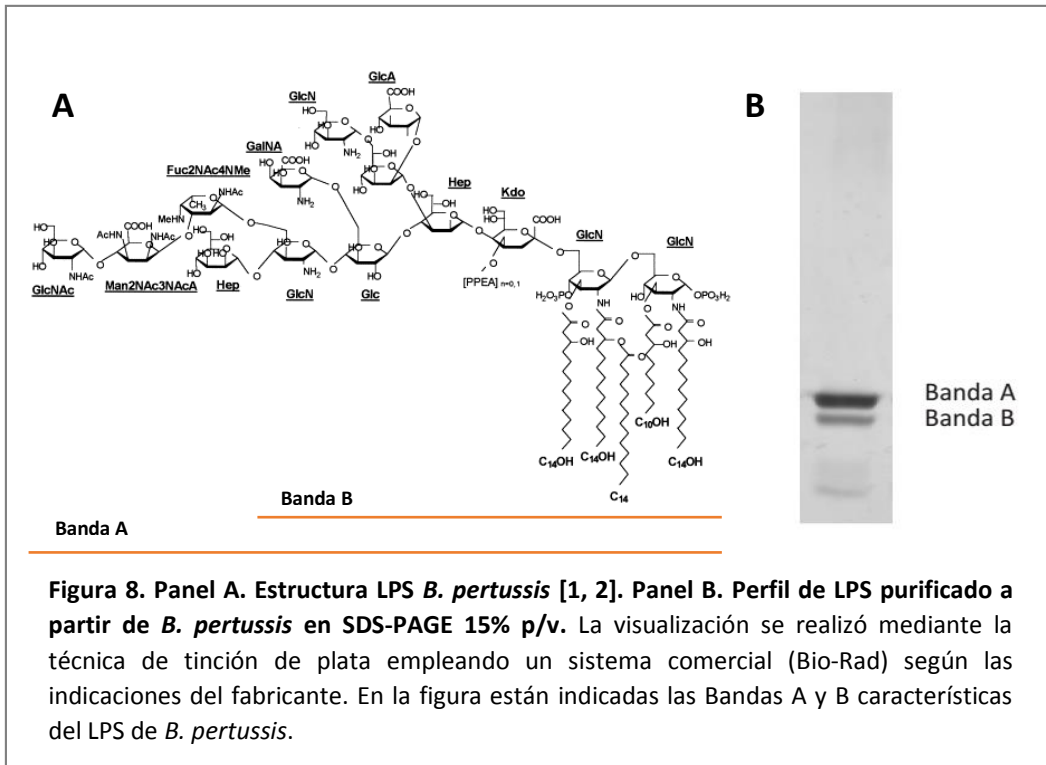
## **RESULTADOS**

### **Ensayo dosis-respuesta**

Para avanzar en la caracterización del fenómeno StIR en *B. pertussis* primeramente decidimos buscar las condiciones más adecuadas para su estudio. Para ello y teniendo en cuenta los resultados previos decidimos trabajar con el LPS purificado de *B. pertussis* como estímulo para el fenómeno StIR. El LPS utilizado fue purificado a partir de cultivos líquidos de *B. pertussis* empleando metodologías ya puestas a punto en el laboratorio.

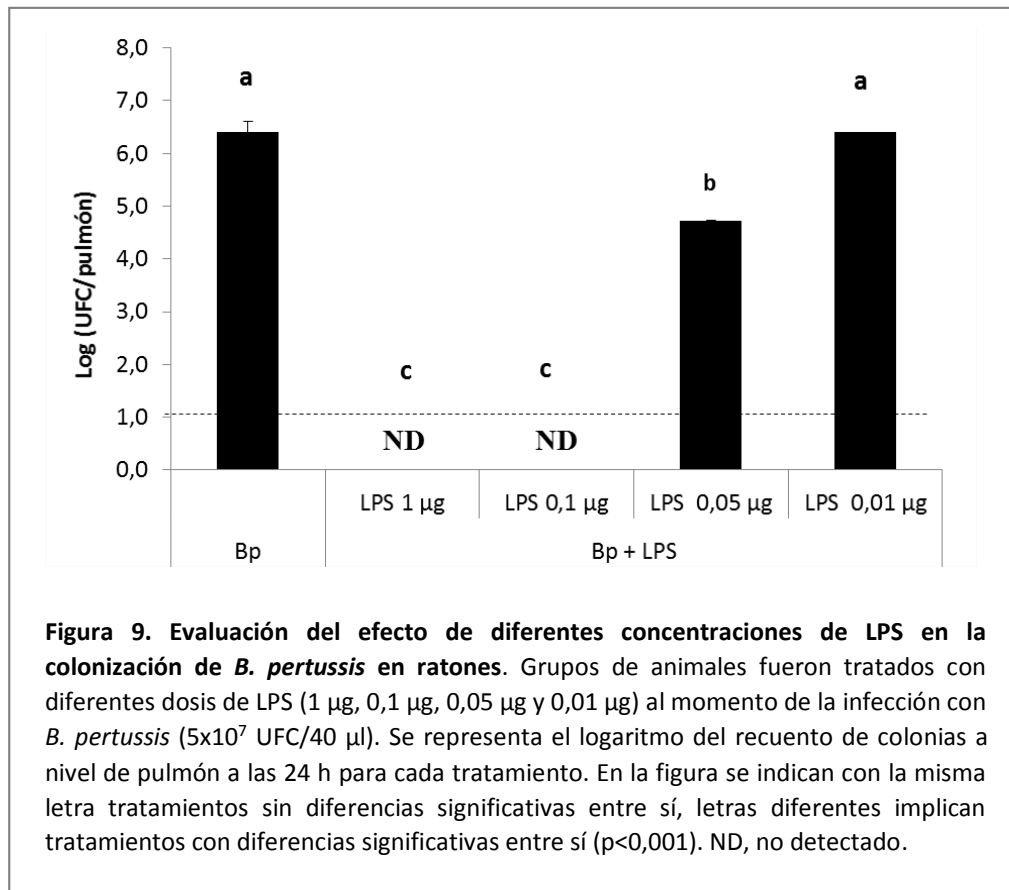
En la figura 8 se muestra el perfil electroforético obtenido para una de las preparaciones del LPS purificado. Como puede observarse en la Figura 8-B, el perfil está representado, como es esperado, por dos bandas que se denominan A y B respectivamente [105]. La banda denominada B, de mayor movilidad se corresponde a la estructura que contiene al lípido A y a un núcleo sacarídico interno. La banda A de menor movilidad corresponde a la estructura descrita para la banda B más un trisacárido formado por N-acetil-N-metil-fucosamina (FucNAcMe), ácido 2,3-dideoxi-di-N-acetilmanosaminurónico (2,2-deNAcManA) y N-acetilglucosamina (GlaNAc) (Figura 8-A). *B. pertussis* a diferencia de otras bacterias Gram negativas no presenta antígeno O [1, 106].

Para la cuantificación del LPS se tomaron alícuotas las cuales fueron dializadas y liofilizadas de forma de poder estimar la cantidad mediante medidas de peso seco.



A partir de las muestras de LPS caracterizadas y cuantificadas realizamos entonces ensayos dosis respuesta para poder establecer la cantidad de LPS más adecuada para la caracterización del fenómeno StIR. Así evaluamos 4 dosis diferentes de LPS: 1 µg, 0,1 µg, 0,05 µg y 0,01 µg, las cuales fueron administradas por vía intranasal al momento de la infección con una suspensión bacteriana de *B. pertussis* en dosis subletal ( $5 \times 10^7$  UFC de *B. pertussis*/40 µl). Como control positivo de una infección efectiva de *B. pertussis* se utilizó un grupo de ratones (n=5) que fue tratado sólo con la suspensión bacteriana en la misma concentración antes indicada. La colonización fue evaluada a través del recuento del número de colonias de *B. pertussis* recuperadas de los pulmones 24 h después de la infección. Los ensayos se repitieron en forma independiente al menos 3 veces. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9.

Como puede observarse en la figura, la infección por *B. pertussis* en las condiciones ensayadas fue exitosa ya que se recuperaron más de  $10^6$  UFC de los pulmones de los animales tratados solamente con la suspensión bacteriana. También se puede observar que no se recuperaron bacterias viables de los pulmones de los animales que fueron tratados con 1 µg y 0,1 µg de LPS purificado. Por el contrario, la administración de una dosis 0,05 µg o menor no resulta efectiva en la eliminación de *B. pertussis* de los pulmones.

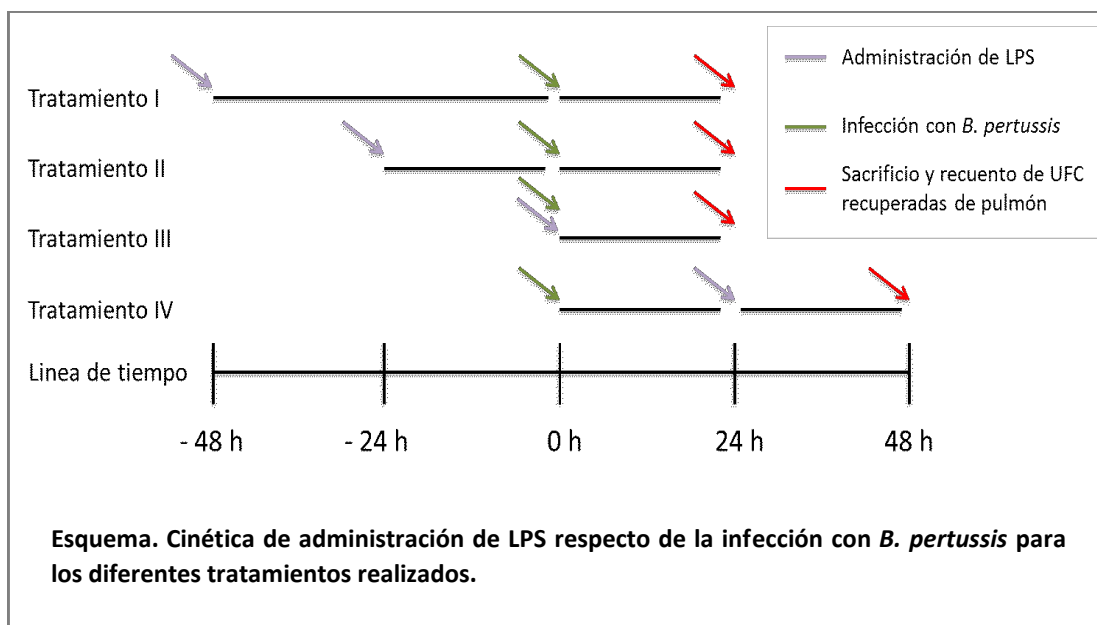


Para confirmar que el fenómeno observado se debió a la respuesta inducida por el LPS en el huésped y no a la acción directa del LPS sobre las bacteria, realizamos experimentos *in vitro* en los que incubamos a una suspensión bacteriana de *B. pertussis* equivalente a la utilizada para los ensayos *in vivo* ( $5 \times 10^7$  UFC/40 µl), junto a diferentes dosis de LPS purificado. Las mezclas así preparadas fueron incubadas a 37°C por 2 horas y sembradas en el medio sólido Bordet-Gengou suplementada con sangre desfibrinada de carnero (10%v/v) para determinar el recuento de viables. Como control empleamos una suspensión bacteriana que no fue tratada con LPS. En todos los casos pudimos detectar que el número de bacterias viables luego de la incubación con y sin las distintas cantidades de LPS ensayadas no resulta significativamente diferencial ( $p < 0,01$ ) (resultado no mostrado).

En base a los resultados obtenidos que muestran que el fenómeno StIR lleva a la eliminación total de bacteria y se logra inducir en un rango de concentraciones de LPS que va 0,1 a 1 µg y teniendo en cuenta que en ese mismo rango de dosis de LPS el animal tratado no presenta ninguna alteración clínica visible, elegimos como dosis de trabajo para el LPS 1 µg.

## Evaluación de la cinética de inducción del fenómeno StIR para *B. pertussis* por el lipopolisacárido

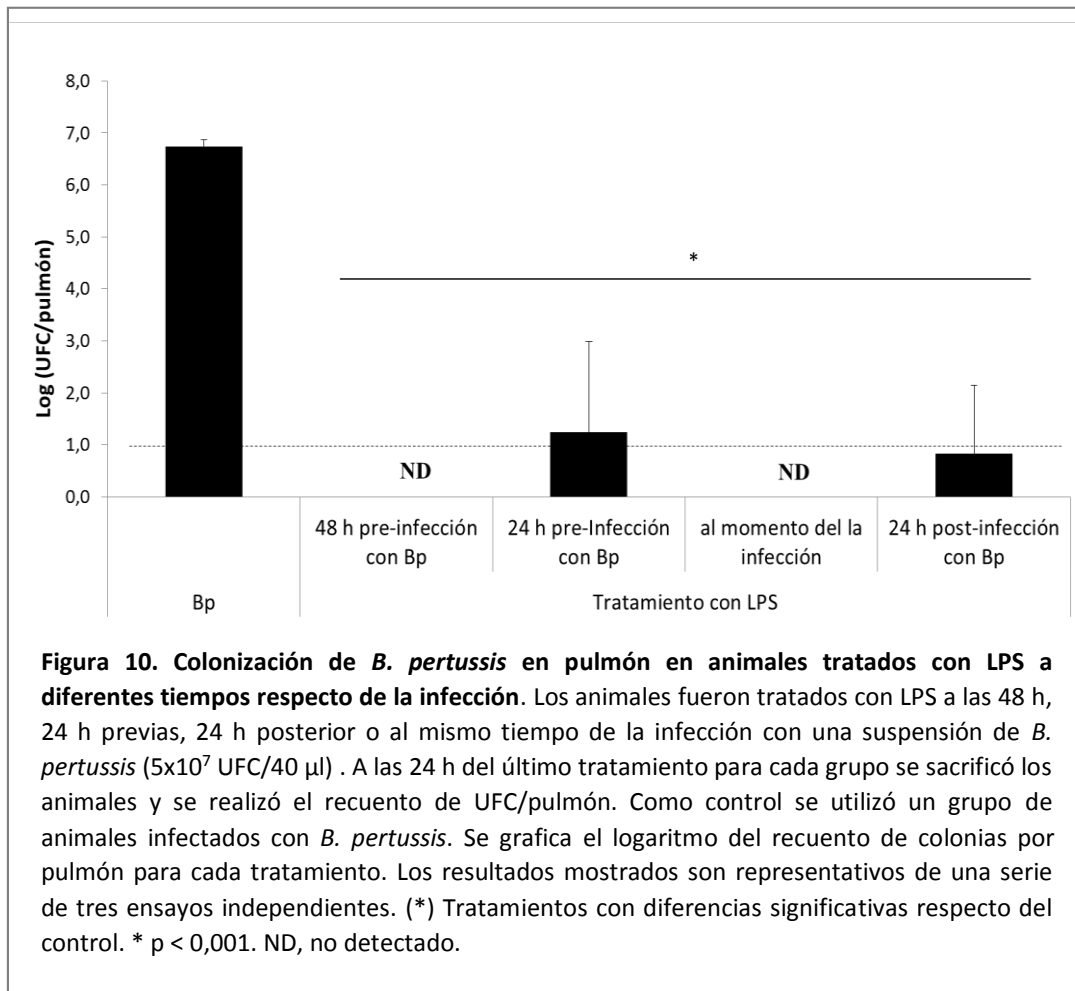
Habiendo determinado la cantidad de LPS a utilizar en los ensayos que realizaremos para caracterizar el fenómeno a nivel molecular, nos propusimos evaluar el efecto que tiene la administración del LPS a diferentes tiempos respecto de la infección con *B. pertussis* ( $5 \times 10^7$  UFC/40  $\mu$ l) sobre la colonización pulmonar. Para este fin, seguimos el siguiente esquema de experimentación:



Según hemos indicado en este esquema, a las 24 h posteriores a la última inoculación en cada tratamiento, se sacrificaron los ratones, se extrajeron los pulmones y se realizaron recuentos de las bacterias (UFC) que se encontraban colonizando los pulmones. Estos ensayos se repitieron al menos 3 veces. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 10. El recuento de las colonias muestra que la acción del LPS perdura al menos 48 h, ya que cuando este PAMP es administrado 48 h antes de la infección no se logra detectar la presencia de bacterias en los pulmones de los ratones infectados. Más aún, la respuesta que desencadena el LPS es capaz de eliminar completamente a las bacterias que se encontraban en el pulmón al menos 24 h antes de su inoculación. En la Figura también se observa que la coadministración del LPS junto a la suspensión bacteriana es suficiente para lograr la eliminación de la bacteria del huésped.

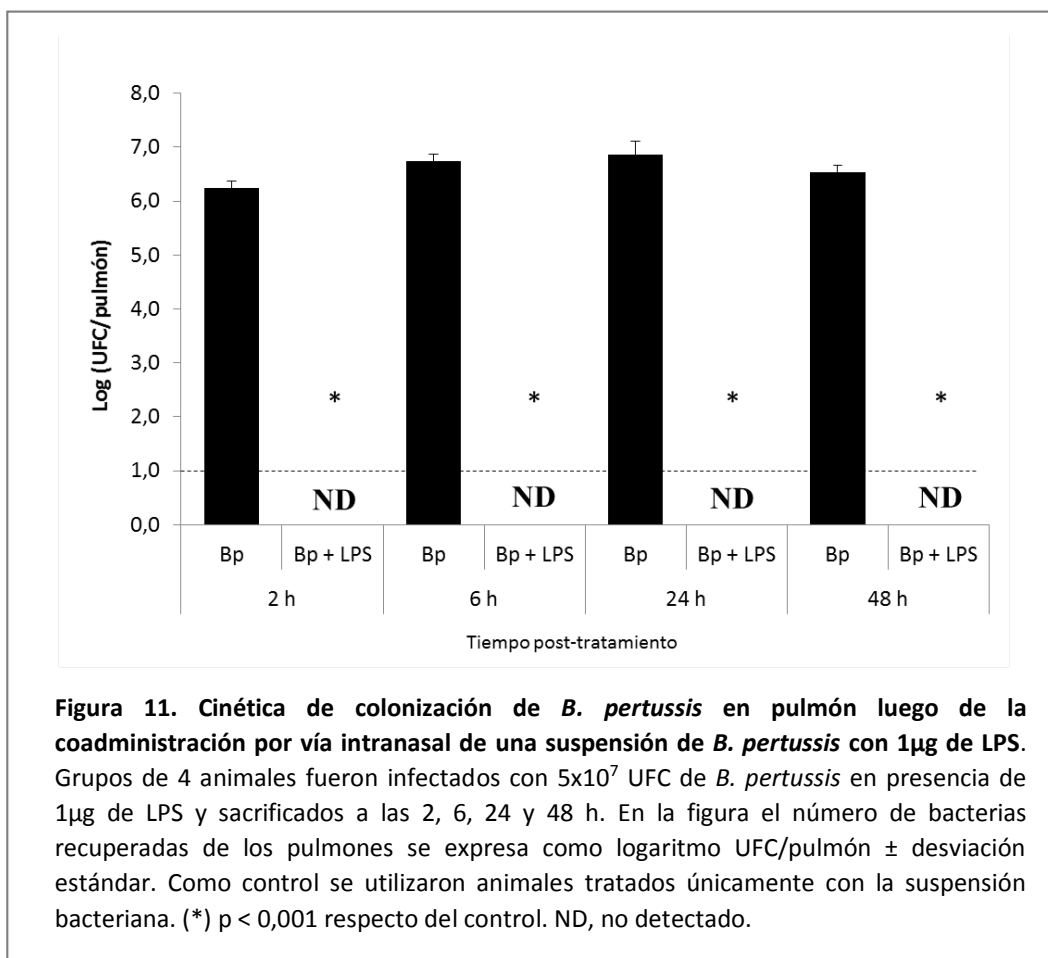
Todos estos resultados no sólo refuerzan la importancia de la señalización desencadenada a través TLR-4 en el curso de la infección por *B. pertussis* sino también muestra que dicha señalización es importante en estadíos tempranos de la infección.

Teniendo en cuenta que el fenómeno StIR en *B. pertussis* es posible de ser inducido por el LPS a distintos tiempos respecto de la infección, elegimos como condición de trabajo para los siguientes ensayos la coadministración del LPS con la suspensión bacteriana; por simplicidad y para minimizar la manipulación de los animales.



En los ensayos previos hemos detectado que la eliminación de *B. pertussis* del huésped es evidente en estadios tempranos post tratamiento (24 h). Este resultado es esperable ya se trataría de una respuesta exacerbada de la inmunidad innata.

Con el fin de evaluar si el fenómeno StIR desencadenado por la coadministración intranasal del LPS (1µg) es factible de ser detectado a tiempos post tratamiento más cortos que 24 h, realizamos experimentos *in vivo* en los que evaluamos la colonización de *B. pertussis* en pulmón a las 2, 6 y 24 h posteriores del tratamiento. Evaluamos también si es factible detectar el fenómeno 48 h después del tratamiento. Como control se utilizaron grupos de animales tratados con *B. pertussis* sin el agregado de LPS. En la Figura 11 se muestran los resultados obtenidos para los diferentes tiempos analizados. Los animales que fueron tratados solo con la suspensión de *B. pertussis*, como era esperable, presentaron un nivel de colonización alto. Para este tratamiento el número de bacterias viables recuperadas de los pulmones resultó ser el más alto y sin diferencias significativas entre los tiempos ensayados. Por el contrario, en los



animales tratados con LPS al momento del desafío con *B. pertussis* no se detectaron bacterias viables en ninguno de los tiempos analizados. Estos ensayos han puesto así en evidencia que el fenómeno StIR en *B. pertussis* es factible de observarse a tiempos tan tempranos como 2 h post tratamiento.

## DISCUSIÓN

A lo largo de este capítulo hemos seleccionado las condiciones experimentales que permiten evidenciar de forma clara y simple el efecto inmunoestimulador inducido por el LPS al ser administrado por vía intranasal. Como hemos mencionado, la estimulación provocada por el LPS es desencadenante del fenómeno de StIR que fue descrito por primera vez para *B. pertussis* por nuestro grupo de trabajo. Aunque nuestro laboratorio había evidenciado que todos los agonistas son capaces de inducir la respuesta innata de la mucosa respiratoria, sólo el LPS induce la eliminación completa de *B. pertussis* del huésped [17]. Este hallazgo está en concordancia con los resultados publicados por nosotros y por otros autores que señalan la relevancia funcional del receptor TLR-4 para el reconocimiento de la presencia de *B. pertussis* y la inducción de una respuesta inmune que permita el control de la infección. El hecho que otros agonistas de la inmunidad innata de la mucosa respiratoria no sean capaces de mediar el fenómeno StIR observado nos resulta interesante porque evidencia una vez más el hecho de que cada mecanismo innato tiene un impacto diferencial sobre distintos patógenos haciendo que el huésped requiera de la ejecución de respuestas particulares y específicas de la inmunidad innata para promover el control temprano de distintos agentes microbianos. Así por ejemplo la estimulación de la respuesta innata en la mucosa respiratoria mediante el empleo de Poli: IC parece no impactar en la infección provocada por *B. pertussis* ni por ningún otro patógeno bacteriano pero si pareciera ser benéfica para el control de infecciones virales [107].

La identificación del fenómeno StIR en *B. pertussis* abre una puerta de investigación interesante para el discernimiento de los mecanismos responsables del control bacteriano. Esto a su vez podría tener un potencial impacto en el desarrollo de nuevas vacunas que resulten más efectivas frente a este patógeno. Con el objetivo de

avanzar en esta línea nos planteamos primeramente seleccionar las condiciones experimentales para evidenciar más clara, sencilla y oportunamente al fenómeno StIR. Mediante los ensayos aquí presentados pudimos establecer que la respuesta desencadenada frente a la estimulación con LPS tiene un comportamiento dependiente de la dosis, encontrando que el LPS en cantidades iguales o mayores a 0,1 µg resultan suficientes para abrogar completamente la colonización de *B. pertussis* a nivel pulmonar.

Los ensayos *in vivo* que aquí presentamos permitieron establecer también que la estimulación del LPS vía TLR4 resulta efectiva en la eliminación de la bacteria no sólo cuando este agonista es administrado junto a la suspensión bacteriana sino también cuando el mismo es administrado 24 h e incluso 48 h antes de la infección. Más aún la respuesta que induce el LPS es suficiente como para eliminar la colonización de bacterias ya establecidas en los pulmones. Estos resultados muestran la robustez y la durabilidad de la estimulación de la respuesta inmune que induce el LPS.

Pudimos detectar también que el efecto de eliminación bacteriana puede desencadenarse a pocas horas del tratamiento con el LPS evidenciando la rapidez del fenómeno StIR. Cabe pensar entonces que en este fenómeno participan poblaciones celulares tales como las células epiteliales o los macrófagos y mecanismos que estarían presentes desde el inicio de la infección. En cuanto a las células del epitelio respiratorio, no existen hasta ahora evidencias sobre la contribución de las mismas en el control de la infección por *B. pertussis*. Esto sí ha sido observado para otras infecciones respiratorias, como la de *P. aureginosa*, *K. pneumoniae* e incluso la del virus de influenza [78]. Tampoco existe información sobre la acción de actores moleculares derivados del epitelio como las defensinas, las catelicidinas, la lipocalina, producción de radicales libres del oxígeno u otras [108], respecto de su acción microbicida sobre *B. pertussis*. Sobre estos aspectos hemos trabajado y los resultados alcanzados serán presentados en los próximos capítulos de este trabajo de Tesis.

En resumen, el trabajo presentado en este capítulo muestra que la administración de 1 µg de LPS al momento de la infección por *B. pertussis*, facilita la resistencia de la mucosa respiratoria a este patógeno en estadios muy tempranos de la infección.



## RESULTADOS

Caracterización *in vivo* del fenómeno StIR en el marco de la infección por *Bordetella pertussis*

¿La respuesta desencadenada por el LPS ocurre a lo largo de todo el tracto respiratorio?



## INTRODUCCIÓN

La mucosa respiratoria es una superficie del cuerpo que está muy expuesta al ambiente externo siendo el volumen de aire inhalado diariamente del orden de los miles de litros. El sistema inmunológico local debe lidiar así con partículas potencialmente nocivas y microorganismos patógenos los cuales debe controlar para poder desarrollar la principal función que es la relacionada al intercambio de gases en la superficie alveolar [109]. En este contexto la funcionalidad de la inmunidad innata sobre todo mediada por los receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR) resulta esencial. Dentro de estos receptores se encuentran los receptores tipo Toll (TLRs) los cuales han demostrado jugar un rol importante en la protección contra una amplia variedad de patógenos incluyendo virus, hongos y bacterias [110-115].

Para comprender la acción de agonistas TLR como el LPS aquí utilizado es preciso recordar que a lo largo de la mucosa respiratoria se encuentran poblaciones celulares como las células epiteliales de las vías de conducción aérea y los macrófagos alveolares dispuestas estratégicamente para detectar la presencia microbiana a través de sus receptores de reconocimiento de patrones moleculares. Estas poblaciones se activan frente a los agonistas y expresan mediadores de forma de poner en marcha distintos mecanismos microbicidas [116, 117]. Si bien se ha avanzado considerablemente en identificar cuáles agonistas son esenciales para afectar determinadas infecciones, aún no se conoce acabadamente cómo es la expresión y funcionalidad de receptores TLR a lo largo del tracto respiratorio. Algunas evidencias parecen indicar que existen diferencias en la expresión y funcionalidad de receptores de reconocimiento microbiano en distintas regiones del tracto respiratorio [118].

En este contexto decidimos evaluar la respuesta que desencadena el inductor del fenómeno StIR a los largo del tracto respiratorio. Los ensayos que se presentan en este capítulo refieren a la administración intranasal de LPS (1  $\mu$ g) y su comparación con el proceso infeccioso de *B. pertussis* en el modelo murino. Como parte de estos estudios se analizaron las respuestas inducidas en las narinas, tráquea y a nivel del pulmón. Respecto de este último no sólo evaluamos la respuesta pulmonar global si no también la repuesta en poblaciones celulares allí presentes.

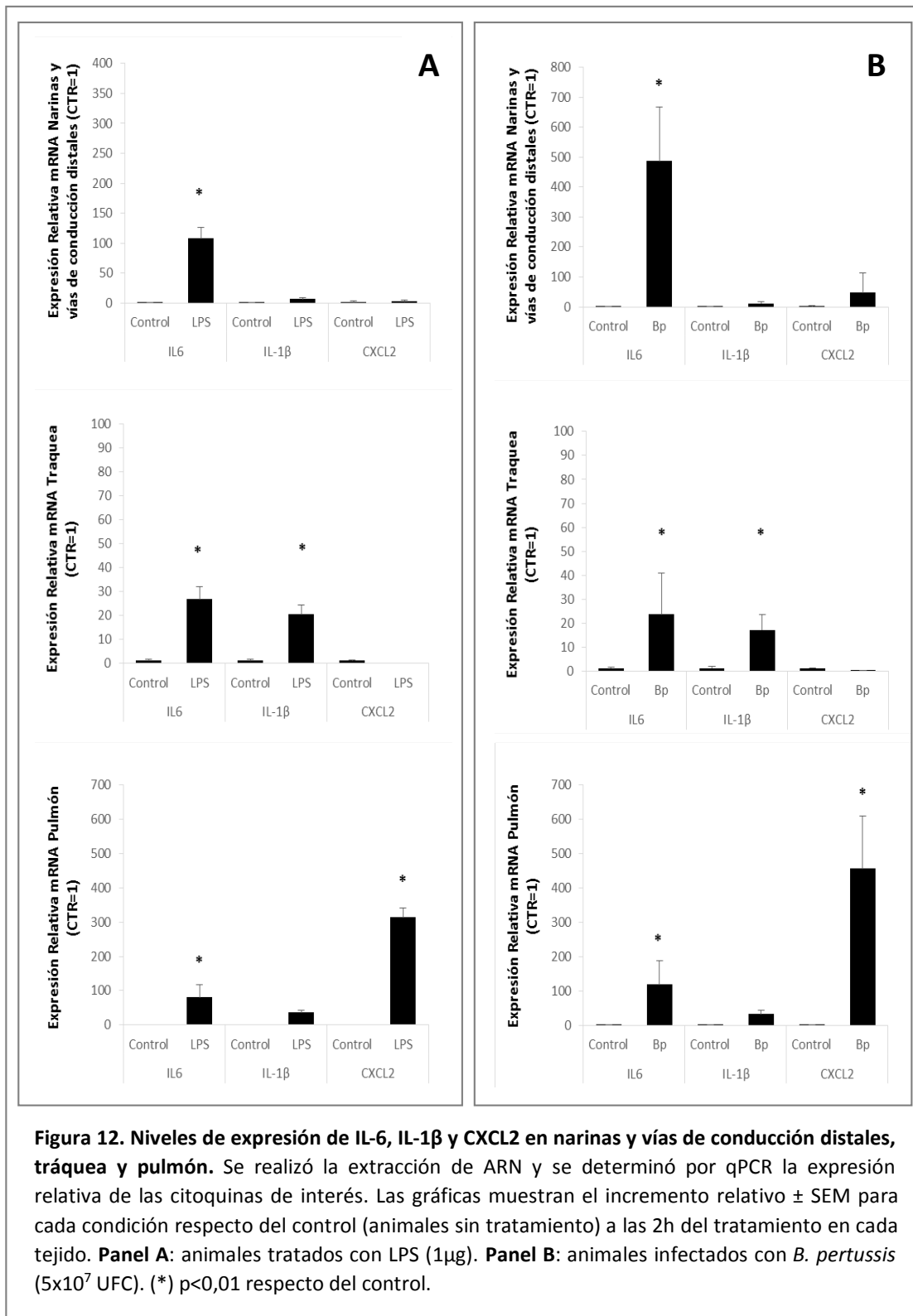
## RESULTADOS

### **Análisis del perfil de expresión de citoquinas y quimoquinas a nivel del árbol respiratorio**

Para evaluar cómo responde la mucosa respiratoria a la activación local vía TLR-4 administramos a un grupo de ratones Balb/c 1µg de LPS por vía intranasal. Con propósitos comparativos incluimos también un grupo de ratones tratados con una suspensión bacteriana de *B. pertussis* ( $5 \times 10^7$  UFC). Transcurridas 2 horas luego del tratamiento se colectaron muestras correspondientes a narinas y vías de conducción distales, tráquea y pulmón para su estudio diferencial.

Primeramente evaluamos la activación transcripcional de un panel de citoquinas y quimoquinas que son comúnmente expresadas por las células de la mucosa respiratoria: IL-6, IL-1β y CXCL2. Como control se emplearon animales sin tratamiento cuya respuesta fue empleada para el cálculo de los niveles de expresión relativa. Los resultados obtenidos para cada una de las tres regiones anatómicas analizadas se presentan en la Figura 12. Como puede observarse en el Panel A de la Figura 12 el tratamiento de los ratones con el LPS en las condiciones ensayadas induce únicamente la expresión de IL-6 en las narinas y vías de conducción distales, siendo alrededor de 100 veces mayor que la condición control; mientras que a nivel de la tráquea los efectos del LPS son muchos más moderados encontrando incrementos de alrededor de 25 veces para IL-6 y 20 veces IL-1β respecto de la condición basal. Por el contrario, a nivel de pulmón se pudo evidenciar en los animales tratados con LPS un incremento relativo en la expresión de IL-6 y de CXCL2 de aproximadamente 80 y 300 veces respectivamente respecto de la condición control (sin tratamiento).

En el escenario de infección por *B. pertussis*, encontramos que a nivel de las narinas y vías de conducción distales se ve estimulada la expresión de IL-6 en aproximadamente 450 veces respecto de la condición control, mientras que los niveles de IL-1β y CXCL2 se mantienen sin diferencias significativas (Figura 12, Panel B).

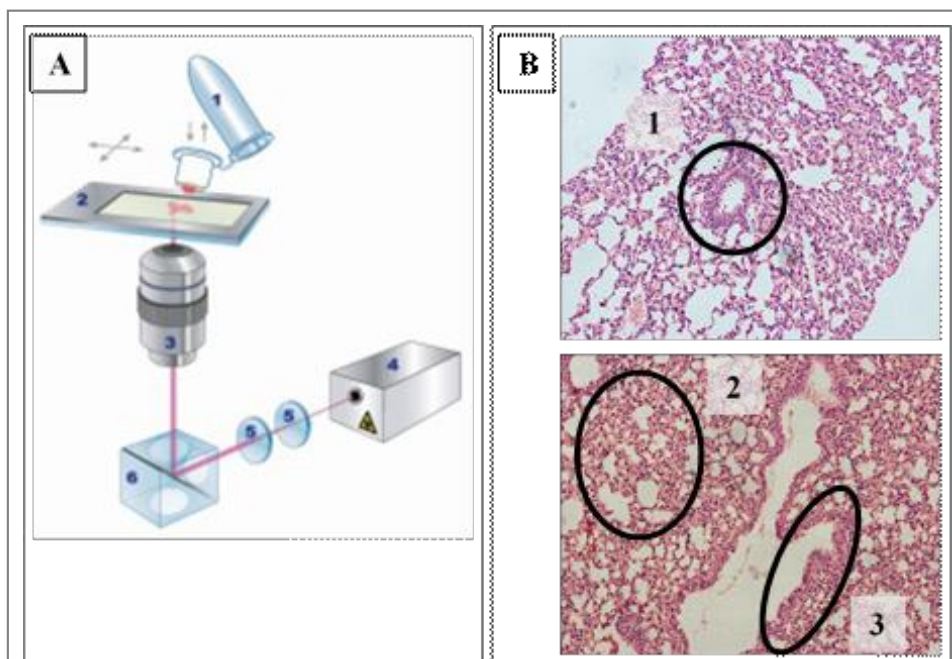


En tráquea, la infección presenta un comportamiento similar al observado en respuesta al tratamiento con el LPS, presentando incrementos relativos en la expresión de IL-6 e IL-1β de aproximadamente de 25 y 17 veces respectivamente. Por su parte, la respuesta pulmonar frente a la infección por *B. pertussis* se ve caracterizada por un

incremento de los niveles de IL-6 en alrededor de 120 veces respecto del control mientras que para CXCL2 el incremento resultó ser de alrededor de 450 veces.

Los análisis realizados sobre la respuesta inmune frente al tratamiento con LPS a nivel de las distintas regiones del árbol respiratorio han puesto de manifiesto que las vías aéreas superiores resultan poco respondedoras al estímulo administrado en las condiciones ensayadas. Por el contrario, a nivel pulmonar la respuesta inmune evaluada respecto tanto a los niveles de IL-6 como de la quimocina CXCL2 fue significativamente mayor a las halladas en otras regiones del tracto respiratorio.

Habiendo encontrado diferencias regionales en la respuesta y siendo el pulmón un órgano con gran capacidad de estimulación decidimos analizar cómo variaba la respuesta inducida por el LPS en distintos componentes estructurales del pulmón: bronquios, bronquiolos y parénquima. Para este fin realizamos ensayos *in vivo* en los que se trataron grupos de 4 animales con 1 µg de LPS o con una suspensión de *B. pertussis* ( $5 \times 10^7$  UFC). Luego de transcurridas 2 h del tratamiento se colectaron

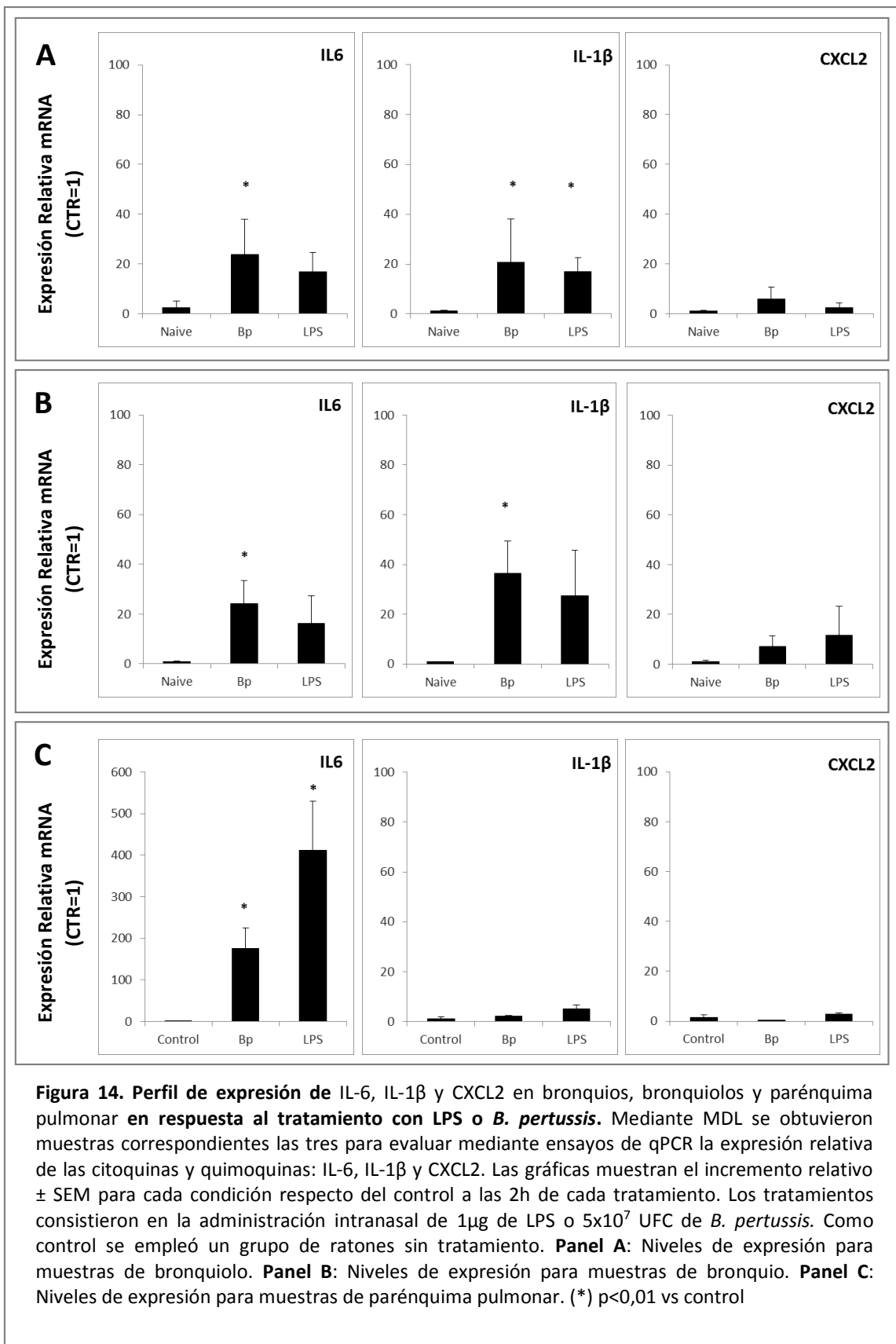


**Figura 13. Obtención de fracciones celulares por microscopía de disección láser (MDL).** (A) Esquema de disección y recolección de muestra. Como se indica en el esquema se hace incidir el láser sobre el preparado histológico siguiendo un recorrido determinado por el usuario. El corte tisular obtenido es recogido en la tapa de un microtubo ubicado por debajo del preparado en un soporte ad-hoc. (B) Se indican las zonas del pulmón escogidas para la microdissección láser: (1) bronquiolos, (2) parénquima pulmonar y (3) epitelio bronquial.

muestras de pulmón las cuales fueron conservadas en alcohol viscoso (OCT) a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posteriormente realizar cortes histológicos por medio de un criótomo. Los cortes fueron sometidos luego a una microdissección láser (Figura 13 Panel A) con el fin de obtener material correspondiente a las siguientes estructuras pulmonares: vías aéreas grandes o bronquios, vías aéreas pequeñas o bronquiolos y parénquima pulmonar (Figura 13 Panel B). De cada muestra extrajimos ARN para evaluar mediante ensayos de qPCR los niveles de expresión de las citoquinas y quimoquinas IL-6, IL-1 $\beta$  y CXCL2. Los resultados obtenidos a las 2h post-tratamiento se presentan en la Figura 14 como incrementos relativos respecto a los niveles hallados en el material extraído a partir de los animales no tratados con el agonista (animales control). Con fines comparativos realizamos también determinaciones cuantitativas en muestras provenientes de animales infectados con *B. pertussis*.

Los resultados presentados en la Figura 14 muestran que a nivel de bronquios y bronquiolos los dos tratamientos evaluados son capaces de inducir de forma moderada la expresión de IL-6 e IL-1 $\beta$ . A nivel bronquiolos encontramos incrementos en IL-6 de 24 y 17 veces y en IL-1 $\beta$  de 20 y 17 veces en respuesta a la infección y el LPS, respectivamente; mientras que los mismos tratamientos a nivel de bronquios produjeron incrementos de 24 y 16 veces para IL-6 y de 36 y 27 veces para IL-1 $\beta$ . En ambas zonas la expresión de CXCL2 no mostró diferencias respecto de la condición control.

En el parénquima pulmonar pudimos evidenciar un mayor nivel de respuesta en comparación a bronquios y bronquiolos, con incrementos en los niveles de expresión de IL-6 respecto del control sin tratar de 175 veces para la infección por *B. pertussis*, y de 400 veces para el tratamiento con LPS. Por el contrario, no pudimos detectar en ningún caso niveles diferenciales de expresión de la interleuquina-1 ni de la quimoquina CXCL2.

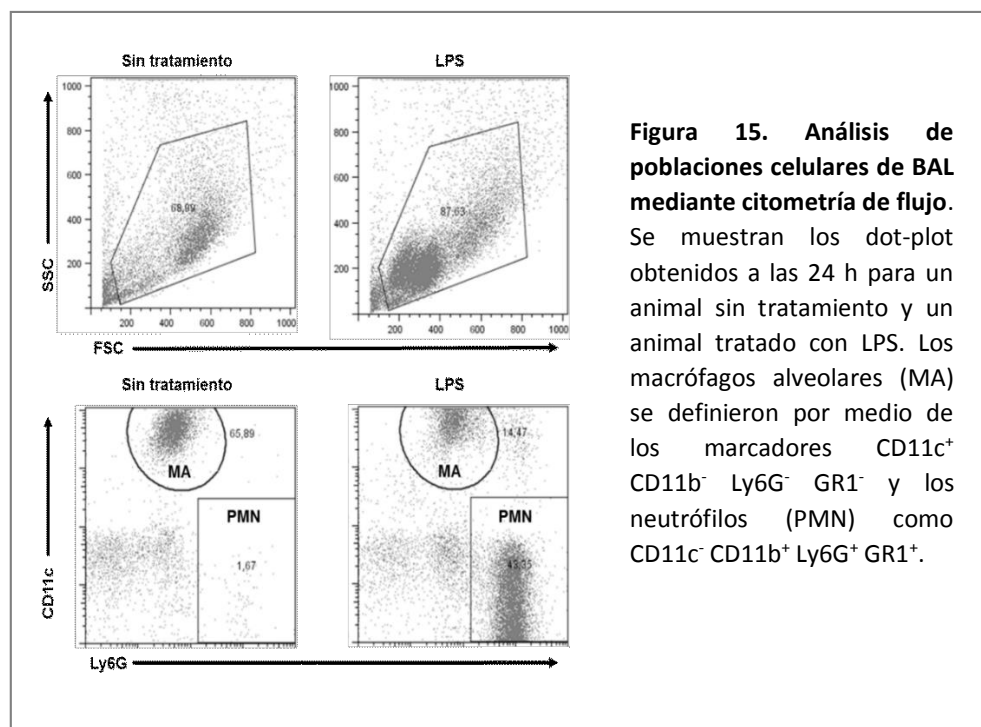




## Análisis de las poblaciones celulares que intervienen en la respuesta inmune inducida por el LPS

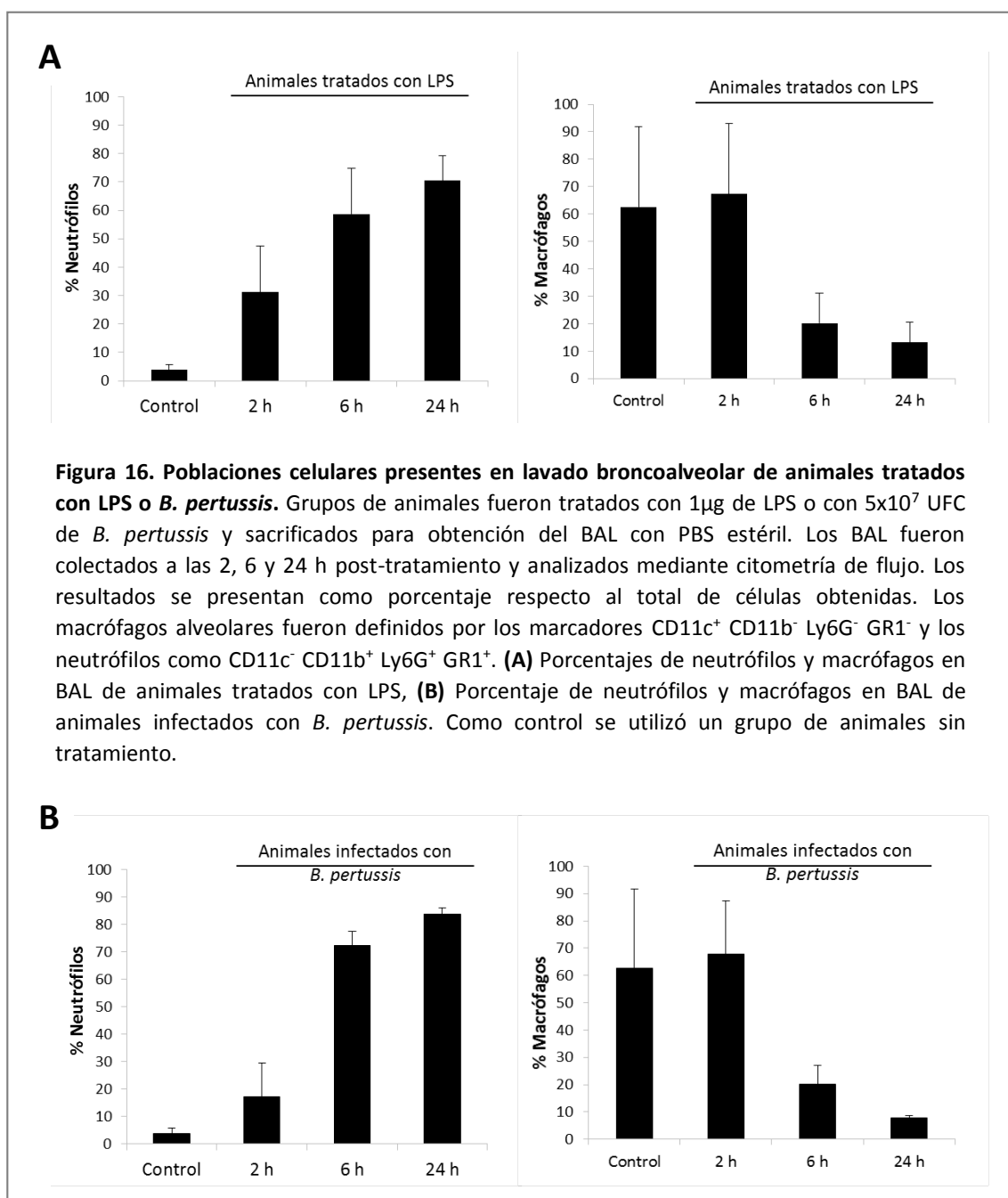
Con el objetivo de profundizar la caracterización de la respuesta desencadenada por la administración de lipopolisacárido decidimos analizar que poblaciones se encontraban presentes a nivel del espacio alveolar luego de la estimulación con este agonista. Para este fin grupos de 4 animales fueron tratados con 1  $\mu\text{g}$  de LPS y a distintos tiempos post tratamiento (2, 6 y 24 h) se colectaron muestras de lavado bronco alveolar (BAL) con PBS estéril. Se incluyeron también dos grupos más de animales: uno tratado con una suspensión de *B. pertussis* ( $5 \times 10^7$  UFC), de forma de poder evaluar a las poblaciones celulares intervinientes en el marco de la infección, y uno sin tratamiento como control de expresión basal. Las muestras de BAL colectadas para todos los tratamientos en todos los tiempos evaluados se procesaron para ser analizadas por citometría de flujo. La población de los macrófagos alveolares (MA) fue identificada con los marcadores  $\text{CD11c}^+ \text{CD11b}^- \text{Ly6G}^- \text{GR1}^-$  y la de los neutrófilos con  $\text{CD11c}^- \text{CD11b}^+ \text{Ly6G}^+ \text{GR1}^+$ .

En la Figura 15 se muestra a modo de ejemplo, los dot-plot de tamaño y granularidad (FSC vs SSC) y la identificación de las poblaciones leucocitarias para los BAL colectados a las 24 h correspondientes a un animal tratado con LPS y uno control.



**Figura 15. Análisis de poblaciones celulares de BAL mediante citometría de flujo.** Se muestran los dot-plot obtenidos a las 24 h para un animal sin tratamiento y un animal tratado con LPS. Los macrófagos alveolares (MA) se definieron por medio de los marcadores  $\text{CD11c}^+ \text{CD11b}^- \text{Ly6G}^- \text{GR1}^-$  y los neutrófilos (PMN) como  $\text{CD11c}^- \text{CD11b}^+ \text{Ly6G}^+ \text{GR1}^+$ .

Del procesamiento conjunto de los datos colectados en la citometría de flujo se construyeron gráficas que dan cuenta del porcentaje de macrófagos alveolares y de neutrófilos a nivel de pulmón para los diferentes tratamientos y tiempos analizados. Los porcentajes de cada una de las poblaciones antes mencionadas fueron referidos al total de células colectadas en el lavado broncoalveolar (Figura 16). En el panel A de la figura 16 se presentan las gráficas de las poblaciones celulares detectadas en los animales tratados con LPS.



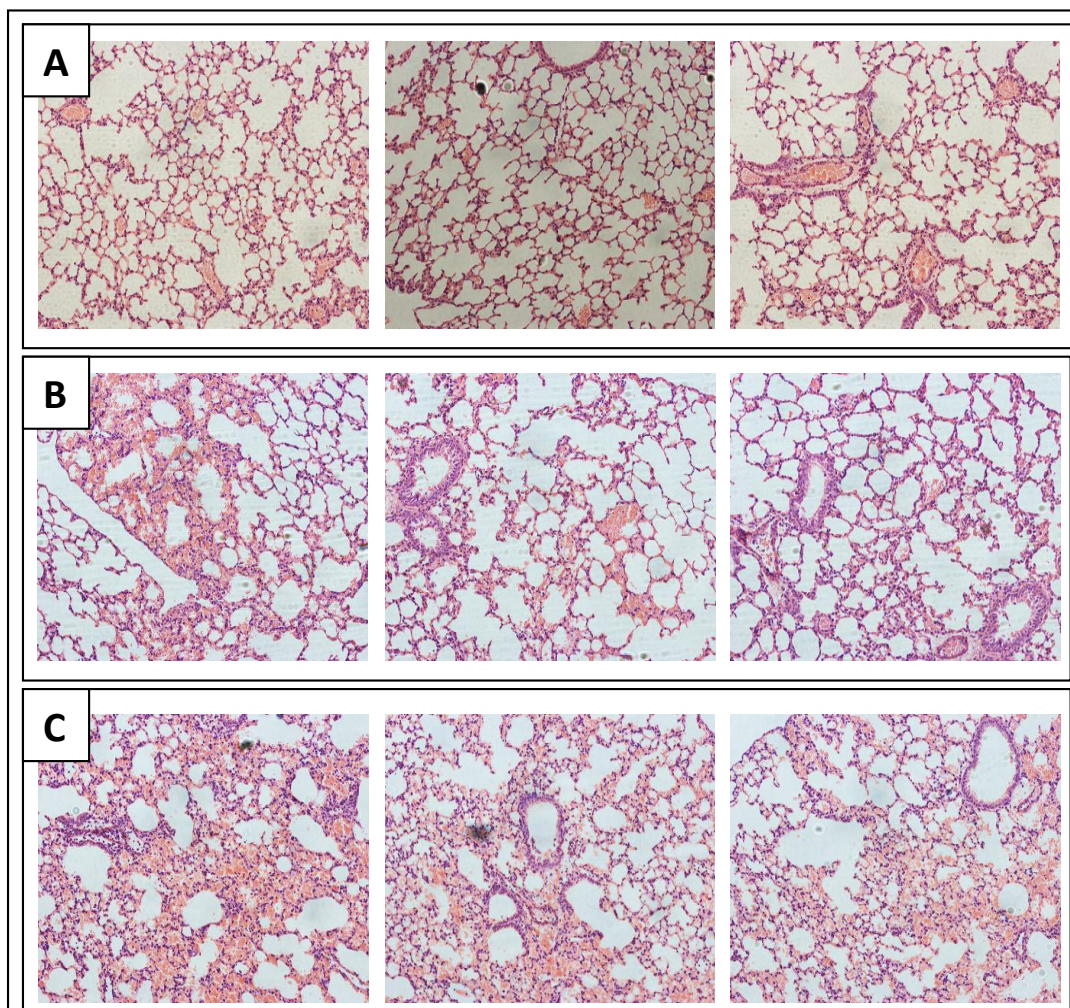
Este análisis nos permitió detectar que en el BAL de los animales naïve tal como es referido en la literatura, la población mayoritaria son los macrófagos alveolares, (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>-</sup>) siendo mínimo el porcentaje de PMN. Estas células representan más del 60% de las células encontradas en el lavado broncoalveolar. En los animales estimulados con LPS por su parte, se detectó un reclutamiento marcado de neutrófilos (CD11c<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup>) a la cavidad alveolar con el consecuente descenso del porcentaje de macrófagos alveolares. Este fenómeno se hace evidente ya a las dos horas del tratamiento (67,31% macrófagos, 31,22% neutrófilos) y continua aumentando hasta las 24 h donde nos encontramos a la población de neutrófilos como la mayoritaria (13,17% macrófagos, 70,50% neutrófilos).

Los resultados obtenidos en respuesta a la infección por *B. pertussis* muestran un comportamiento similar a lo observado para el LPS, con un reclutamiento de la población neutrofílica evidente a las 2 h posteriores a la infección (más del 12%) con un incremento sustancial de la misma a las 24 h (80% de las poblaciones celulares detectadas en el BAL). La población de macrófagos a las 2 h post infección representa más del 60% de las poblaciones celulares detectadas en el BAL obtenido de los ratones infectados. Este porcentaje es similar al hallado en los animales empleado como control. La proporción de macrófagos luego decrece como consecuencia del aumento de la población neutrofílica llegando a representar solo un 7% de la población total del BAL a las 24 h post infección.

### **Análisis del perfil inflamatorio pulmonar como consecuencia del tratamiento con LPS**

Con el fin de evaluar la respuesta inflamatoria como consecuencia del tratamiento con el lipopolisacárido administrado intranasalmente en ratones, realizamos un análisis histopatológico de cortes de pulmón. Con fines comparativos realizamos también experimentos en los que empleamos como tratamiento una suspensión de *B. pertussis* ( $5 \times 10^7$  UFC) en lugar del LPS. Como control de no inflamación empleamos un grupo de ratones no tratados. Las muestras obtenidas en todos los casos se conservaron en formol al 4% y en heladera hasta el momento de su

uso. Al momento del procesamiento los pulmones se embebieron en parafina y se realizaron cortes transversales del tejido los cuales fueron teñidos con hematoxilina-eosina. En la Figura 17 se presentan las imágenes obtenidas por microscopía óptica. Como puede observarse en el panel A de la Figura 17, los animales sin tratamiento (animales control) presentan un parénquima pulmonar conservado con alvéolos uniformes y expandidos, sin evidencias de infiltrados leucocitarios. Para el caso de los animales desafiados con *B. pertussis* encontramos indicios de infiltrado perivascular con engrosamiento del septo alveolar, pero con la estructura de los alvéolos



**Figura 17. Histopatología de pulmones tratados con *B. pertussis* o LPS.** Grupos de 4 animales fueron tratados con 1  $\mu\text{g}$  LPS o  $5 \times 10^7$  UFC de *B. pertussis*. Luego de 2h se removieron los pulmones y se conservaron en formol. Posteriormente se embebieron en parafina. Se realizaron cortes transversales que se tiñeron con Hematoxilina-Eosina y se analizaron por microscopía óptica. Como control se utilizaron animales sin tratamiento. **(A)** Las Imágenes corresponden a cortes de pulmón de animales sin tratamiento. **(B)** Las Imágenes corresponden a cortes de pulmón de animales infectados con *B. pertussis*. **(C)** Las Imágenes corresponden a cortes de pulmón de animales tratados con LPS

conservada (Figura 17-B). Por último, al analizar las imágenes obtenidas a partir de los animales tratados con LPS encontramos abundante infiltrado leucocitario, engrosamiento de los septos alveolares y disrupción alveolar (Figura 17-C).

## DISCUSIÓN

La respuesta del huésped a la administración intranasal de un agonista que acciona sobre receptores TLR ha sido ampliamente documentada [119]. Así, se ha podido describir que en la respuesta a la administración intranasal al LPS tienen una importante contribución las células estructurales [120], aunque también los macrófagos alveolares responden a la presencia de este agonista [121]. Si bien se ha avanzado en la identificación de los distintos tipos de células sensibles a los agonistas TLR a lo largo de las vías respiratorias, falta todavía un conocimiento más acabado respecto de cómo es la respuesta *in vivo* en los diferentes compartimentos anatómicos del tracto respiratorio. En nuestro estudio hemos empleado al agonista LPS para avanzar en estos aspectos ya que desencadena una respuesta por medio de la cual *B. pertussis* logra ser eliminada del huésped. Para analizar la respuesta innata inducida a través de la activación del LPS en narinas y vías de conducción distales, tráquea y pulmones seleccionamos un panel de citoquinas y quimoquinas que han sido descrito como inducibles por agonistas [122]. Si bien el número de marcadores es limitado, nos ha permitido realizar una caracterización regional de la respuesta evaluada a nivel transcripcional mediante ensayos de qPCR. Estos ensayos permitieron evidenciar que el tratamiento con el LPS en las condiciones ensayadas es capaz de inducir levemente la expresión de las citoquinas analizadas tanto a nivel de narinas y vías de conducción distales como de tráquea. Por el contrario, a nivel de pulmón se pudo evidenciar que el tratamiento con el LPS es capaz de provocar una respuesta mayor con incrementos relativos en la expresión de IL-6 y de CXCL2 de aproximadamente 80 y 300 veces respectivamente respecto de la condición control. Si bien la magnitud de la respuesta en algunos casos es diferente, estos resultados coinciden en forma general con otros resultados obtenidos por nuestro grupo referidos a la caracterización de la topología de respuesta innata frente a la activación por distintos agonistas TLR, entre ellos LPS de *E. coli* [118].

Por otra parte la infección por *B. pertussis* conduce a una mayor inducción de la expresión de IL-6 en las narinas y en pulmón mientras que en tráquea las respuestas son muchos más leves. Esta caracterización parcial de la respuesta diferencial a la infección por *B. pertussis* en distintos sitios de la vía respiratoria no ha sido reportada previamente. La mayoría de los trabajos se han enfocado en el estudio de la respuesta a nivel pulmonar [123, 124]. En nuestro caso, en pulmón también se pudo detectar que los niveles de CXCL2 se incrementan en más de 450 veces. Estos resultados diferenciales nos marcarían que al menos en el escenario de la infección los agonistas y moduladores de las respuestas son diferentes y más complejos que los inducidos por un único agonista como es el LPS. Más aún la sensibilidad a dichos agonistas parece no ser homogéneo a lo largo del árbol respiratorio.

Es de destacar que más allá de las diferencias detectadas entre la respuesta inducida por infección y la correspondiente al tratamiento con el LPS, ambos tratamientos tienen en común una mayor inducción de la respuesta a nivel de pulmón en comparación con lo observado a nivel de narinas y tráquea. Gracias a metodologías que incluyen el empleo de la microscopia de disección laser hemos podido detectar que la mayor estimulación en los marcadores evaluados estaría confinada fundamentalmente en el parénquima pulmonar.

Por otra parte y mediante citometría de flujo evidenciamos que la mayor capacidad de respuesta está caracterizada también por el reclutamiento de neutrófilos. Tanto en la infección como a consecuencia del tratamiento intranasal con el LPS es posible detectar a tiempos muy tempranos la presencia de neutrófilos. Esta población se hace prevalente ya a las 24 h post tratamiento. La acumulación de neutrófilos en los pulmones es uno de los sellos distintivos de una respuesta inflamatoria aguda, detectada aquí incluso a través de cortes histológicos. Los mecanismos por los cuales los PMN son reclutados en el pulmón en respuesta a estímulos inflamatorios no son claros, pero parece ser dependiente de la liberación y la activación de ciertas citoquinas y quimoquinas[125]. En el caso de la infección por *B. pertussis*, como ya hemos demostrado anteriormente, en nuestro laboratorio podría representar un mecanismo de contención temprana de *B. pertussis*. Ensayos de depleción de neutrófilos realizados por otros profesionales de nuestro equipo de

trabajo permitieron confirmar la importancia de estas células en la eliminación de *B. pertussis* en los estadios iniciales de la infección [123] de manera análoga a lo encontrado en otras infecciones respiratorias de origen bacteriano [126]. Estos resultados junto al hecho que el LPS induce el reclutamiento de esta población nos hace pensar que este mecanismo podría participar en la eliminación de *B. pertussis* en el escenario StIR detectado por nosotros. Este es uno de los aspectos que analizaremos en los siguientes capítulos de este trabajo de Tesis.





## RESULTADOS

Caracterización *in vivo* del fenómeno StIR en el marco de la infección por *Bordetella pertussis*

¿Quiénes son los actores principales del fenómeno StIR?



## INTRODUCCIÓN

En los capítulos anteriores, en ensayos in vivo utilizando el modelo murino, hemos podido detectar que en estadíos tempranos post tratamiento por vía intranasal con LPS se observa reclutamiento de neutrófilos. Este hallazgo, aunque esperado, nos pareció por demás interesante ya que esta población ha sido reportada con un rol importante en la eliminación de varios patógenos respiratorios [127], incluyendo *Pseudomonas aureginosa* [128], *Legionella pneumophila* [129], *Klebsiella pneumoniae* [130], y también *B. pertussis* [131, 132]. Así, por ejemplo, en un estudio realizado por Tsai y colaboradores [128] se obtuvieron resultados que daban cuenta que la inhibición del reclutamiento de neutrófilos provocado por la infección pulmonar por *P. aureginosa* en ratones resultaba en un aumento de la carga bacteriana y en una disminución de la tasa de supervivencia de los ratones infectados. Por su parte Ye y colaboradores [130] obtuvieron resultados que sugieren que la inducción del reclutamiento de neutrófilos a través de una respuesta Th17 es esencial para la protección contra la infección causada por *K. pneumoniae*. Más aún, se ha demostrado que los neutrófilos serían esenciales en la eliminación *Haemophilus influenzae* [133].

Para el caso de *B. pertussis*, primariamente se había descrito que los neutrófilos tenían un rol en la infección y que la toxina pertussis tenía la capacidad de modular la respuesta inmune innata retrasando el reclutamiento temprano (día 1 a 2) de neutrófilos en respuesta a la infección [132, 134]. Nuevos estudios permitieron detectar que los neutrófilos desempeñan un papel importante en ratones inmunes probablemente debido a la presencia de anticuerpos opsonizantes que mejoran la fagocitosis [131]. Si bien todavía restan realizar más investigaciones para esclarecer el rol de esta población celular en el marco de la infección y de la protección contra pertussis, todos los antecedentes mencionados más arriba nos guían hacia la experimentación dirigida a analizar el rol de los neutrófilos en el escenario StIR. Los resultados que hemos alcanzado sobre este aspecto serán presentados en esta sección de mi trabajo de Tesis. También presentaremos los resultados obtenidos al evaluar el rol en la eliminación de *B. pertussis* de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. La observación de la eliminación temprana de *B. pertussis* por LPS en los ensayos anteriores nos llevó a pensar que la misma podría ser consecuencia de mecanismos efectores rápidos como los ejercidos por moléculas ya presentes en el

tracto respiratorio. A nivel de las mucosas, la familia de proteínas Nox/Duox representa una fuente de producción controlada de dos especies reactivas del oxígeno (ROS): superóxido y peróxido de hidrógeno. Las especies reactivas del oxígeno comprenden un grupo de iones químicamente reactivos, radicales y moléculas derivadas del oxígeno. La generación de ROS en los compartimentos intracelulares como el fagosoma por acción de la NADPH oxidasa tienen como objetivo inactivar microorganismos fagocitados [135]. Las oxidasas duales (DUOX) se ubican en la membrana apical de epitelios mucosales, jugando un rol clave en la respuesta antimicrobiana [97]. La acción conjunta de estas oxidasas, junto con la peroxidasa secretada al compartimento luminal generan especies altamente reactivas como los radicales  $\text{ClO}^-$  y  $\text{SCNO}^-$  a partir de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SCN}^-$  y peróxido de hidrógeno. Se ha demostrado el rol antimicrobiano de estas especies en vías respiratorias [136].

Otros posibles actores en la inmunidad de mucosas que también hemos evaluado son las especies reactivas del nitrógeno (RNS), las cuales son producidas por la Óxido Nítrico Sintasa 2 (NOS2) [137, 138]. Diversos patógenos desde bacterias hasta hongos, protozoos y helmintos han mostrado susceptibilidad a los efectos citotóxicos y citocidas de las RNS. En particular, se ha demostrado la susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a los RNS producidos por los macrófagos activados vía  $\text{INF-}\gamma$  y  $\text{TNF-}\alpha$  o por tratamiento con LPS de *Escherichia coli* [139, 140].

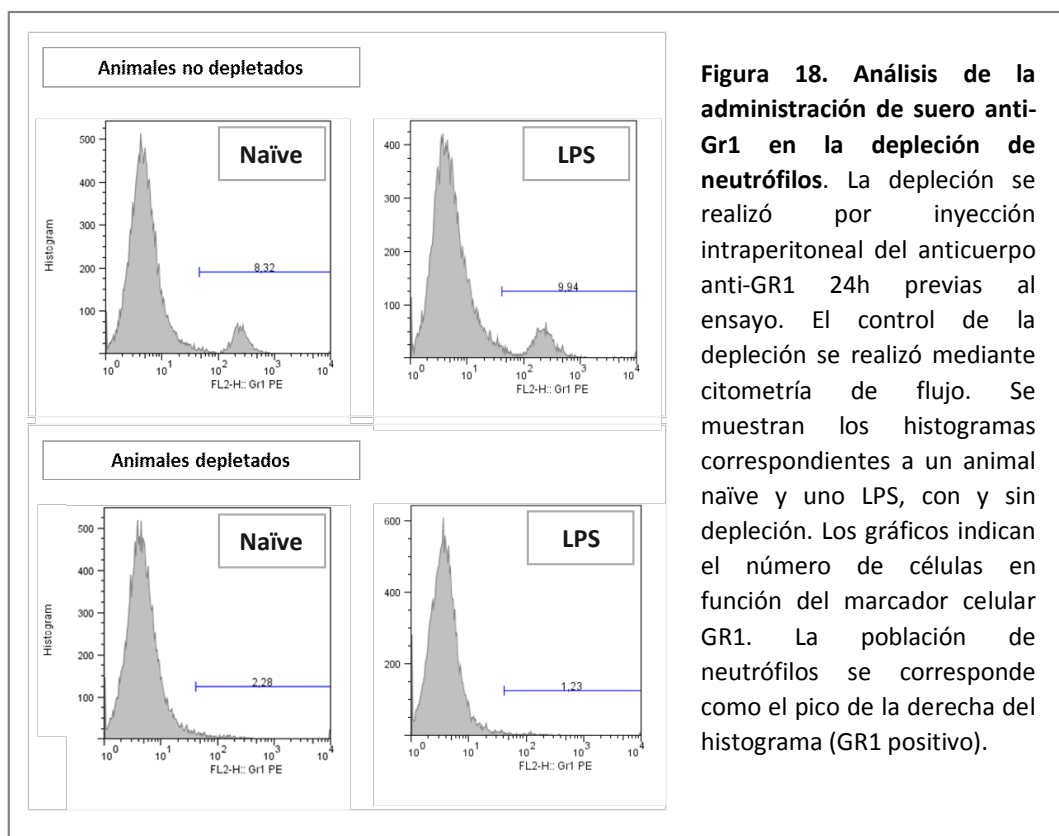
## RESULTADOS

### Rol de los neutrófilos en el escenario StIR para *B. pertussis*

En los ensayos antes descritos observamos que después del tratamiento con LPS administrado por vía intranasal no se detectan cambios significativos en la población de los macrófagos alveolares pero si en los neutrófilos, caracterizados por la expresión de marcadores  $\text{CD11c}^- \text{CD11b}^+ \text{Ly6G}^+ \text{Gr1}^+$ . El reclutamiento en las vías respiratorias de los neutrófilos se detectó ya a las 2 h post tratamiento. Debido a que la infiltración de neutrófilos podría ser esencial para la acción del LPS sobre la eliminación de *B. pertussis* decidimos analizar el impacto de la depleción de esta población celular por el tratamiento con anti-Gr1. El anticuerpo anti-Gr1 depleta los

neutrófilos Ly6G<sup>+</sup> así como también los monocitos pro-inflamatorios. Para este estudio empleamos así dos grupos de 4 animales los cuales fueron inyectados intraperitonealmente con el anticuerpo anti-GR1 para inducir la depleción de la población de neutrófilos. A las 24h post tratamiento con el anticuerpo los animales fueron infectados con una suspensión de *B. pertussis* ( $5 \times 10^7$  UFC) en presencia y ausencia de 1  $\mu$ g de LPS. Veinticuatro horas después analizamos la colonización pulmonar de *B. pertussis* mediante el recuento en placa de las unidades formadoras de colonia recuperadas de los pulmones. Como control se utilizaron dos grupos de ratones naïve sin depleción que fueron tratados con una suspensión de *B. pertussis* con y sin coadministración de LPS (1  $\mu$ g).

En la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos del control de depleción medido en una suspensión de esplenocitos. En dicha Figura presentamos los



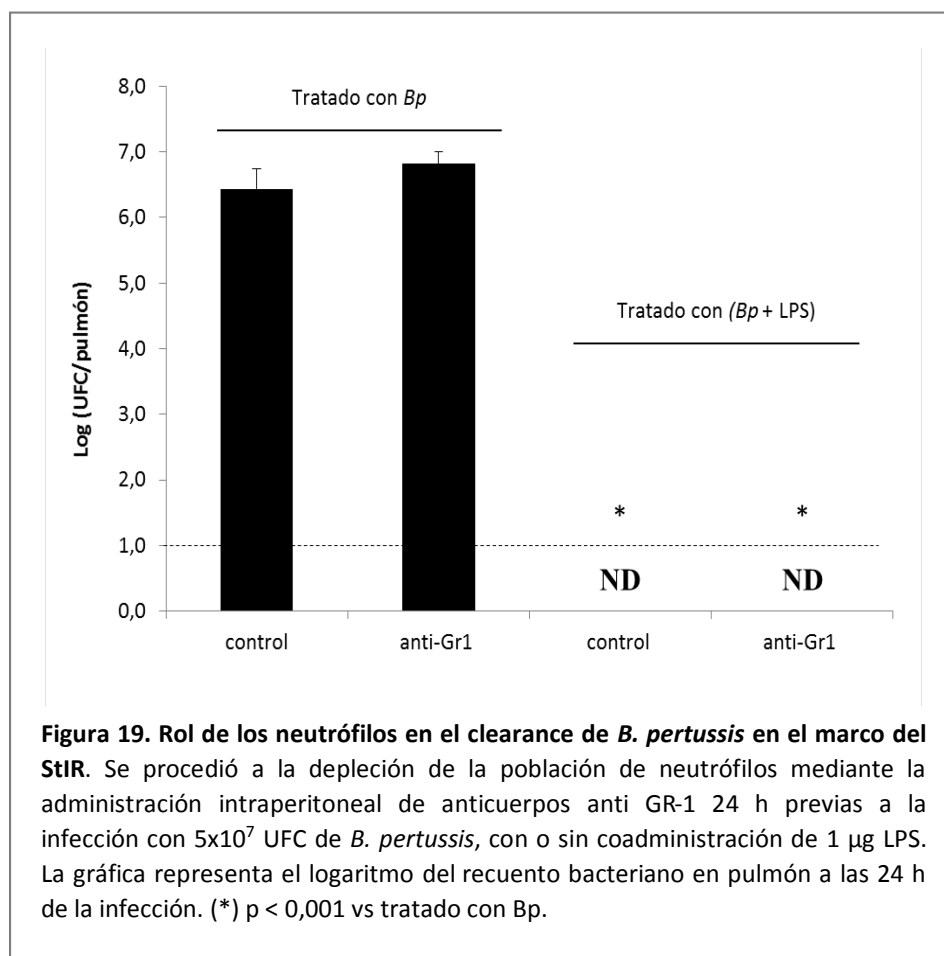
**Figura 18. Análisis de la administración de suero anti-Gr1 en la depleción de neutrófilos.** La depleción se realizó por inyección intraperitoneal del anticuerpo anti-GR1 24h previas al ensayo. El control de la depleción se realizó mediante citometría de flujo. Se muestran los histogramas correspondientes a un animal naïve y uno LPS, con y sin depleción. Los gráficos indican el número de células en función del marcador celular GR1. La población de neutrófilos se corresponde como el pico de la derecha del histograma (GR1 positivo).

histogramas obtenidos para los animales tratados y no tratados con el anticuerpo anti-GR1. El grupo control recibió un tratamiento con el vehículo usado en la suspensión del anticuerpo. Resultados previos del grupo validaron la capacidad deplecante de este anticuerpo en forma comparativa con un anticuerpo monoclonal no relacionado [123].

En la Figura 18 se presentan los resultados correspondientes al grupo de animales naïve y los correspondientes a los animales tratados con LPS.

Los datos obtenidos permitieron confirmar que los animales que no fueron tratados con el antisuero anti-Gr1 presentan dos picos, uno correspondiente a la población neutrofílica (GR1 positivo, ubicado a la derecha de la Figura 18). Por el contrario en los animales tratados con el antisuero no presentan el pico correspondiente a los neutrófilos (células GR1<sup>+</sup>). Todos estos resultados confirman la efectiva acción del AcMo anti Gr1 en la depleción de la población de neutrófilos.

Habiendo verificado la efectividad de la depleción, procedimos luego a la evaluación del efecto de la depleción de neutrófilos sobre la colonización de *B. pertussis*. Los resultados sobre los recuentos de las colonias recuperadas de los pulmones se graficaron en la Figura 19 como logaritmo del recuento de colonias de *B. pertussis* en función de los diferentes tratamientos. En toda la presente serie de experimentos de desafío con *B. pertussis*, se realizó el control de depleción sobre



**Figura 19. Rol de los neutrófilos en el clearance de *B. pertussis* en el marco del StIR.** Se procedió a la depleción de la población de neutrófilos mediante la administración intraperitoneal de anticuerpos anti GR-1 24 h previas a la infección con  $5 \times 10^7$  UFC de *B. pertussis*, con o sin coadministración de  $1 \mu\text{g}$  LPS. La gráfica representa el logaritmo del recuento bacteriano en pulmón a las 24 h de la infección. (\*)  $p < 0,001$  vs tratado con Bp.

esplenocitos de bazo. En la Figura 19 se puede observar que para los animales infectados con *B. pertussis* encontramos que la colonización ocurre exitosamente tanto en ausencia de la población de neutrófilos como en presencia de la misma, presentado niveles de colonización comparables para ambos grupos. Por su parte, para los animales naïve que recibieron el tratamiento con LPS al momento de la infección, como era esperable no se detectaron bacterias viables en pulmón a las 24h de la infección. Sorprendentemente, encontramos que la depleción de las células Gr1<sup>+</sup> no afectó la acción del LPS respecto a la eliminación de *B. pertussis*. Estos resultados ponen así de manifiesto que la estimulación de la vía TLR-4 evita la infección por *B. pertussis* a nivel de pulmón por un mecanismo independiente de la presencia de neutrófilos.

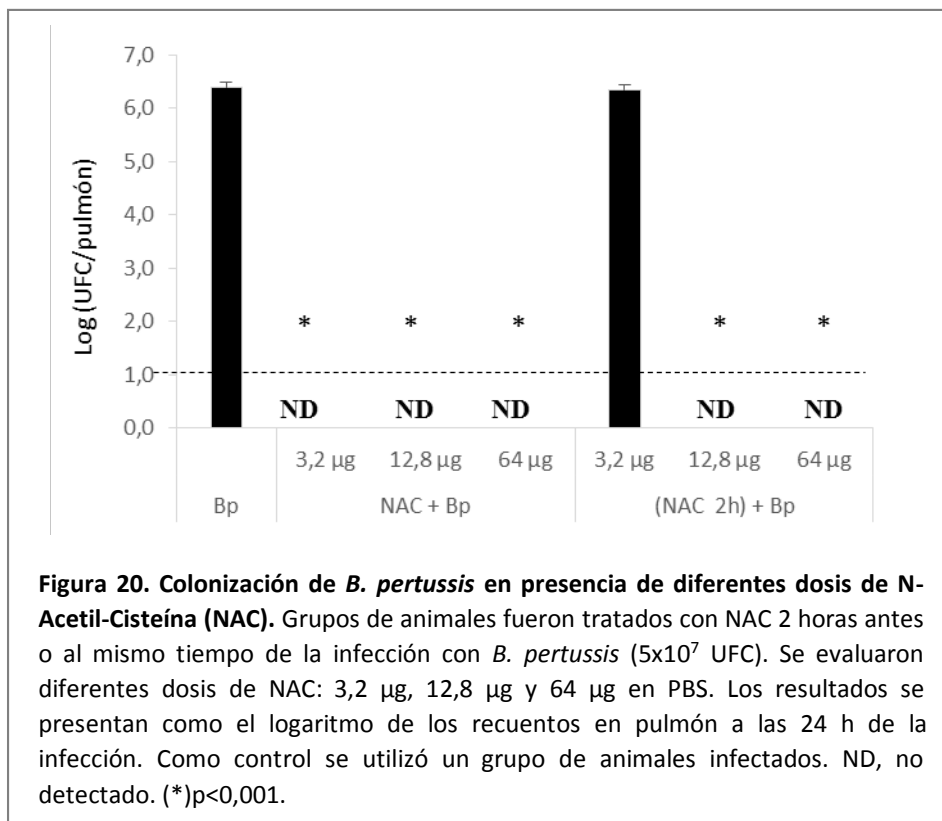
### **Evaluación del rol las especies reactivas del oxígeno (ROS) en la eliminación de *B. pertussis***

Para evaluar el posible papel de los radicales libres en el fenómeno StIR inducido por el LPS, realizamos ensayos *in vivo* empleando un antioxidante utilizado terapéuticamente en enfermedades pulmonares inflamatorias. El antioxidante elegido para el ensayo fue N-acetil-cisteína (NAC) sobre el que se sabe es precursor del glutatión (GSH), el antioxidante fisiológico más importante. Se ha demostrado que GSH en su estado reducido protege las células del daño mediado por peróxido de hidrógeno y frente a desafíos oxidativos producidos por radicales libres [141].

Primeramente evaluamos las condiciones más adecuadas para la administración del NAC, de manera tal que no perturbe el curso normal de la infección por *B. pertussis*. Para ello por un lado evaluamos el efecto del distintas cantidades de NAC seleccionadas en base a datos de bibliografía [141-143] sobre el crecimiento *de B. pertussis in vitro*. Luego a partir de las cantidades de NAC que fueron confirmadas en cuanto a que no afectaran la multiplicación de *B. pertussis in vitro* realizamos ensayos *in vivo*. Para ellos empleamos grupos de animales que fueron infectados con *B. pertussis* ( $5 \times 10^7$  UFC) en presencia de diferentes dosis de NAC: 3,2µg, 12,8 µg y 64µg. Estas dosis fueron ensayadas también en cuanto al momento de administración. En particular evaluamos la administración del NAC por vía intranasal 2h antes o al mismo

tiempo que la administración de la suspensión bacteriana. Para los ensayos *in vivo* se incluyó un grupo de animales control que fueron infectados por *B. pertussis* pero en ausencia de NAC. El efecto del NAC se evaluó a través del recuento de las colonias de *B. pertussis* recuperadas de los pulmones de los animales tratados a las 24h post tratamiento.

Estos experimentos se realizaron al menos 3 veces en ensayos independientes. En la Figura 20 se muestran los resultados de recuento obtenidos para los distintos tratamientos ensayados. Se puede observar que en aquellos tratamientos en los que se incluyó NAC en las dosis de 12,8 y 64  $\mu\text{g}$ , independientemente del momento de su administración, el nivel de colonización de *B. pertussis* en pulmón se ve fuertemente afectado. Para estos tratamientos no se detectaron colonias de *B. pertussis* en los pulmones de los animales tratados. Por el contrario, los resultados obtenidos con la dosis más baja de NAC (3,2  $\mu\text{g}$ ) muestran que cuando la misma es administrada 2 h previas a la infección no afecta la colonización por *B. pertussis*, obteniéndose recuentos similares a los obtenidos en la condición control en la que sólo se infectó a los animales. En base a los resultados obtenidos decimos utilizar como esquema de trabajo la administración de 3,2  $\mu\text{g}$  de NAC dos horas antes de la infección para los



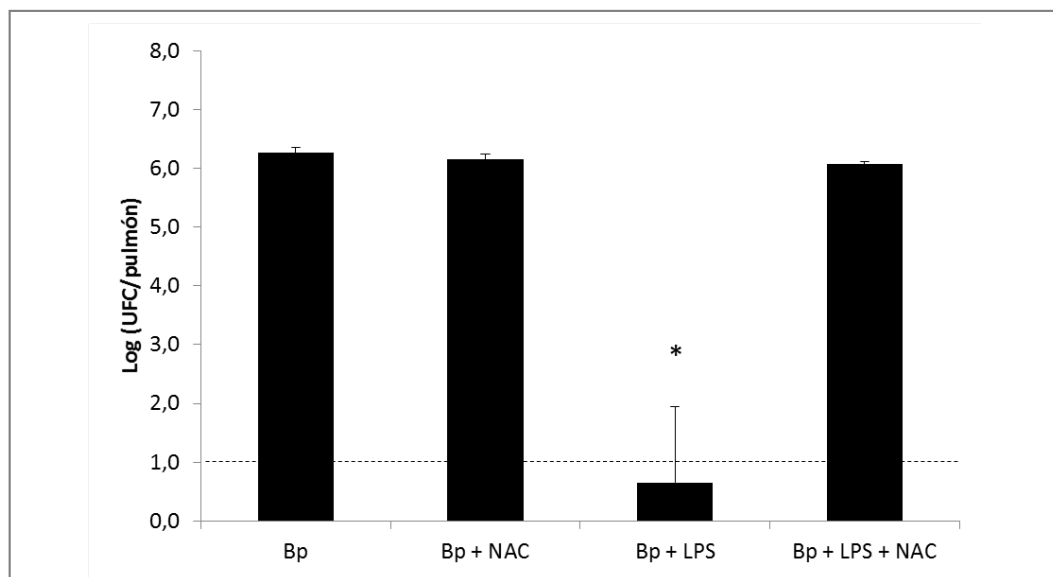


ensayos subsiguientes.

Habiendo establecido las condiciones de trabajo (NAC 3,2  $\mu\text{g}$  administradas 2 h antes de la infección) realizamos entonces ensayos *in vivo* con el objetivo de evaluar el posible papel de los radicales libres en el fenómeno STIR que desencadena el LPS. Para ello se utilizaron 4 grupos de animales los cuales recibieron respectivamente por vía intranasal los siguientes tratamientos:

- 1- Bp: una suspensión de *B. pertussis* ( $5 \times 10^7$  UFC) (control de infección)
- 2- Bp+NAC: una solución conteniendo NAC (3,2  $\mu\text{g}$  NAC) y 2 h después una suspensión de *B. pertussis* ( $5 \times 10^7$  UFC).
- 3- BP+LPS: una suspensión de *B. pertussis* ( $5 \times 10^7$  UFC) suplementada con 1  $\mu\text{g}$  LPS (inducción del fenómeno StIR)
- 4- Bp+NAC+LPS: una solución conteniendo NAC (3,2  $\mu\text{g}$  NAC) y LPS (1  $\mu\text{g}$ ) y 2 h después una suspensión de *B. pertussis* ( $5 \times 10^7$  UFC).

A las 24 h posteriores a cada tratamiento, los animales de los distintos grupos fueron sacrificados para realizar los recuentos de las UFC recuperadas de los



**Figura 21. Rol de las especies reactivas al oxígeno en el StIR inducido por LPS.** Grupos de 4 animales fueron tratados por vía intranasal con 40  $\mu\text{l}$  de una solución conteniendo (3,2  $\mu\text{g}$  NAC+1  $\mu\text{g}$  LPS) o 3,2  $\mu\text{g}$  NAC. Luego de 2 h fueron infectados con una suspensión de *B. pertussis* ( $5 \times 10^7$  UFC). A las 24 h se extrajeron los pulmones para recuento de colonias. Los resultados se presentan como el logaritmo del recuento de colonias para los diferentes tratamientos. Como controles se utilizaron un grupo sin tratamiento y otro tratado con LPS dos horas antes de la infección. (\*)  $p < 0.001$  vs grupo control infectado.

pulmones. Los resultados que se muestran en la Figura 21 son representativos de tres ensayos independientes. Como puede observarse en la Figura, la infección por *B. pertussis* en las condiciones ensayadas fue exitosa ya que se recuperaron más de  $10^6$  UFC de los pulmones extraídos de los animales tratados únicamente con la suspensión bacteriana. Pudimos detectar también que la colonización no se vio afectada por el tratamiento con antioxidante ya que los recuentos alcanzados para el tratamiento Bp+NAC fueron similares a los obtenidos para el tratamiento *B. pertussis*. Confirmando los resultados anteriormente obtenidos, la administración de 1  $\mu$ g de LPS logra evitar la colonización de *B. pertussis*, no pudiendo recuperarse bacterias viables a las 24 h del tratamiento. Interesantemente, al analizar el recuento de bacterias viables para el grupo de animales estimulado con LPS en presencia del antioxidante encontramos que el mismo no presenta diferencias significativas respecto del grupo control de animales infectados. Estos resultados muestran que la presencia de NAC interfiere en la eliminación de *B. pertussis* mediada por LPS.

Para descartar un posible efecto directo del NAC sobre la molécula de LPS, se repitieron los mismos ensayos modificando la cinética de administración del agonista respecto del antioxidante. De esta manera se evaluó el recuento de colonias en pulmón de grupos tratados con LPS 2 h antes de la administración del NAC (en lugar de la coadministración). Los resultados obtenidos en respuesta al tratamiento con el antioxidante NAC administrado en simultáneo o diferido con el LPS no presentan diferencias significativas entre sí, recuperándose para ambas condiciones más de  $10^6$  UFC por pulmón.

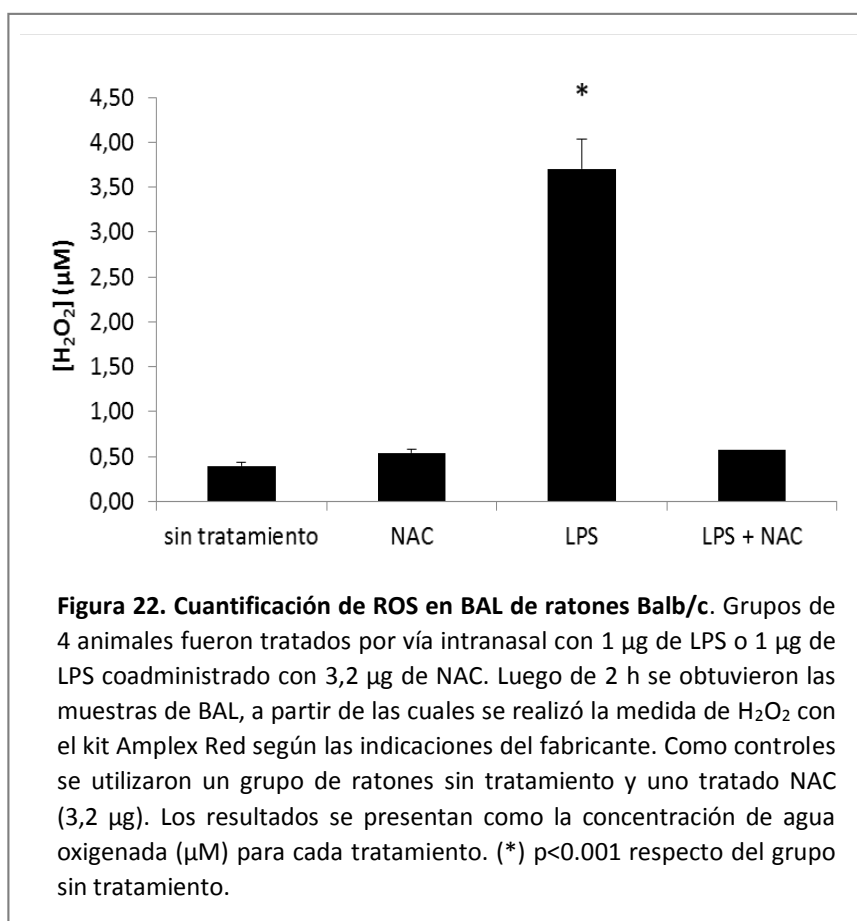
Todos estos resultados muestran que el efecto antioxidante ejercido por la presencia del NAC en la concentración ensayada es suficiente para evitar el fenómeno StIR inducido por el LPS. Estos resultados sugieren que los radicales libres eliminados por la acción del NAC tendrían un rol clave en el fenómeno inducido por el LPS. Para evaluar esta hipótesis decidimos analizar los niveles de un indicador de la generación de especies reactivas del oxígeno ROS en el BAL de los ratones tratados con LPS y LPS+NAC. El indicador evaluado fue el  $H_2O_2$  que fue cuantificada empleando el kit Amplex Red hydrogen peroxide/ peroxidase assay (Invitrogen) el cual consta de un

reactivo incoloro que en presencia de agua oxigenada es convertido en el producto fluorescente resorufin por acción de la enzima peroxidasa (HRP) [144, 145]

Para la realización del ensayo aquí propuesto empleamos grupos de 4 animales de la cepa Balb/c los cuales fueron tratados con 1  $\mu\text{g}$  de LPS o con 1  $\mu\text{g}$  de LPS coadministrado con NAC (3,2  $\mu\text{g}$ ). Luego de 2 h los animales fueron sacrificados de forma de poder colectar los BAL mediante instilación intratraqueal con 1 ml de PBS estéril. A partir de las muestras así obtenidas se realizó la determinación de agua oxigenada. Como control empleamos a un grupo de animales sin tratamiento y uno tratado con NAC (3,2  $\mu\text{g}$ ).

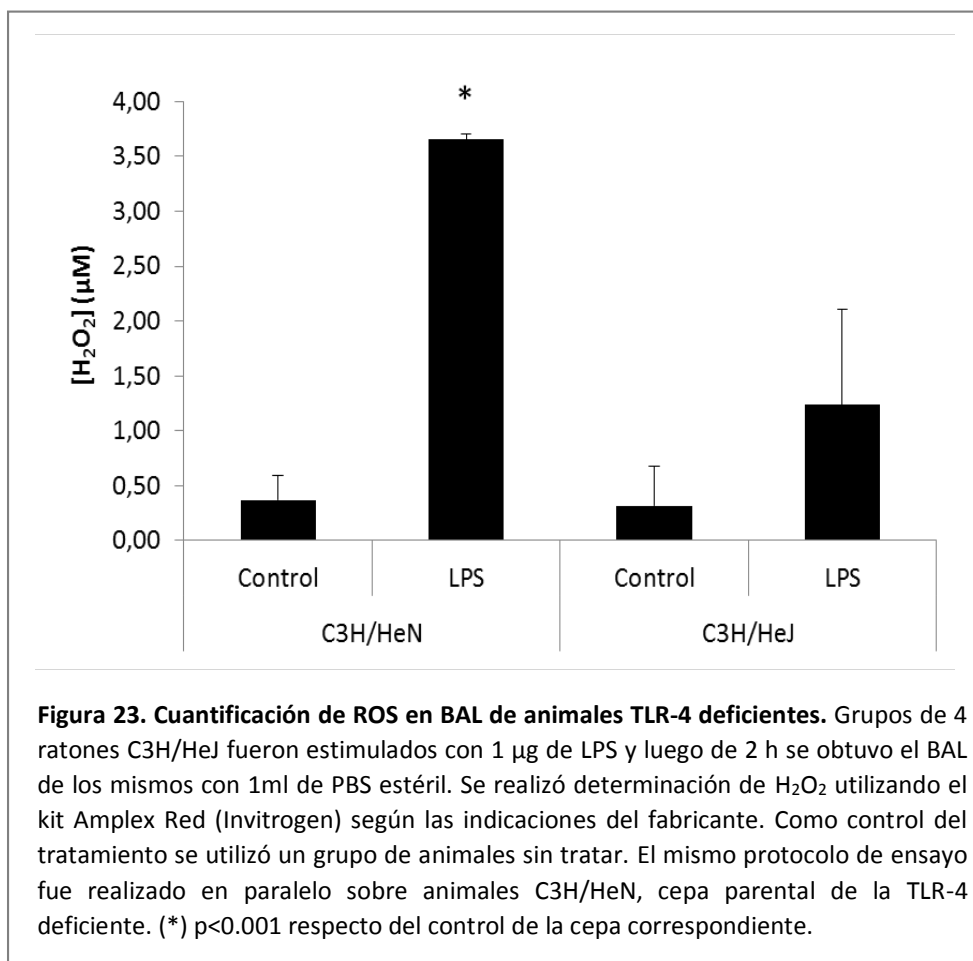
Los resultados obtenidos para los grupos ensayados se presentan en la Figura 22 en la que se grafica la concentración de agua oxigenada ( $\mu\text{M}$ ) detectada en los BAL obtenidos a las 2 h posteriores de cada tratamiento.

Como puede observarse en la Figura 22, la concentración de agua oxigenada presente en el BAL de los animales tratados con NAC ( $0,54 \mu\text{M} \pm 0,03$ ) no presenta



diferencias significativas respecto de la determinada en los BAL de los animales naïve (sin tratamiento,  $0,40 \mu\text{M} \pm 0,04$ ). Por el contrario, en el grupo estimulado con LPS pudimos observar un incremento significativo en la producción de ROS, encontrado concentraciones del orden de  $3,70 \mu\text{M} \pm 0,3$ . Al analizar los BAL obtenidos a partir de los animales tratados con LPS en presencia de NAC encontramos que la producción de agua oxigenada resultó ser similar a la de los animales control. Estos resultados muestran que la administración de NAC bloquea la producción de ROS inducida por el LPS.

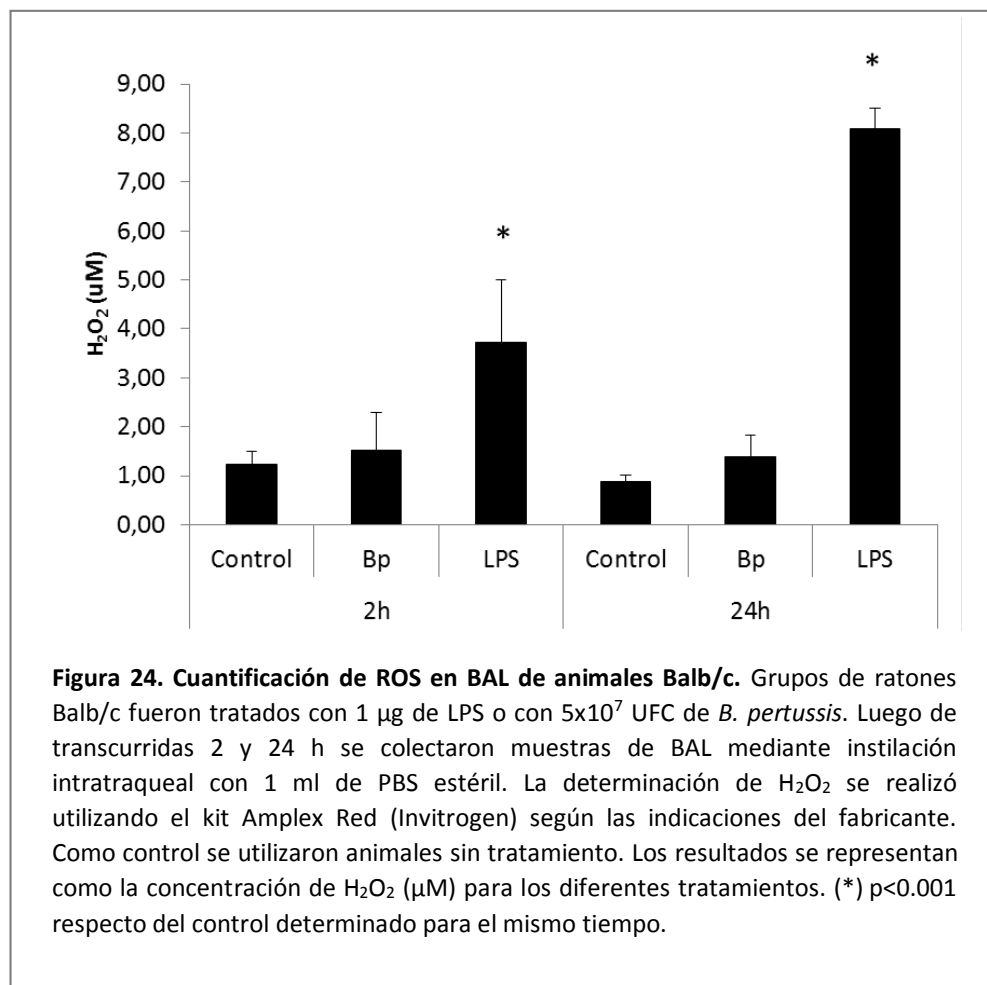
Para corroborar que la respuesta de ROS detectada en el BAL de los animales Balb/c se debe efectivamente a la estimulación de la vía de señalización Toll 4 decidimos repetir los experimentos empleando una cepa de ratón TLR-4 deficientes (cepas C3H/HeJ). Sobre este grupo de ratones deficientes en la vía de señalización TLR-4 se administró LPS ( $1 \mu\text{g}$ ) y luego de 2 h se realizó el lavado broncoalveolar con 1 ml de PBS estéril. Como control se utilizó un grupo de animales sin tratamiento a partir de



los cuales se obtuvieron los BAL correspondientes. Las determinaciones de los niveles de agua oxigenada se presentan en la Figura 23. Allí se incluyen además los resultados obtenidos en la cepa parental TLR4<sup>+</sup> (cepas C3H/HeN). Los resultados alcanzados muestran que la concentración de agua oxigenada en el BAL de los animales TLR4<sup>+</sup> tratados con LPS resulta diez veces mayor que la determinada en los animales sin tratamiento. Por el contrario, en la cepa TLR-4 deficiente no pudimos evidenciar diferencias significativas en las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de los animales tratados con LPS y los animales control.

### Evaluación del rol de los ROS en la inducción del fenómeno StIR desencadenado por el LPS

Resulta evidente, a partir de las medidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el BAL de los animales tratados con LPS, que la activación de la vía TLR-4 desencadena la liberación de



especies reactivas del oxígeno. Nos preguntamos entonces si este incremento de los ROS ocurre también durante la infección por *B. pertussis* ya dicha bacteria contiene niveles apreciables de LPS. Evaluamos la producción de ROS a las 2 h y 24 h en el BAL de animales tratados intranasalmente con 1 µg LPS o con una suspensión de *B. pertussis* ( $5 \times 10^7$  UFC). Los resultados expresados como la concentración de agua oxigenada en BAL de los ratones (µM) se presentan en la Figura 24. En esta Figura podemos observar que la concentración de agua oxigenada en el BAL de los animales tratados con LPS resultó ser significativamente mayor que la encontrada para animales control, tanto para las 2 h ( $3,73 \pm 1,26$  µM vs  $1,23 \pm 0,27$  µM) como para las 24 h ( $8,09 \pm 0,42$  µM vs  $0,88 \pm 0,13$  µM) posteriores al tratamiento. Es interesante notar que a las 24 h post-estimulación con el LPS no sólo se mantiene la producción de agua oxigenada, sino que se encuentra claramente exacerbada respecto a los niveles hallados a las 2 h post tratamiento ( $p < 0.001$ ). Por el contrario, la infección por *B. pertussis* parece no estimular la producción de agua oxigenada encontrándose concentraciones similares a las detectadas en el grupo control para los dos tiempos ensayados: 2 h ( $1,52 \pm 0,77$  µM) y 24 h ( $1,39 \pm 0,42$  µM).

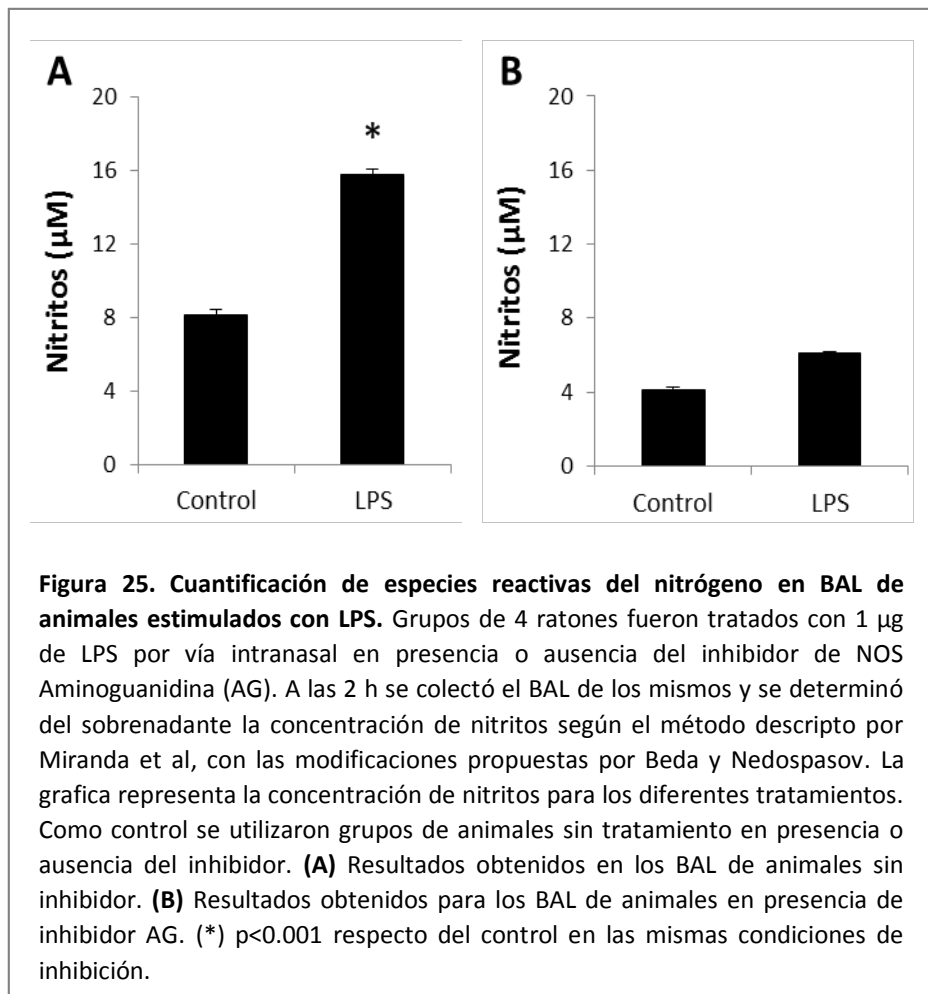
### **Cuantificación de especies reactivas del nitrógeno en BAL**

A continuación decidimos evaluar si en respuesta a la estimulación de la vía de señalización TLR-4 también se induce un incremento en la producción de especies reactivas del nitrógeno (RNS) a nivel de pulmón. Las RNS son una familia de moléculas antimicrobianas derivadas del óxido nítrico (NO) que se producen a través de una reacción catalizada enzimáticamente por la Óxido Nítrico Sintasa 2 (NOS2) [137, 138]. Se ha reportado que este enzima se expresa en macrófagos en respuesta a citoquinas (interferón gamma) y también por productos microbianos como el LPS [146-148].

Para la cuantificación de los RNS en los animales tratados con LPS se utilizó la metodología descrita por Miranda y colaboradores, con las modificaciones propuestas por Beda y Nedospasov [149, 150]. Esta metodología que permite determinar la presencia de nitritos/nitratos en el BAL de los animales tratados fue utilizada en grupos de 4 ratones que fueron tratados con 1 µg de LPS por vía

intranasal. El lavado broncoalveolar fue obtenido a las 2 h posteriores del tratamiento con LPS. Las determinaciones de RNS se realizaron sobre los sobrenadantes de los BAL. Como condición control se utilizó un grupo de animales sin tratamiento. Para darle robustez a los resultados hallados, los ensayos fueron realizados en presencia y ausencia de un inhibidor *in vivo* de la actividad de la Óxido Nítrico Sintasa, la Aminoguanidina (AG). Los resultados que se presentan en la Figura 25 son representativos de tres ensayos realizados de manera independiente. La concentración de nitritos ( $\mu\text{M}$ ) fue evaluada en cada uno de los tratamientos. Del análisis de la Figura se desprende que en el sobrenadante del BAL de los animales control existe una producción basal de RNS con concentraciones del orden de  $8,1 \pm 0,3 \mu\text{M}$ . En respuesta al tratamiento con LPS pudimos evidenciar que la concentración de nitritos se duplica respecto de la condición control, alcanzando valores de  $15,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ .

En el panel B de la Figura 25 se presentan los resultados obtenidos en presencia del inhibidor de la enzima Óxido Nítrico Sintasa. Las concentraciones determinadas en



el sobrenadante de BAL para el grupo control y para el grupo tratado con LPS no presentan diferencias significativas entre sí ( $p < 0,001$ ). Estos resultados confirman que el incremento de los RNS evidenciado en respuesta al tratamiento con LPS se debe a la estimulación de la enzima Óxido Nítrico Sintasa.

### **Rol de las Especies reactivas al nitrógeno en el StIR**

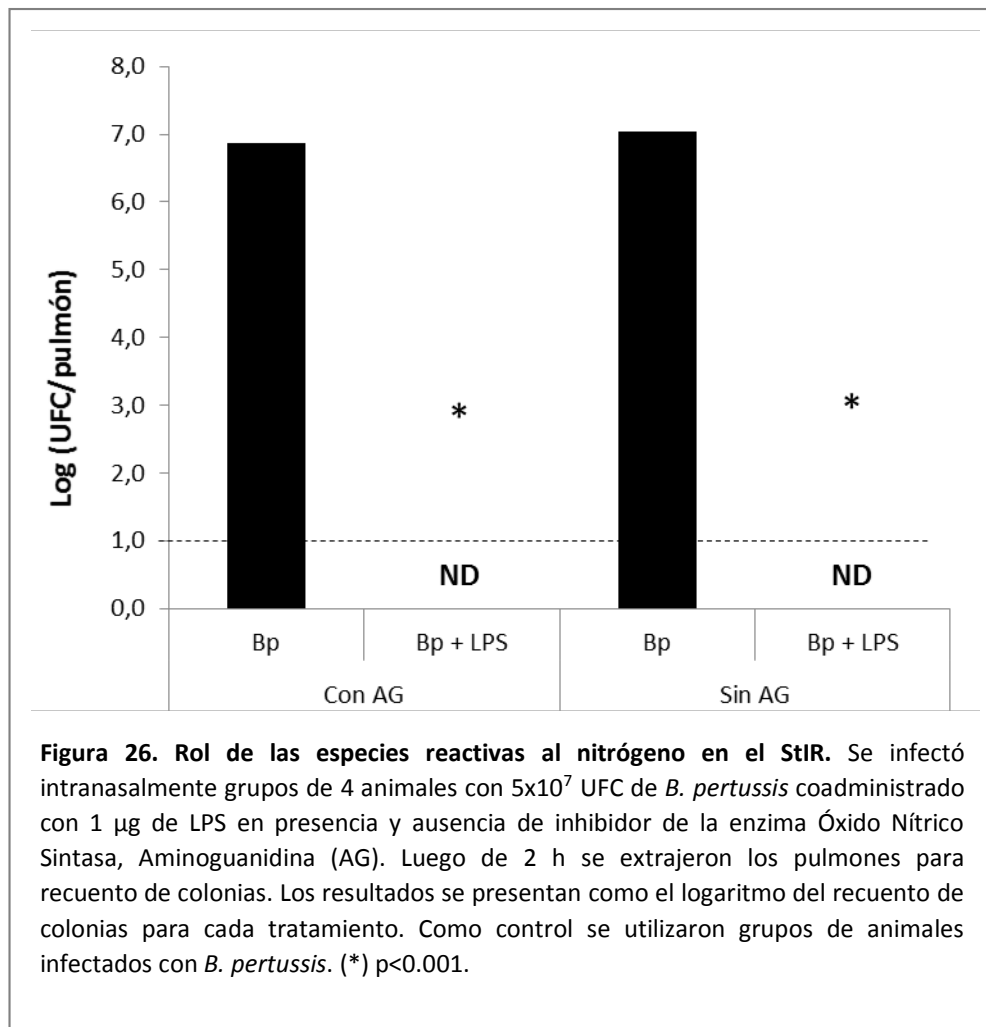
Habiendo determinado que la administración de LPS efectivamente estimula la producción de las especies reactivas del nitrógeno, y contando un inhibidor capaz de abrogar la síntesis de RNS, decidimos evaluar el rol que cumplen los RNS en el marco del fenómeno StIR.

Para este fin, realizamos ensayos *in vivo* empleando grupos de ratones que fueron infectados por vía intranasal con  $5 \times 10^7$  UFC de *B. pertussis* coadministrado con 1  $\mu$ g de LPS en presencia o ausencia del inhibidor AG (administrado por inyección intraperitoneal dos horas antes). Como control utilizamos grupos de animales que fueron infectados por vía intranasal con  $5 \times 10^7$  UFC de *B. pertussis* y previamente tratados con el inhibidor. También incluimos un grupo de ratones que sólo fueron tratados con una suspensión de *B. pertussis*  $5 \times 10^7$  UFC. Como en los casos anteriores, el efecto de las especies RNS se evaluó mediante el análisis comparativo de los recuentos de las colonias recuperadas de los pulmones a las 2h post infección con *B. pertussis*. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 26 donde se grafica el logaritmo del recuento de colonias en pulmón para cada tratamiento.

Los datos presentados muestran que a nivel de pulmón la colonización de *B. pertussis* no se ve afectada por la ausencia de los NOS, pudiendo recuperarse más de  $10^6$  UFC a partir de los pulmones de los animales infectados tanto en presencia como en ausencia del inhibidor.



Al analizar los resultados obtenidos para los animales estimulados con LPS encontramos que no se detectan bacterias viables en pulmón a las 2 h de la infección independientemente de la disponibilidad de especies reactivas del nitrógeno a nivel de la cavidad broncoalveolar. Estos resultados en su conjunto sugieren que las especies RNS no juegan un rol esencial en la eliminación de *B. pertussis* inducida por el LPS.



## DISCUSIÓN

A lo largo de esta sección nos propusimos evaluar posibles mecanismos que permiten la eliminación de *B. pertussis* del tracto respiratorio en respuesta a la estimulación con el agonista TLR-4.

A partir del análisis de las poblaciones celulares presentes en pulmón habíamos encontrado que en respuesta al tratamiento con LPS, al igual que lo que ocurre frente

a la infección con *B. pertussis*, se producía un reclutamiento de neutrófilos hacia la cavidad broncoalveolar. Trabajos publicados por nosotros y otros grupos de trabajo han podido demostrar que para este reclutamiento es importante la vía de señalización del receptor TLR-4 y que la población neutrofílica es clave en el control de las infecciones producidas por *B. pertussis* [123, 131]. En base a estos resultados decidimos evaluar el rol que cumplen los neutrófilos en el marco del fenómeno StIR mediante la depleción de la población de interés con anticuerpos monoclonales. Los resultados obtenidos mostraron que a pesar de que los neutrófilos son reclutados a la cavidad broncoalveolar en respuesta a la estimulación con LPS, la ausencia de los mismos no evita la eliminación de *B. pertussis* por estimulación con el agonista Toll. Resultados similares a los aquí presentados se han obtenido para otros patógenos tales como *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *N. meningitidis* y *F. tularensis* para los que se ha evidenciado también el fenómeno StIR [78, 79, 151-153]

Existen, a nivel de pulmón, diversos mecanismos involucrados en la producción de sustancias antimicrobianas por acción de neutrófilos, macrófagos alveolares y las células epiteliales. Estas últimas, además de actuar como barrera de protección, contribuyen directamente mediante la secreción de INF tipo I, lactoferrina,  $\beta$ -defensinas y óxido nítrico [154]. Diversos trabajos sugieren la posibilidad de que la estimulación de la vía de señalización TLR podría involucrar la secreción de péptidos antimicrobianos y/o radicales libres [78, 79, 81].

En base a las evidencias reportadas en el contexto de otros patógenos, decidimos evaluar la presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS) como efectores microbicidas de acción rápida que podrían mediar el efecto inducido por el LPS. Primeramente evaluamos el efecto que tiene sobre la eliminación de *B. pertussis* en el marco del StIR la administración de un antioxidante capaz de inhibir la producción de ROS a nivel pulmonar. El antioxidante elegido fue N-acetil-cisteína el cual es un precursor del glutatión capaz de proteger a las células del daño mediado por peróxido de hidrógeno *in vivo* [141]. Nuestros resultados indican que los radicales libres participan en la protección contra *B. pertussis* (Figura 21). De acuerdo con estos resultados, después del tratamiento LPS se detecta un aumento ROS en el lavado broncoalveolar que podría ser suprimido por la administración de NAC (Figura 22). La

generación ROS dentro de los compartimentos intracelulares tales como los fagosomas se conoce desde hace décadas [135]. La producción de ROS en este compartimento ocurre gracias a la acción de NADPH oxidasa, con el fin de inactivar los microorganismos infecciosos que han sido fagocitados tras la activación celular.

La administración de NAC nos brindó una evidencia indirecta del rol que cumplen las especies reactivas del oxígeno en la eliminación de *B. pertussis*. Para analizar si efectivamente estas especies son inducidas por el LPS evaluamos los niveles de agua oxigenada en el BAL ya que es considerado un indicador de ROS a nivel de mucosas. De esta manera pudimos poner de manifiesto que en el pulmón de los animales tratados con el agonista TLR-4 la concentración de agua oxigenada es aproximadamente 10 veces superior a la encontrada en los animales control. Hemos observado también que para el grupo de animales tratados con LPS en presencia del antioxidante, la concentración de ROS fue del mismo orden que el grupo control. En concordancia con estos resultados, determinaciones de ROS en BAL de animales TLR-4 deficientes luego de su estimulación con LPS no mostraron incrementos en la concentración de agua oxigenada, corroborando que el incremento de ROS es Toll 4 dependiente.

El LPS es un componente ubicuo de la membrana de todas las bacterias Gram negativas y por ello es esperable que durante un proceso infeccioso ocurra la secreción de ROS a nivel de la cavidad broncoalveolar como parte de los mecanismos desencadenados para combatir la infección. Sin embargo, al analizar el BAL de animales infectados por *B. pertussis* luego de 2 y 24 h no se pudo detectar incrementos en la concentración de agua oxigenada respecto de los obtenidos para los animales sin infectar. Por el contrario, la producción de ROS en respuesta al tratamiento con LPS es evidente ya a las 2 h post tratamiento ( $3,73 \pm 1,26 \mu\text{M}$  vs  $1,23 \pm 0,27 \mu\text{M}$ ) y hasta por lo menos 24 h de administrado el estímulo ( $8,09 \pm 0,42 \mu\text{M}$  vs  $0,88 \pm 0,13 \mu\text{M}$ ). Estos resultados se corresponden con lo evidenciado en el marco de los ensayos realizados para evaluar la cinética del fenómeno StIR, en los cuales pudimos detectar que el tratamiento con LPS evita infección por *B. pertussis* aún si es administrado hasta 48 h antes de la infección.

Otros posibles actores descriptos en la inmunidad de mucosas con potencial acción microbicida son las especies reactivas del nitrógeno (RNS), las cuales son

producidas por la Óxido Nítrico Sintasa 2 (NOS2) [137, 138]. Para evaluar si la producción de las mismas participa en el clearance de *B. pertussis* realizamos ensayos *in vivo* en donde los ratones son estimulados con el agonista Toll y a las 2 h post tratamiento los animales son sacrificados para determinar la concentración de RNS en el BAL de los mismos. Los resultados alcanzados muestran que efectivamente en respuesta al tratamiento con LPS se induce la secreción de especies reactivas del nitrógeno en pulmón, llegando a duplicarse en comparación con los animales empleados como control. Sin embargo la depleción de los RNS, mediante el uso de un inhibidor de su síntesis *in vivo* no parece afectar la capacidad del LPS en abrogar la infección por *B. pertussis*, no detectándose bacterias viables recuperadas de los pulmones de animales tratados con LPS en presencia y ausencia del inhibidor de la Óxido Nítrico Sintasa.

En resumen, los resultados hasta aquí presentados muestran que en respuesta al tratamiento con el agonista TLR-4 se desencadenan una serie de mecanismos que implican tanto el reclutamiento de neutrófilos hacia la cavidad broncoalveolar, como la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. Sin embargo los ensayos realizados para cada uno de los posibles actores parecieran indicar que únicamente la producción de ROS media el fenómeno StIR capaz de evitar la infección por *B. pertussis*.

## RESULTADOS

Caracterización *in vitro*  
del fenómeno StIR en el  
marco de la infección por  
*Bordetella pertussis*



## INTRODUCCIÓN

Durante la primera parte del presente trabajo de Tesis pudimos corroborar la ocurrencia del fenómeno StIR en el marco de la infección por *B. pertussis* y comenzar a caracterizar el fenómeno que interesantemente logra evitar la infección por el patógeno. Los ensayos realizados nos permitieron poner de manifiesto que al estimular la mucosa respiratoria con un agonista de la vía de señalización TLR-4 se desencadena una respuesta compleja que implica el reclutamiento de neutrófilos hacia la cavidad broncoalveolar y la producción de especies reactivas del nitrógeno y del oxígeno. Sin embargo, sólo parte de esta respuesta detectada pareciera estar fuertemente involucrada en la eliminación de *B. pertussis* a nivel de pulmón. En el escenario StIR, ni los neutrófilos ni las especies reactivas al nitrógeno parecen estar involucradas en la eliminación bacteriana.

Surge entonces la pregunta sobre qué poblaciones celulares serían las principales responsables de censar la presencia del lipopolisacárido y desencadenar la producción de las especies reactivas del oxígeno. En este punto es importante recordar que en el espacio alveolar de los animales sin estimular, la población leucocitaria predominante son los macrófagos alveolares representando más del 80% de todas las células presentes. Las poblaciones de células dendríticas y de linfocitos T serían las siguientes poblaciones leucocitarias más abundantes [109]. Respecto de la población de macrófagos alveolares es bien sabido que la misma juega un rol central en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y en la defensa del huésped a través de mecanismos como la fagocitosis de antígenos extraños, el reclutamiento y la activación de células inflamatorias y la producción ROS y NOS entre otros [155-158]. En lo que se refiere a *B. pertussis*, en diversos trabajos se ha demostrado a través de ensayos *in vitro* la capacidad de esta población celular de mediar la endocitosis y la muerte de *B. pertussis* mediante la producción de óxido nítrico (NO) [159-161]. De hecho se ha podido establecer que los macrófagos frente a la estimulación con LPS entre otras acciones inducen la producción de óxido nítrico lo cual parece correlacionar con una menor supervivencia de *B. pertussis* intracelular [160, 162, 163].

Otra población celular que ha sido descrita en el control de la homeostasis del pulmón son las células del epitelio respiratorio. Las mismas no solo cumplen una

función de barrera mecánica frente a antígenos ambientales sino que también participan activamente mediante la secreción de un amplio abanico de moléculas efectoras como mucinas, péptidos antimicrobianos, proteína surfactante A y D, etc. Se ha evidenciado también que las células epiteliales participan en la respuesta frente a microorganismos mediante secreción de quimoquinas y citoquinas [164, 165] tales como interferones (IFN) de tipo I y III [166, 167] o mediante la secreción de diferentes mediadores que incrementan la supervivencia local de las células reclutadas en el proceso inflamatorio (factor estimulador granulocítico (G-CSF), factor estimulador de Granulocitos/macrófagos (GM-CSF) [168, 169]. Respecto de su capacidad para producir especies reactivas del oxígeno se ha propuesto que algunas enzimas del complejo DUOX se expresan en la membrana apical de las células epiteliales de la vía aérea liberando sus productos al compartimento extracelular [170, 171]. Interesantemente, en cultivos *in vitro* de células del epitelio bronquial se ha evidenciado que la presencia del sistema DUOX-LPO-SCN<sup>-</sup> (DUOX, Dual oxidasa; LPO, lactoperoxidasa; SCN<sup>-</sup>, hipotiocianato) permite eliminar diversas bacterias, como *Pseudomona aureginosa*, *Burkholderia cepacia* y *Staphylococcus aureus* [172, 173]. En lo que se refiere a la infección por *B. pertussis* poco es lo conocido respecto de la acción de esta población celular sobre la viabilidad de la bacteria. Sí se ha demostrado, a través de ensayos *in vitro*, que esta bacteria es capaz de invadir las células del epitelio respiratorio [174, 175] a través de un mecanismo de reconocimiento reportado para otros patógenos en el que intervienen microdominios de la membrana de las células epiteliales llamadas “lipid rafts” que son ricas en colesterol [174-184].

En este contexto y bajo la premisa planteada respecto de la identificación de las poblaciones celulares intervinientes en el fenómeno StIR decidimos realizar ensayos *in vitro* de estimulación de las células del epitelio pulmonar y de los macrófagos alveolares frente al tratamiento con el agonista TLR-4. En el caso de los ensayos con células del epitelio alveolar utilizamos la línea celular A549 la cual deriva de un carcinoma humano de células alveolares. Las mismas han sido ampliamente utilizadas en numerosos estudios funcionales debido a que mantienen muchas de las características de las células alveolares de tipo II normales [185-188].

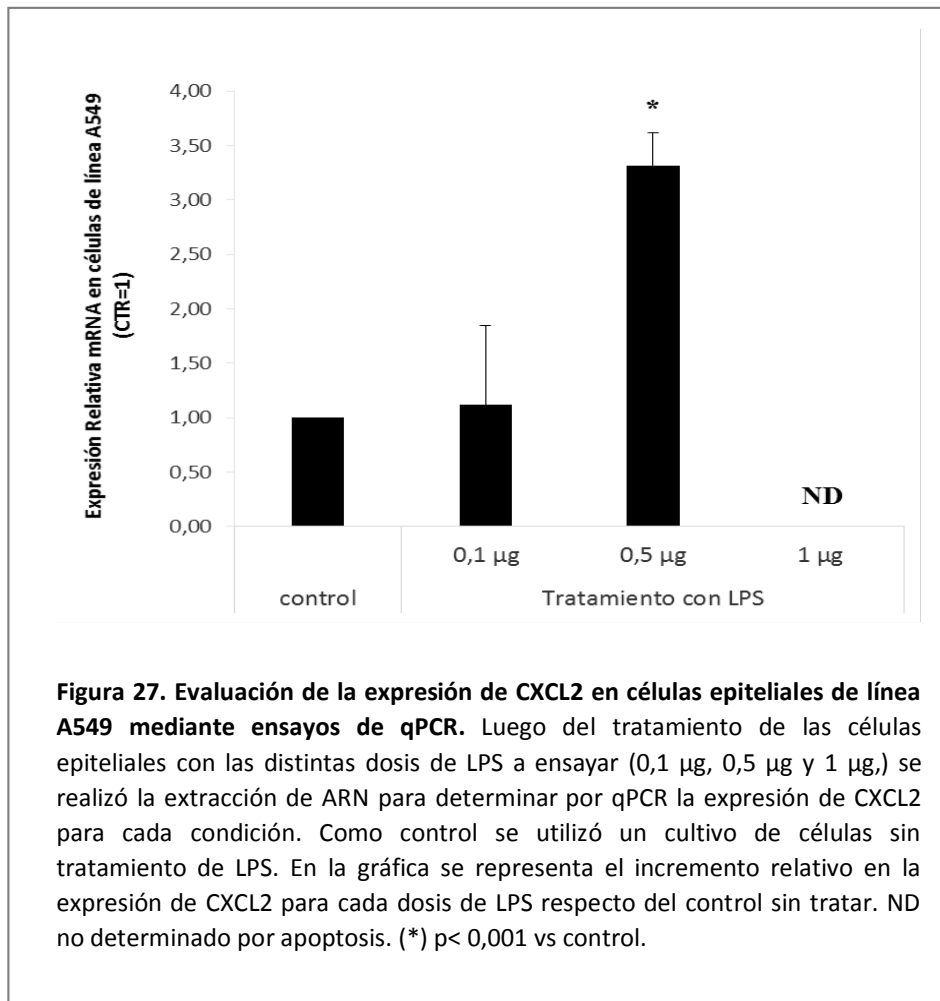


Para los ensayos con macrófagos empleamos los macrófagos alveolares extraídos a través del lavado broncoalveolar de ratones naïve. A continuación presentaré los resultados alcanzados en los ensayos propuestos.

## RESULTADOS

### Evaluación de la capacidad bactericida de las células epiteliales inducida por la presencia de LPS

Como primera etapa de nuestro trabajo realizamos una serie de ensayos con el objeto de poder ajustar las condiciones óptimas de estimulación de las células epiteliales A549 frente al LPS, de forma de lograr una respuesta celular adecuada sin llegar a inducir la apoptosis celular. Así, para establecer la dosis de LPS a emplear trabajamos con 0,1 µg, 0,5 µg y 1 µg de LPS. Estas cantidades fueron ensayadas sobre un cultivo de células epiteliales A549 ( $1 \times 10^5$  células/fosa 300 µl DMEM) crecidas en



placa al 70-80% de confluencia las cuales fueron incubadas por 1 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Como control negativo de estimulación se utilizaron células sin tratamiento de LPS incubadas en las mismas condiciones. El nivel de activación celular se determinó mediante cuantificación por qPCR de la citoquina pro-inflamatoria CXCL2.

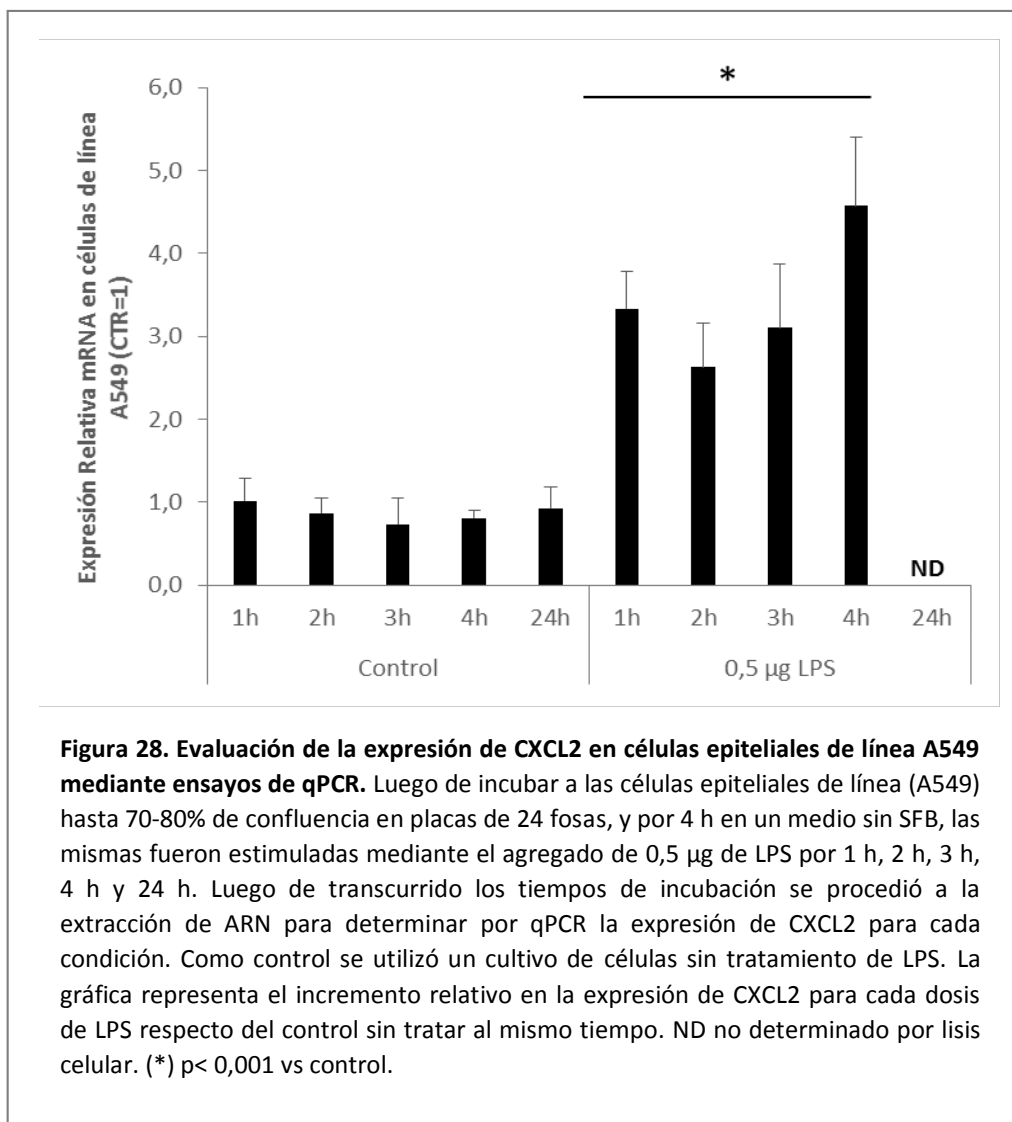
Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 27, en la que se grafica la expresión relativa de CXCL2 para cada una de las dosis de LPS evaluadas con respecto de la condición control sin LPS. Al analizar los resultados obtenidos encontramos que la expresión de CXCL2 en respuesta al tratamiento con 0,1 µg de LPS no presenta diferencias significativas respecto de las células no estimuladas. Por el contrario, la respuesta desencadenada frente al tratamiento con 0,5 µg de LPS lleva a un aumento relativo de alrededor de 3,5 veces respecto de las células no estimuladas ( $p < 0,001$ ). En las muestras obtenidas luego de la incubación con 1 µg de LPS no pudo cuantificarse el nivel de expresión de CXCL2 debido a que la cantidad de muestra recolectada fue insuficiente a causa de que en respuesta al tratamiento se indujo la apoptosis de las células en estudio, proceso evidenciado en la práctica por la pérdida de adherencia de las células epiteliales.

En base a estos resultados decidimos realizar los experimentos de inducción de la respuesta con 0,5 µg de LPS en un volumen final de 300 µl de medio de cultivo. Ya establecida la dosis de LPS a emplear, evaluamos luego la dependencia del nivel de respuesta de las células A549 respecto del tiempo de incubación con el agonista TLR-4. En particular evaluamos los siguientes tiempos de incubación del LPS (0,5 µg/300 µl) con las células de línea A549: 1 h, 2 h, 3 h, 4 h y 24 h. Luego de cada tiempo procedimos a la extracción de ARN para determinar el nivel de expresión de la citoquina CXCL2 para todas las condiciones. Como control negativo de estimulación se utilizaron células sin tratamiento de LPS incubadas por los mismos períodos de tiempo. Los resultados obtenidos se expresan como el incremento relativo de CXCL2 respecto del control para cada tiempo de incubación (Figura 28).

Al analizar los niveles de expresión de CXCL2 luego de los distintos tiempos de incubación ensayados observamos que para las incubaciones de 1 a 4 h los mismos no resultan significativamente diferentes entre sí pero si respecto del grupo control sin estimular para cada tiempo ( $p < 0,001$ ). Por el contrario, la estimulación del cultivo

celular con LPS durante 24 h lleva al daño celular por lo que no resulta posible hacer la extracción de ARN.

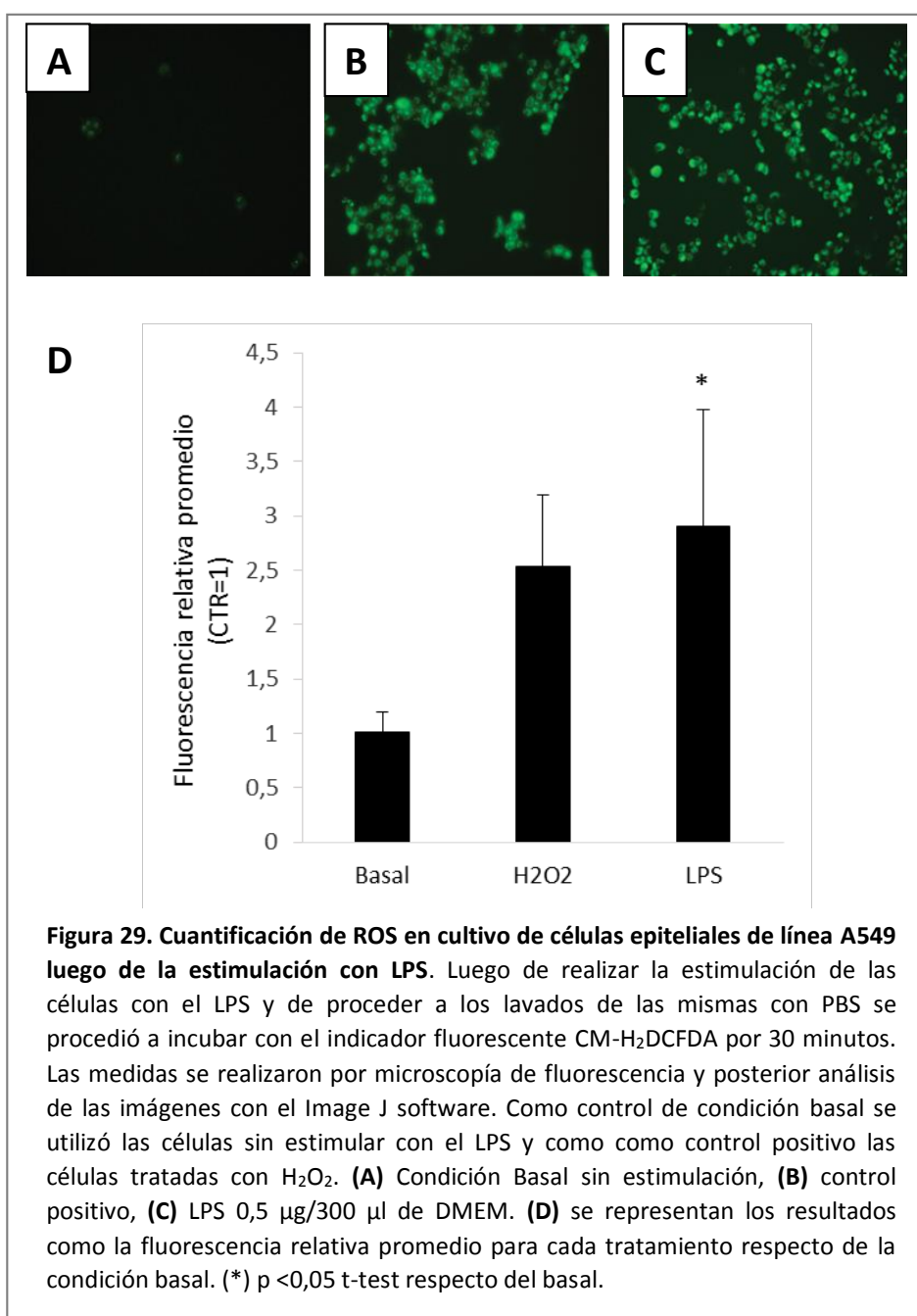
En resumen, mediante los ensayos realizados sobre la línea de células epiteliales A549, utilizando como indicador de respuesta el análisis de la expresión de CXCL2 mediante qPCR, pudimos establecer que el tratamiento con 0,5 µg de LPS en 300 µl de DMEM durante 1 h resulta adecuado para los ensayos de estimulación de respuesta *in vitro*.



Una vez establecidas las condiciones de trabajo procedimos luego a evaluar como primera medida la capacidad de las células epiteliales de producir ROS en respuesta al tratamiento con LPS (0,5 µg). Para ello realizamos experimentos de estimulación *in vitro* a los que incorporamos un indicador fluorescente CM-H<sub>2</sub>DCFDA

(5-(6-)clorometil-2',7'-diclorodihidro-fluoresceína diacetato, acetil ester) que sólo fluoresce en presencia de especies oxidativas. El producto fluorescente que surge como consecuencia de una reacción catalizada por esterasas inespecíficas es analizado mediante microscopía de fluorescencia [186, 189-191].

Así, luego de la estimulación durante 1 h de las células A549 con la dosis de LPS establecida previamente (0,5 µg en 300 µl DMEM), se adicionó el indicador fluorescente CM-H<sub>2</sub>DCFDA según las indicaciones del fabricante sobre las células adheridas a la placa y lavadas. Como control positivo del indicador se utilizaron células

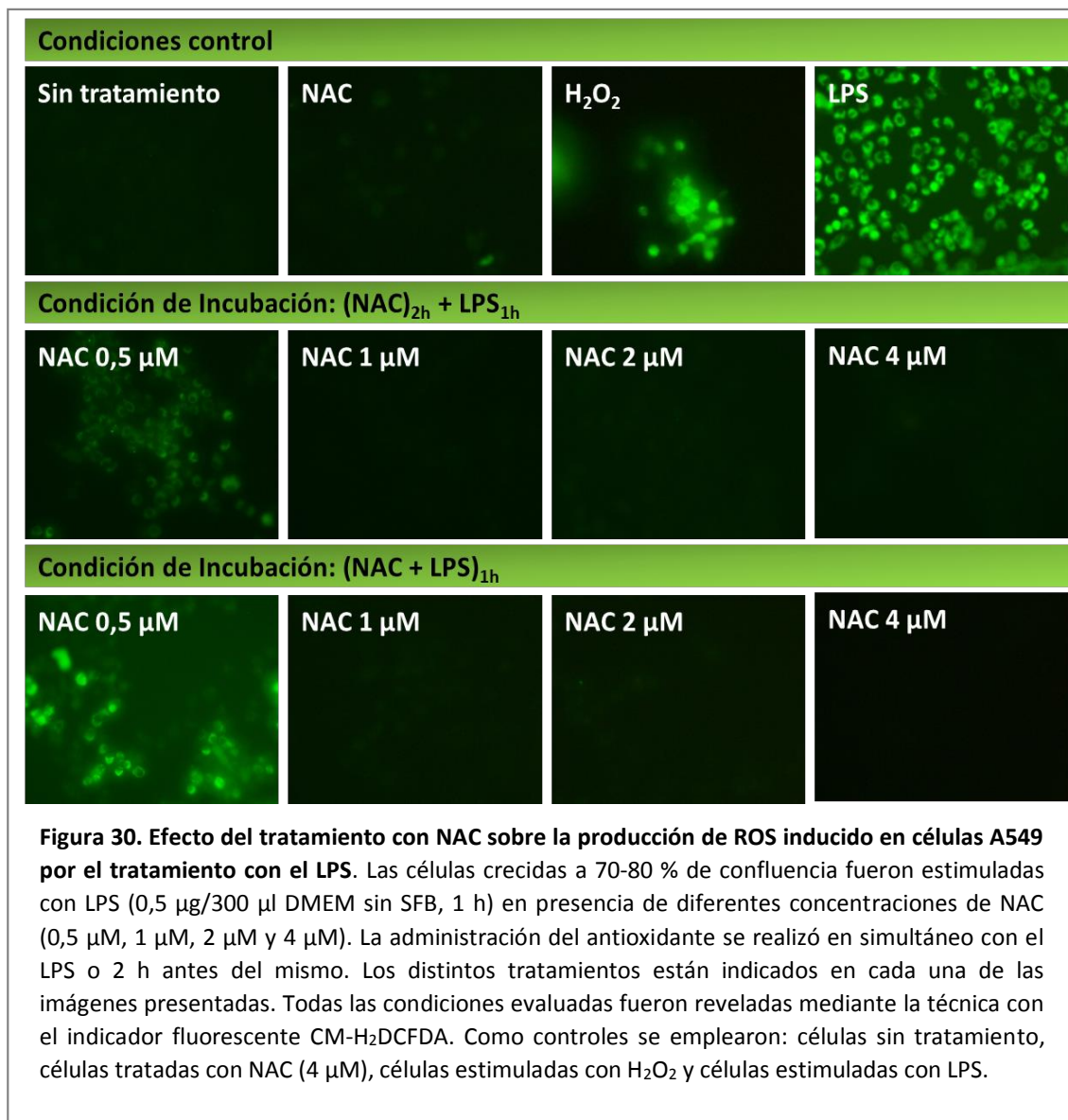


tratadas con agua oxigenada y como control negativo se emplearon células sin tratamiento de LPS (condición basal). La fluorescencia fue evaluada empleando un software (Image J software) que permite realizar cuantificaciones. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 29, en la que se muestran de forma representativa las fotos obtenidas frente al tratamiento con LPS (Figura 29-C), con agua oxigenada como control positivo (Figura 29-B) y células sin tratamiento (Figura 29-A). Los valores de fluorescencia determinados se grafican como la fluorescencia relativa promedio para cada condición evaluada respecto del control negativo. (Figura 29-D).

Al analizar los resultados obtenidos observamos que las células de la línea A549 en respuesta a la estimulación con LPS aumentan la producción de ROS intracelular, pudiendo evidenciarse el mismo a través de un incremento relativo en la fluorescencia de alrededor de tres veces respecto de la condición basal ( $p < 0,05$ ). Este incremento puede visualizarse claramente en las fotos presentadas en la Figura 29.

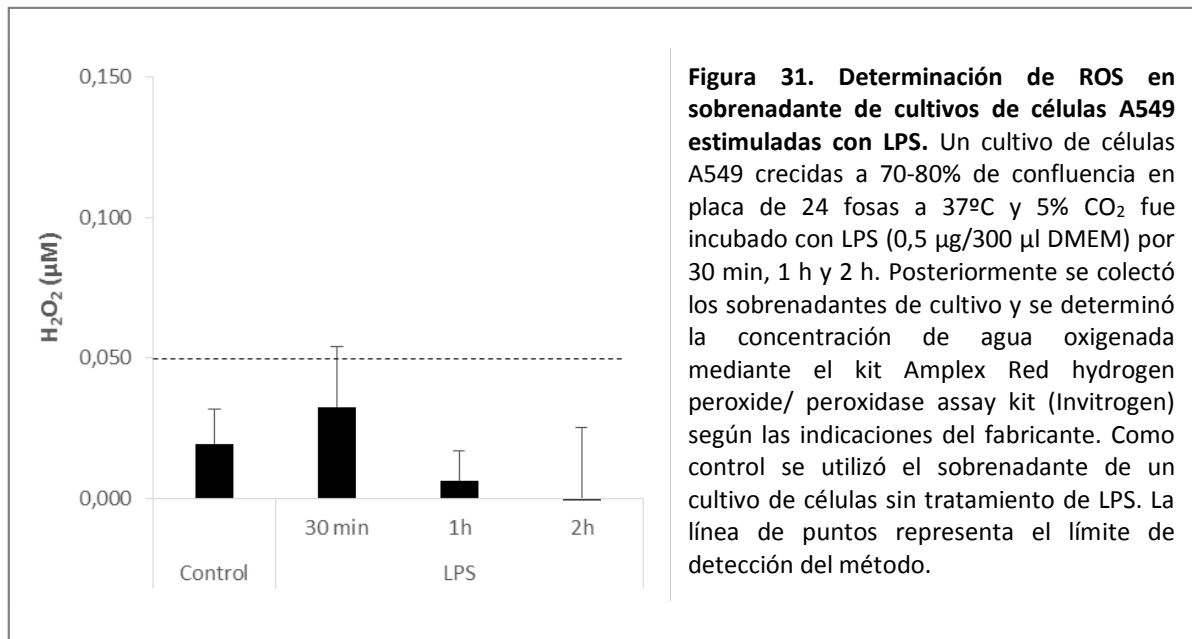
Para confirmar los resultados alcanzados decidimos repetir los ensayos realizados pero en presencia del antioxidante N-acetil-cisteína (NAC). Al igual que lo observado *in vivo*, de confirmarse la acción de LPS sobre la producción del ROS esperamos que este antioxidante inhiba la misma. Para estimar la cantidad de NAC a emplear *in vitro* realizamos ensayos en los que variamos la concentración de NAC (0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M y 4  $\mu$ M). También ensayamos dos tiempos de agregado del NAC respecto de la estimulación con LPS: uno correspondiente al mismo momento que el agregado del LPS y el otro dos horas antes. Como controles empleamos células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (control positivo), células no estimuladas (control negativo), células en presencia de la concentración máxima de NAC y células incubadas en presencia de LPS. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 30 donde se muestran las microscopías obtenidas para cada uno de los tratamientos antes mencionados.

En la Figura 30 se puede observar que mientras que en aquellas condiciones control en las que no se adicionó LPS no se detecta fluorescencia (auto-fluorescencia), el tratamiento con el LPS (0,5  $\mu$ g/300  $\mu$ l DMEM, 1 h) induce un incremento en la fluorescencia de las células A549 respecto de los controles como consecuencia del aumento en la producción de ROS intracelular. También se pudo detectar un



incremento de la intensidad de la fluorescencia verde cuando sólo se agregó de manera exógena H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Pudimos observar también que la adición de NAC 0,5 μM no logra inhibir completamente la producción de ROS independientemente de si es administrado en simultáneo o previo al agonista TLR-4. Por el contrario, la fluorescencia disminuye considerablemente cuando a las células estimuladas con LPS se les adicionan concentraciones iguales o superiores a 1 μM de NAC, indicando que este tratamiento consigue eliminar completamente la producción de agua oxigenada en las células A549. Estos resultados se obtuvieron de igual forma independientemente del tiempo en el cual fue adicionado el NAC.



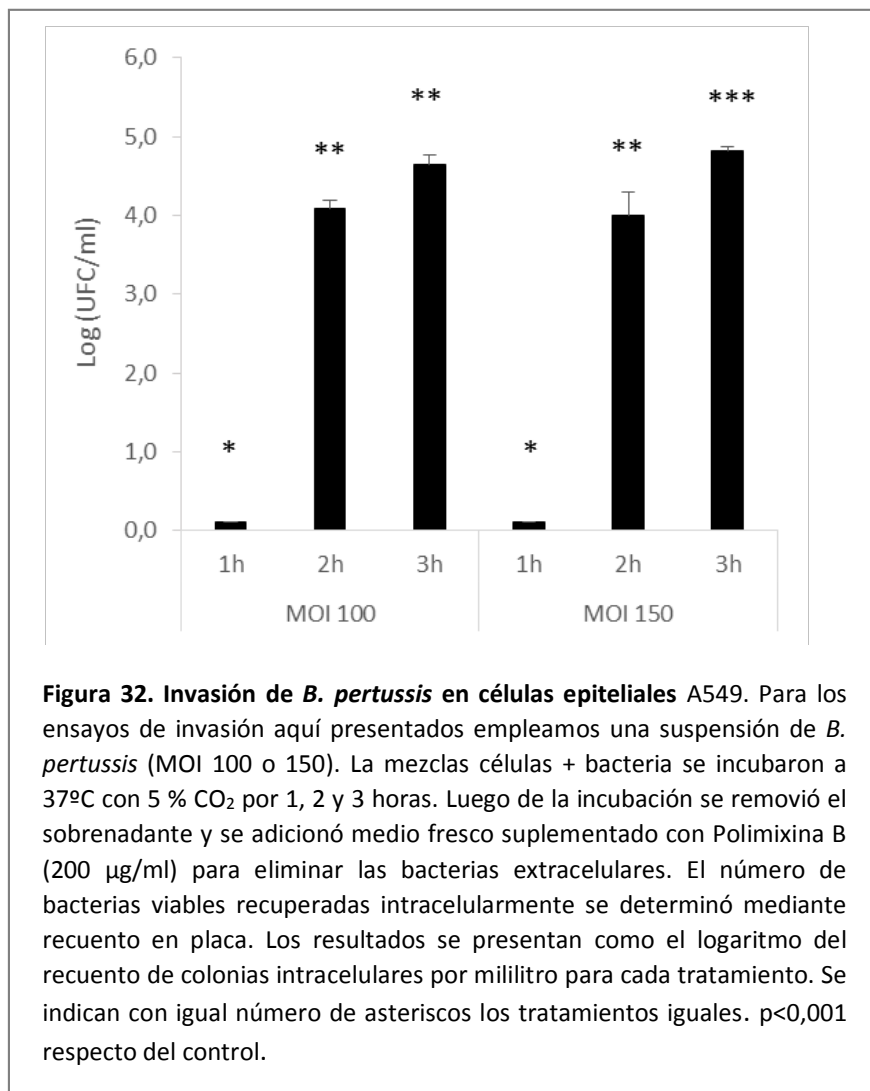
Habiendo evidenciado entonces que en las condiciones establecidas el LPS induce la producción de ROS en células epiteliales decidimos evaluar si es factible detectar también la presencia de ROS en el medio extracelular ya que allí también podría ocurrir la acción bactericida sobre *B. pertussis*. Cuantificamos entonces la producción de ROS en el sobrenadante de cultivos de células epiteliales que hayan sido estimuladas con LPS (0,5 µg /300 µl). A partir de los sobrenadantes obtenidos luego de 30 minutos, 1 h y 2 h de estimulación con LPS se determinó la concentración de agua oxigenada por medio del kit Amplex Red. Los resultados obtenidos muestran que en ninguna de las condiciones ensayadas se detectan niveles apreciables de agua oxigenada en el sobrenadante de cultivo (Figura 31).

### **Análisis del poder bactericida *in vitro* sobre *B. pertussis* inducido por el LPS**

A pesar de que *B. pertussis* es considerada generalmente como una bacteria no invasiva, numerosos trabajos han demostrado que durante el proceso de colonización no sólo se adhiere al epitelio ciliado sino que además es capaz de permanecer viable en el medio intracelular [174,176, 192-195]. En este contexto y en base a los resultados más arriba obtenidos respecto de la producción intracelular de ROS, resulta interesante evaluar si los ROS producidos en respuesta a la estimulación con el

agonista de TLR son capaces de inducir la muerte de las bacterias que han logrado internalizarse en las células del epitelio respiratorio.

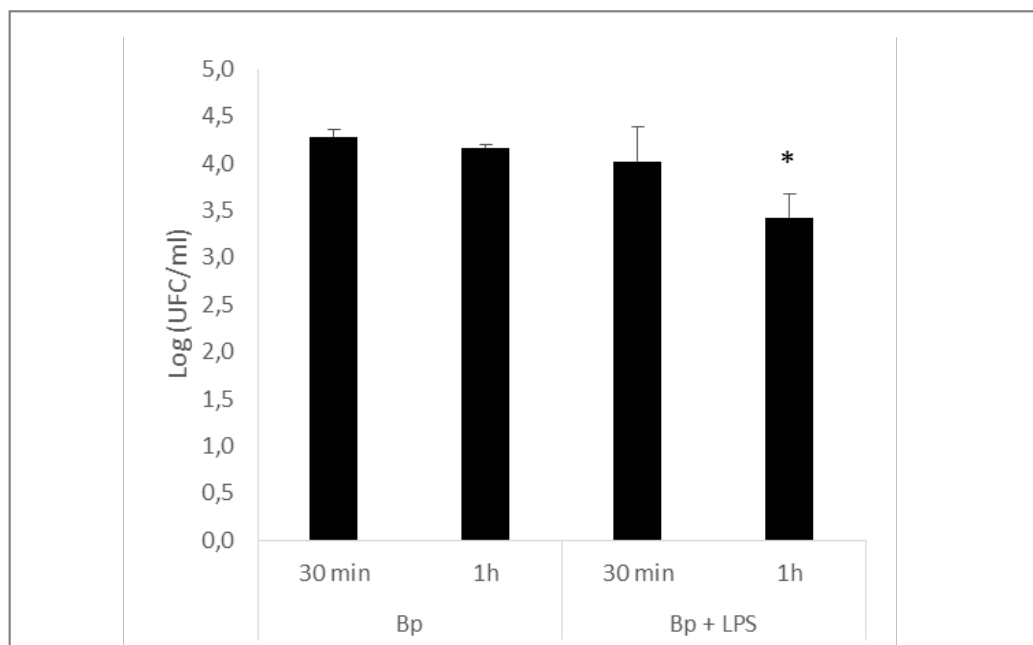
Para avanzar en este aspecto primeramente pusimos a punto en nuestro laboratorio las condiciones para poder evidencia la capacidad de *B. pertussis* de invadir un cultivo de células epiteliales *in vitro*. Para ello se coincubó una suspensión de *B. pertussis* con un cultivo de células A549 crecidas al 70-80% de confluencia por 1, 2 y 3 horas. Para favorecer la interacción entre ambos tipos celulares se realizó una centrifugación a 640 g por 15 min. Los resultados obtenidos para las dos multiplicidades de infección utilizadas (100 y 150) se presentan en la Figura 32. De la misma se desprende que la co-incubación durante una hora es insuficiente para permitir la invasión por *B. pertussis*, independientemente de la MOI utilizada. Por el contrario, los resultados obtenidos luego de 2 y 3 horas de co-incubación permiten





recuperar un gran número de bacterias viables del compartimento intracelular. Los resultados obtenidos para las dos MOI ensayadas (100 y 150) no presentan diferencias entre sí, siendo el tiempo de co-incubación el factor determinante para la internalización observada. De esta manera establecimos como condiciones para realizar los ensayos de invasión con *B. pertussis* una multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula epitelial con una incubación de 2 h.

Habiendo establecido las condiciones para los ensayos de invasión a continuación evaluamos el efecto que tiene sobre la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* el aumento en la concentración de ROS inducido por LPS. Para ello realizamos



**Figura 33. Actividad bactericida sobre *B. pertussis* intracelular inducida por el LPS.**

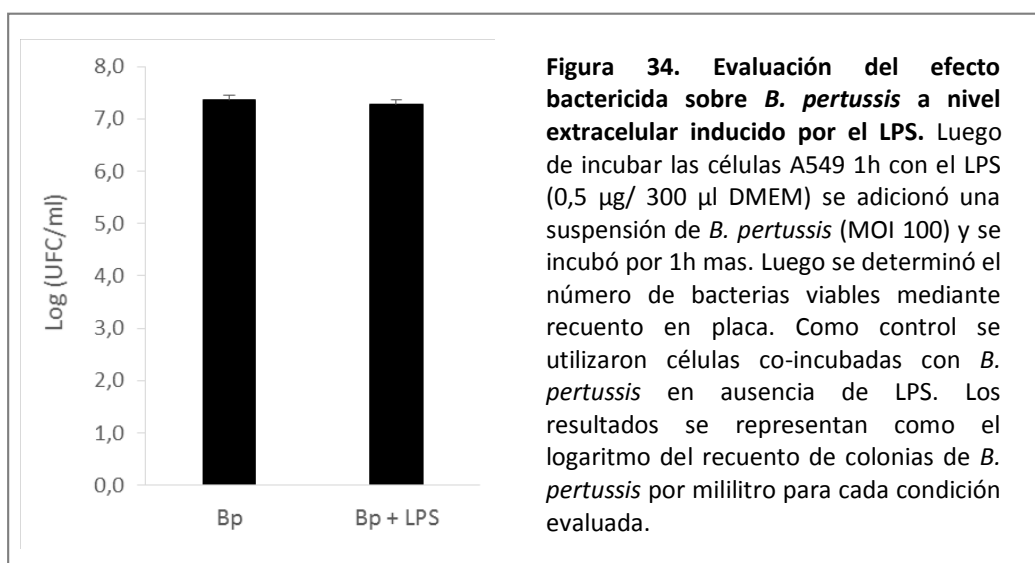
Luego de incubar a células A549 con una suspensión de *B. pertussis* (MOI 100) por 2 h a 37°C con 5 % CO<sub>2</sub> se adicionaron 0,5 µg de LPS por 30 minutos y 1 h. Transcurrido el tiempo de incubación con el LPS, las células fueron tratadas con polimixina B (200µg/ml en DMEM) durante 2 h para eliminar las bacterias extracelulares. Finalmente las células epiteliales fueron lisadas mediante la adición de saponina para liberar las bacterias las cuales se evaluaron mediante recuento en placa. Los resultados obtenidos se presentan como el logaritmo del recuento de colonias intracelulares por mililitro. Como control se emplearon células incubadas con bacterias pero sin tratamiento con LPS. (\*) p<0,001 vs tratamiento con Bp sin LPS por 1h.

ensayos de invasión co-incubando una suspensión de *B. pertussis* con un cultivo de células A549 crecido al 70-80 % de confluencia (MOI=100, 2 h). Transcurridas las 2 h de incubación procedimos luego a la estimulación con 0,5 µg LPS por 30 minutos y 1 h.

Finalmente evaluamos el recuento de bacterias viables dentro de las células A549 para cada condición. Como control se utilizaron los recuentos de bacterias intracelulares provenientes de los cultivos sin tratamiento de LPS.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 33 en donde se grafica el logaritmo del recuento de bacterias intracelulares halladas luego de los diferentes tratamientos. En dicha figura se puede observar que *B. pertussis* en ausencia de LPS puede invadir las células epiteliales según lo indica el recuento de bacterias viables tanto a los 30 minutos como a 1 hora post incubación ( $p < 0,001$ ). Al analizar la respuesta al tratamiento con LPS por 30 minutos podemos observar que el mismo no modifica el número de bacterias intracelulares, recuperándose más de  $10^4$  UFC/ml. Por el contrario la estimulación de las células A549 con  $0,5 \mu\text{g}$  de LPS por el lapso de una hora disminuye el significativamente el recuento de viables en casi un logaritmo respecto del control sin LPS.

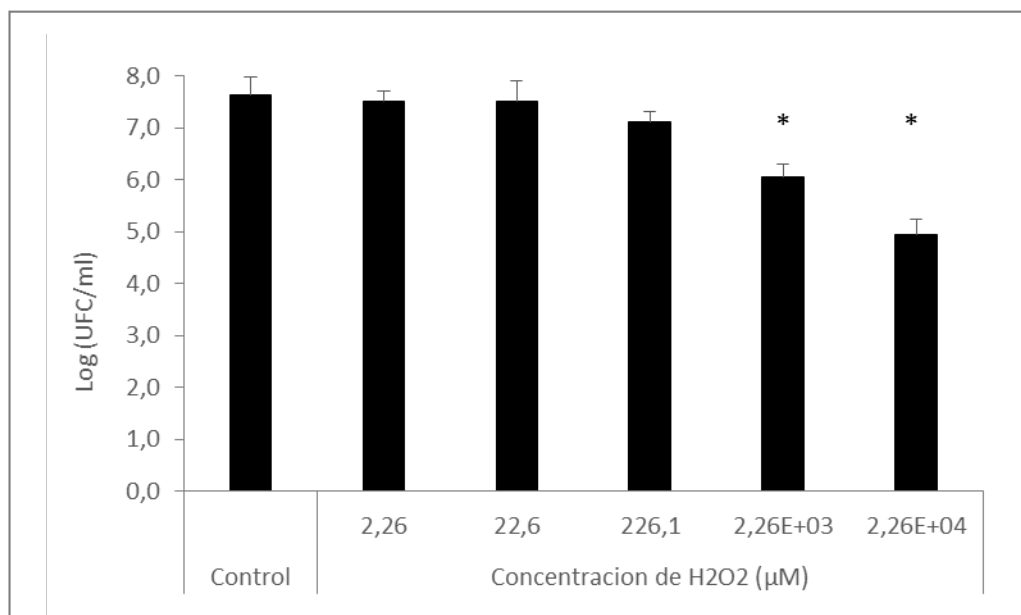
A pesar de no haber podido detectar cantidades significativas de agua oxigenada en el sobrenadante de cultivo de las células epiteliales estimuladas con el agonista de TLR-4, decidimos evaluar a nivel extracelular si la viabilidad de una suspensión de *B. pertussis* puede verse afectada cuando es co-incubada con un cultivo de células A549 tratadas previamente con LPS. La multiplicidad de infección utilizada en este caso fue de 100 bacterias por cada célula eucariota. Las incubaciones se efectuaron en presencia y ausencia de  $0,5 \mu\text{g}$  de LPS por 1h a  $37^\circ\text{C}$  y 5 %  $\text{CO}_2$ .



Los resultados alcanzados muestran que los recuentos bacterianos recuperados a partir de los sobrenadantes de las células estimuladas con LPS efectivamente no ven afectados respecto de la condición en ausencia del agonista de TLR-4 (Figura 34).

Los resultados obtenidos respecto de la capacidad de las células epiteliales de producir la muerte *in vitro* mediante la secreción ROS nos llevaron a preguntarnos qué concentración mínima de agua oxigenada resulta tóxica para *B. pertussis*. Para hacer esta determinación realizamos ensayos *in vitro* empleando concentraciones de agua oxigenada que van desde 2  $\mu\text{M}$  hasta  $2,26 \times 10^4 \mu\text{M}$  (10.000 veces más concentrado que lo determinado en BAL).

Con estas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  realizamos incubaciones con una suspensión de *B. pertussis* ( $1 \times 10^7$  UFC/300  $\mu\text{l}$  de DMEM) por una hora a  $37^\circ\text{C}$ . La evaluación del posible efecto del  $\text{H}_2\text{O}_2$  se realizó a través del recuento de UFC de *B. pertussis* en placa. Como control se utilizó la suspensión bacteriana sin de agregado agua oxigenada. Los resultados alcanzados muestran (Figura 35) que las incubaciones con concentraciones



**Figura 35. Poder bactericida del  $\text{H}_2\text{O}_2$  *in vitro*.** El poder bactericida del agua oxigenada sobre *B. pertussis* ( $1 \times 10^7$  UFC/300  $\mu\text{l}$  DMEM) fue evaluado empleando diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 2,26  $\mu\text{M}$ , 22,6  $\mu\text{M}$ , 226  $\mu\text{M}$ , 2,26E+03  $\mu\text{M}$  y 2,26E+04  $\mu\text{M}$ . Como control negativo se utilizó una suspensión bacteriana sin agregado de agua oxigenada. Los resultados se presentan como el logaritmo del recuento de colonias por mililitro. (\*)  $p < 0,001$  respecto del control.

de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inferiores a 226,1 μM no afectan la viabilidad de *B. pertussis*. Por el contrario, tratamientos con concentraciones 10 y 100 veces superiores reducen la carga bacteriana luego de una hora de incubación en 1,5 y 2,5 veces, respectivamente.

Todos los resultados alcanzados hasta aquí nos permiten concluir que en las condiciones ensayadas el LPS es capaz de inducir ROS intracelular en las células epiteliales A549 en cantidades suficientes como para inducir al menos en parte la muerte de *B. pertussis*. El efecto de ROS en el medio extracelular no fue detectado quizás como consecuencia de los bajos niveles de agua oxigenada allí presente.

A continuación evaluamos la acción de los macrófagos alveolares en respuesta al LPS in vitro.

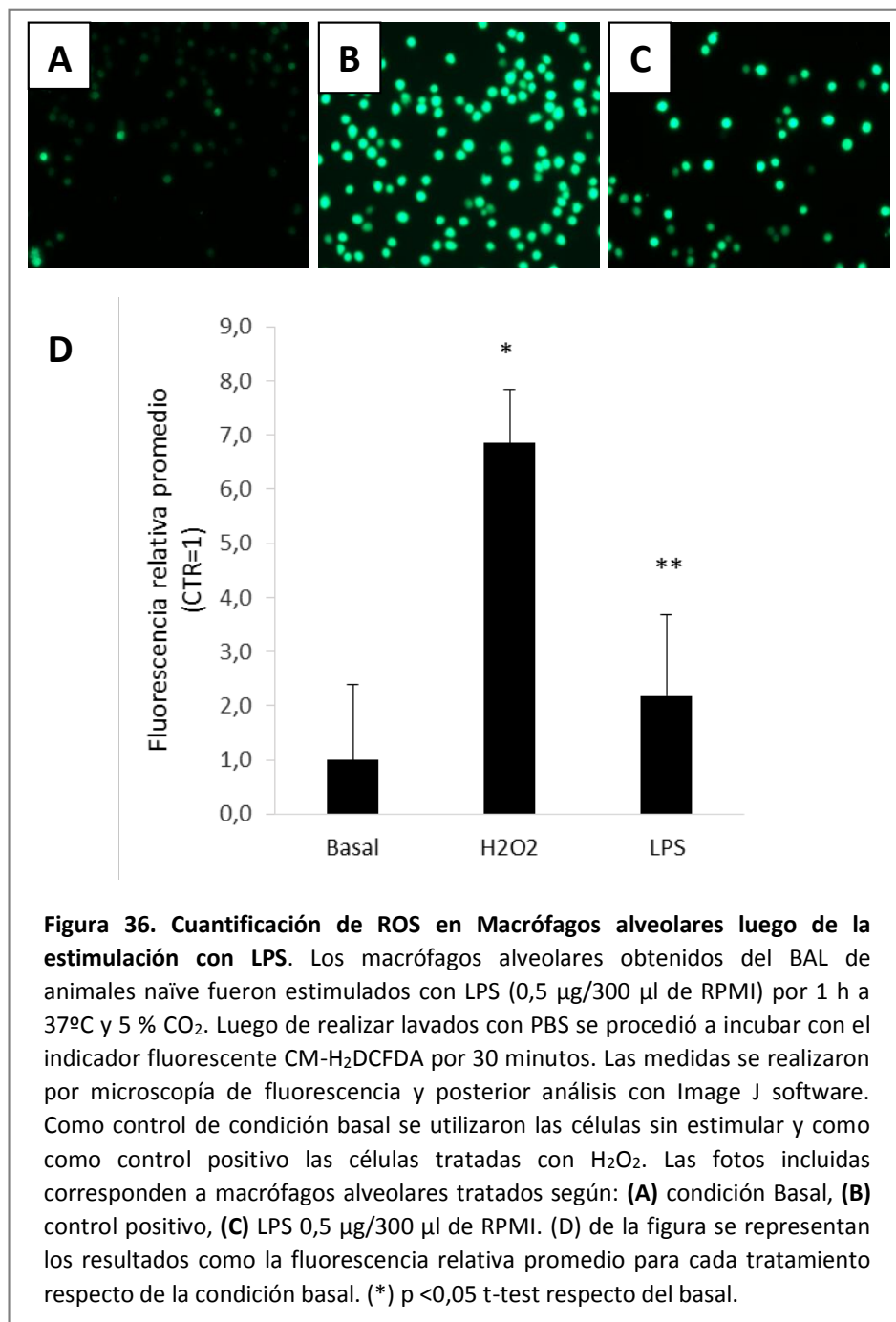
### **Evaluación de la capacidad bactericida de los macrófagos alveolares inducida por la presencia de LPS**

Como habíamos comentado en la introducción de la presente sección, otra población que ha sido descrita en el control de las infecciones a nivel de pulmón son los macrófagos alveolares [196]. Trabajos realizados en animales y humanos han demostrado que los macrófagos además de mediar la fagocitosis de las bacterias tienen la capacidad de secretar un gran número de sustancias antimicrobianas que colaboran con el clearance bacteriano [138, 197, 198].

Decidimos por ello trabajar con los macrófagos del mismo modo que lo hicimos para las células epiteliales. En este caso, en lugar de utilizar células de línea, decidimos obtener los macrófagos alveolares a partir del lavado broncoalveolar de ratones naïve. Las células así obtenidas se sembraron del orden de  $2 \times 10^4$  células por fosa en medio RPMI suplementado con SFB de forma de luego medir ROS con el indicador fluorescente CM-H<sub>2</sub>DCFDA. La población macrofágica contenida en el BAL se seleccionó por su capacidad de adherencia luego de una hora de incubación en las placas. Las células no adheridas provenientes del BAL fueron eliminadas mediante lavados con PBS. La población seleccionada fue entonces estimulada con 0,5 μg/300 μl de LPS por 1 h. Como condición basal se utilizaron macrófagos alveolares sin estimular y como control positivo se utilizaron macrófagos alveolares tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

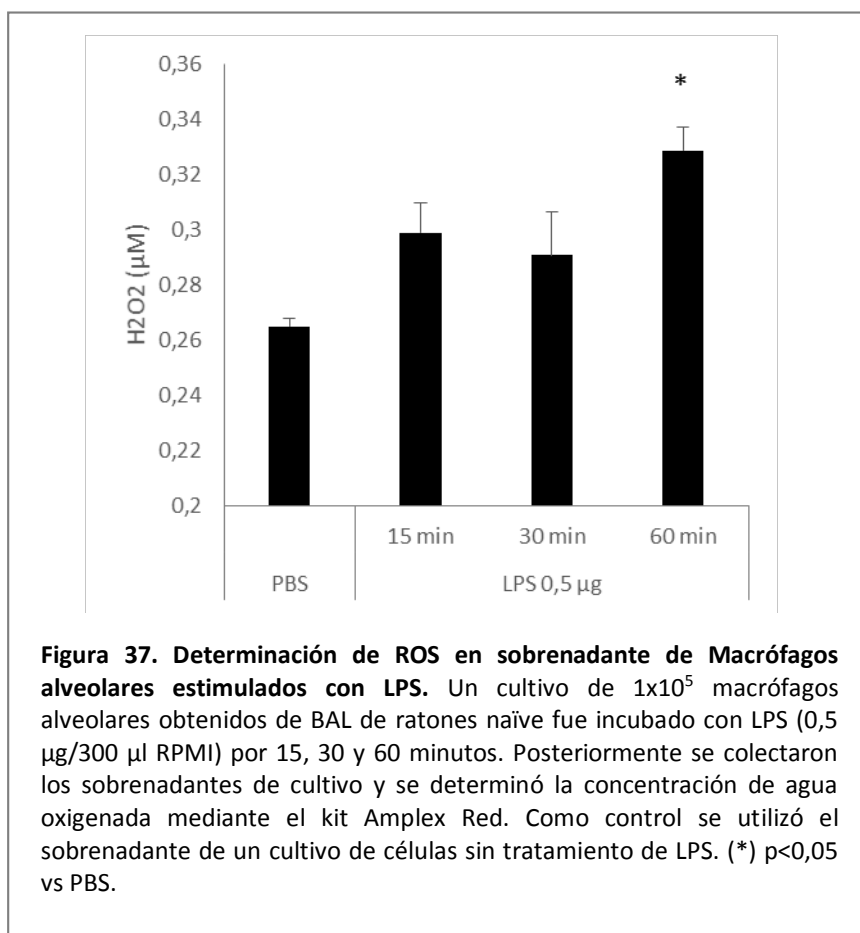
Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 36, en la que se muestran de forma representativa las fotos obtenidas para la condición basal (Figura 36-A), en respuesta al tratamiento con agua oxigenada (Figura 36-B) y frente al tratamiento con LPS (Figura 36-C). Los valores de fluorescencia determinados se grafican como la fluorescencia relativa promedio para cada condición evaluada respecto del control negativo. (Figura 36-D).

Al analizar los resultados obtenidos encontramos que la concentración



intracelular de ROS en la población de macrófagos alveolares tratados con LPS es aproximadamente el doble de la determinada en la condición basal ( $p < 0,05$ ). Este incremento de fluorescencia frente al tratamiento con LPS puede evidenciarse en el panel C de la Figura 36. En el control positivo con agua oxigenada el incremento observado es aún mayor (Panel B, Figura 36).

Evaluamos a continuación la concentración de ROS en el medio extracelular luego de la estimulación de los macrófagos con  $0,5 \mu\text{g}$  de LPS por 15, 30 y 60 minutos. Para ello empleamos nuevamente el kit Amplex Red. Como control se utilizaron células sin tratamiento de LPS. Los resultados se presentan en la Figura 37 en la que se grafica la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\mu\text{M}$ ) para los diferentes tiempos de incubación con el agonista.



**Figura 37. Determinación de ROS en sobrenadante de Macrófagos alveolares estimulados con LPS.** Un cultivo de  $1 \times 10^5$  macrófagos alveolares obtenidos de BAL de ratones naïve fue incubado con LPS ( $0,5 \mu\text{g}/300 \mu\text{l RPMI}$ ) por 15, 30 y 60 minutos. Posteriormente se colectaron los sobrenadantes de cultivo y se determinó la concentración de agua oxigenada mediante el kit Amplex Red. Como control se utilizó el sobrenadante de un cultivo de células sin tratamiento de LPS. (\*)  $p < 0,05$  vs PBS.

A partir de la gráfica podemos ver que las células sin estimular presentan una secreción basal de agua oxigenada alcanzando concentraciones del orden de  $0,26 \mu\text{M}$ . Al estimular la población de células macrofágicas con LPS por 15 y 30 minutos

podemos evidenciar un aumento en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aunque las diferencias no son significativas respecto de la condición control ( $p < 0,05$ ). Por el contrario, la estimulación con LPS por 60 minutos incrementa significativamente la concentración de agua oxigenada en el sobrenadante de cultivo, alcanzando concentraciones del orden de 0,33  $\mu$ M.

La cuantificación de agua oxigenada en el sobrenadante del cultivo de macrófagos alveolares nos permitió evidenciar que frente a la estimulación con LPS se produce un incremento significativo en la producción de ROS extracelulares a diferencia de las células epiteliales.

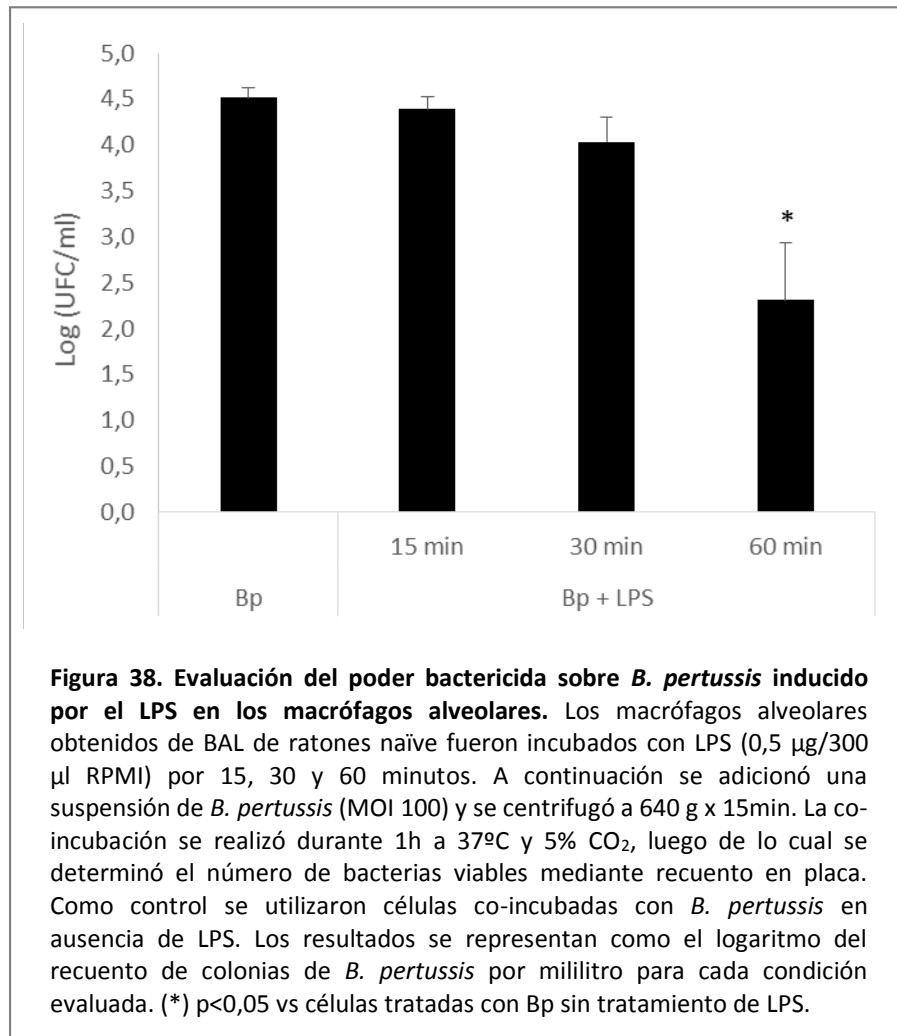
En base a estos resultados y teniendo en cuenta el rol de ROS en la eliminación bacteriana decidimos evaluar a continuación el poder bactericida de la respuesta desencadenada en macrófagos *in vitro* frente al estímulo TLR-4. Como describimos anteriormente la estimulación se realizó por incubación con 0,5  $\mu$ g de LPS por 15, 30 y 60 minutos, luego de lo cual se adicionó una suspensión de *B. pertussis* (MOI 100). La co-incubación se realizó por 1 h a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>, luego de lo cual se determinó el recuento de bacterias viables en el sobrenadante de cultivo. Como control negativo de acción bactericida se realizó la co-incubación de los macrófagos alveolares y *B. pertussis* pero sin estimular con el LPS. Los resultados obtenidos se representan como logaritmo del recuento de colonias de *B. pertussis* por mililitro en la Figura 38. Los mismos son representativos de tres ensayos independientes.

Al analizar los resultados encontramos que los recuentos de bacterias viables obtenidos a partir de los sobrenadantes de cultivo de los macrófagos estimulados por 15 y 30 minutos con LPS no difieren significativamente de los encontrados en la condición sin estimulación. Por el contrario, el tratamiento previo de los macrófagos alveolares con LPS por el lapso de 60 minutos desencadena una respuesta suficiente como para reducir la carga bacteriana en aproximadamente dos órdenes de magnitud respecto del control ( $p < 0,05$ ).

Los datos obtenidos muestran que la población de macrófagos alveolares es capaz de mediar la muerte de *B. pertussis* en el espacio extracelular en respuesta a la

estimulación con LPS, evidenciando una correlación directa con el incremento en la concentración de agua oxigenada en el sobrenadante de cultivo.

Ensayos preliminares mostraron también que la acción bactericida inducida por el LPS también ocurre a nivel intracelular (datos no mostrados).



## DISCUSIÓN

Los ensayos de StIR para *B. pertussis* realizados *in vivo* en el modelo en ratón, cuyos resultados fueron presentados en este trabajo de Tesis, evidenciaron que el principal mecanismo de eliminación de *B. pertussis* en este escenario a nivel de pulmón estaría mediado por la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Los ensayos *in vitro* aquí presentados utilizando células epiteliales y macrofágicas



muestran que ambas poblaciones celulares responden al tratamiento con el agonista de TLR-4 incrementado la concentración de agua oxigenada intracelular. Estos resultados concuerdan con los publicados en el marco de otras infecciones como la producida por *P. aureginosa*. Interesantemente para esta bacteria incluso se pudo evidenciar que mutantes de *P. aureginosa* que presentan estructuras alteradas en el LPS fallan en estimular la producción de ROS cuando son incubadas junto a las células A549 [199].

Hemos podido establecer condiciones experimentales *in vitro* que nos han permitido detectar la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el espacio extracelular en las incubaciones de los macrófagos alveolares con el LPS. Específicamente en respuesta al estímulo de LPS, se detectó un aumento de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular respecto del control (0,329 μM ± 0,003 vs 0,265 μM ± 0,003). Este hallazgo *in vitro* es interesante ya que ha sido descrito que en el sistema respiratorio se encuentran a nivel de la superficie de las mucosas las enzimas DUOX1 y DUOX2 las cuales catalizan la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que es liberada en el espacio alveolar [97, 171, 200]. En las condiciones ensayadas por nosotros sin embargo no pudimos poner de manifiesto la producción extracelular de agua oxigenada en respuesta al LPS por las células A549. Para algunas células en las que si se ha podido detectar la presencia de ROS extracelular, los tiempos de incubación son mayores y emplean otras estructuras de LPS [187] que no se corresponden con las ensayadas por nosotros. Las condiciones elegidas por nosotros no permiten tiempos de incubación mayores ya que ello lleva a la apoptosis celular.

Logrado el establecimiento de las condiciones para evidenciar *in vitro* el incremento de ROS por estimulación del LPS decidimos evaluar luego el poder bactericida del mismo sobre *B. pertussis*. Los ensayos realizados permitieron evidenciar que la estimulación *in vitro* de ROS intracelular en las células epiteliales en presencia de LPS conduce, aunque parcialmente, a la muerte de *B. pertussis*. Resultados similares se lograron en los sobrenadantes de los macrófagos co-incubados con *B. pertussis* y estimulados con el LPS. Esta capacidad bactericida detectada se correlaciona perfectamente con las concentraciones de ROS detectadas en los ensayos realizados. Todos estos resultados concuerdan con los nuevos hallazgos respecto de la

familia de enzimas DUOX. En particular se ha descrito que algunos miembros de esta familia se expresan en altos niveles en la membrana apical de las células epiteliales de las vías respiratorias y en macrófagos alveolares, a los que se les ha adjudicado un rol esencial en la destrucción microbiana [170]. De hecho, se ha propuesto que las enzimas DUOX actuarían en conjunto con otras enzimas como la lactoperoxidasa de conocida acción bactericida que también se encuentra presente en las secreciones mucosales.

A pesar de ser bien conocido el hecho de que la expresión de las enzimas DUOX es inducida por citoquinas pro-inflamatorias, especialmente por acción del interferón gamma [201], el papel que juegan los ligandos de TLR-4 como desencadenantes de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las vías respiratorias y en células allí presentes, como hemos evidenciado aquí, no ha sido ampliamente estudiado. Estos resultados sin duda significan un avance en el conocimiento de los mecanismos que llevan a la eliminación de patógenos como el aquí estudiado. En el caso de *B. pertussis* han mostrado claramente la importancia de los ROS en el fenómeno descrito y demostrado que tanto los macrófagos alveolares como las células epiteliales mediarían la eliminación de *B. pertussis*.

## RESULTADOS

# Estudio del rol del lipopolisacárido como inmunógeno protector



## INTRODUCCIÓN

Como hemos descrito en distintas secciones de este trabajo de Tesis el LPS de *B. pertussis* como el de otros microorganismos cumple un rol esencial en la interacción bacteria-huésped. De hecho recientemente se ha mostrado que las mutaciones en el receptor TLR-4 humano se asocian con una respuesta disminuida de las vías respiratorias al LPS [202]. Se ha evidenciado también que dichas mutaciones en TLR-4 humano se asocian con el aumento de susceptibilidad a la infección por bacterias gram-negativas [203]. En estudios más específicos de la infección por *Bordetella* se ha demostrado que como consecuencia de que los pulmones de ratones recién nacidos presentan niveles más bajos de expresión de TLR-4 en comparación con ratones adultos [204], estos resultan tener una mayor susceptibilidad a la Bordetellosis. Estos resultados en acuerdo con nuestros hallazgos sugieren que el receptor TLR-4 desempeña un papel fundamental en la defensa innata del huésped contra la infección por *Bordetella*.

En el marco de las vacunas tanto celulares como acelulares se ha demostrado también que el receptor TLR-4 juega un rol importante en la inducción de respuesta Th1 y Th17 disminuyendo la respuesta del tipo Th2 inducida por la vacunación, tanto con vacunas celulares como acelulares [54]. De hecho se ha propuesto incluir análogos de LPS para mejorar las vacunas acelulares [205].

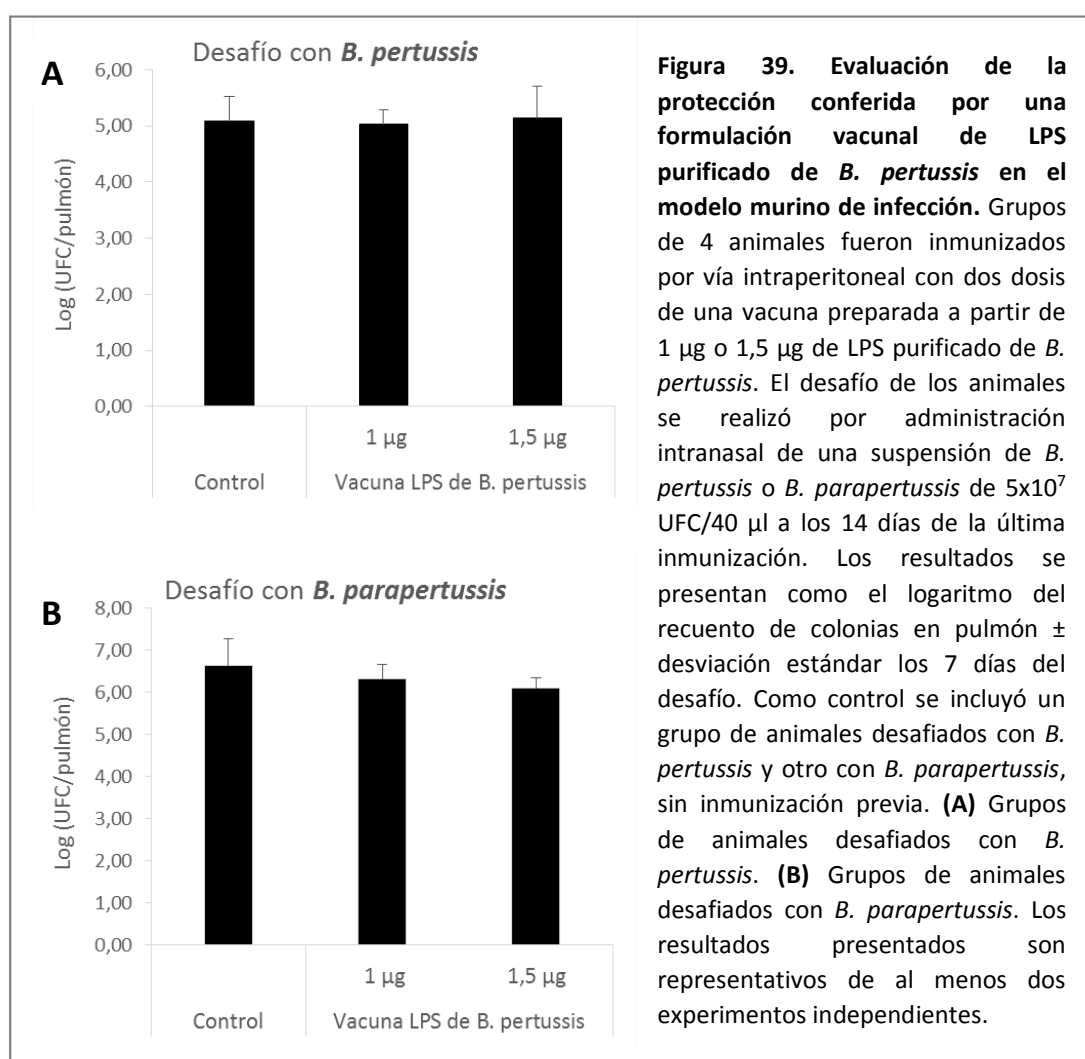
Estos antecedentes nos han motivado a llevar a cabo experimentos diferentes a los hasta ahora presentados en este trabajo pero interesantes ya que evalúan la capacidad protectora del LPS de *B. pertussis* purificado frente a la infección de *B. pertussis*. Este estudio lo enmarcamos en una de las líneas que nuestro grupo de investigación referida al desarrollo de una nueva vacuna anti *pertussis* capaz de proteger eficientemente ante las infecciones causadas por las especies de *Bordetella* de relevancia epidemiológica.

A continuación presento los resultados alcanzados.

## RESULTADOS

### Rol protector del lipopolisacárido de *B. pertussis* como inmunógeno vacunal

Para evaluar la capacidad del LPS de *B. pertussis* de inducir una respuesta inmune protectora en el marco de la inmunidad adaptativa empleamos el modelo de desafío intranasal en ratones ya puesto a punto en nuestro laboratorio [206-208]. Estos ensayos consisten en inmunizar a grupos de ratones Balb/c intraperitonealmente siguiendo un plan de inmunización de 2 dosis de vacuna con un lapso de 14 días entre la primera y segunda dosis. A 14 días de recibida la última dosis, los animales son desafiados con una suspensión de *B. pertussis* en una dosis subletal ( $5 \times 10^7$  UFC/40  $\mu$ l). La protección se evalúa a los 7 días del desafío mediante recuento de bacterias viables en pulmón. Los resultados se comparan con los obtenidos de grupo de ratones no inmunizados. Para los experimentos aquí presentados se empleó una vacuna basada en el LPS purificado de *B. pertussis*. En particular ensayamos 2 formulaciones, una con



1µg y la otra con 1,5 µg LPS detoxificado. Para ambas dosis la vacuna fue formulada con hidróxido de aluminio. Como control negativo de protección empleamos un grupo de animales no inmunizados y desafiados con *B. pertussis*. Dada la incidencia de *B. parapertussis* en la población también evaluamos mediante este tipo de ensayos la capacidad protectora de LPS de *B. pertussis* frente al desafío con *B. parapertussis*. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 39 como el logaritmo del recuento de colonias en pulmón para las diferentes condiciones evaluadas.

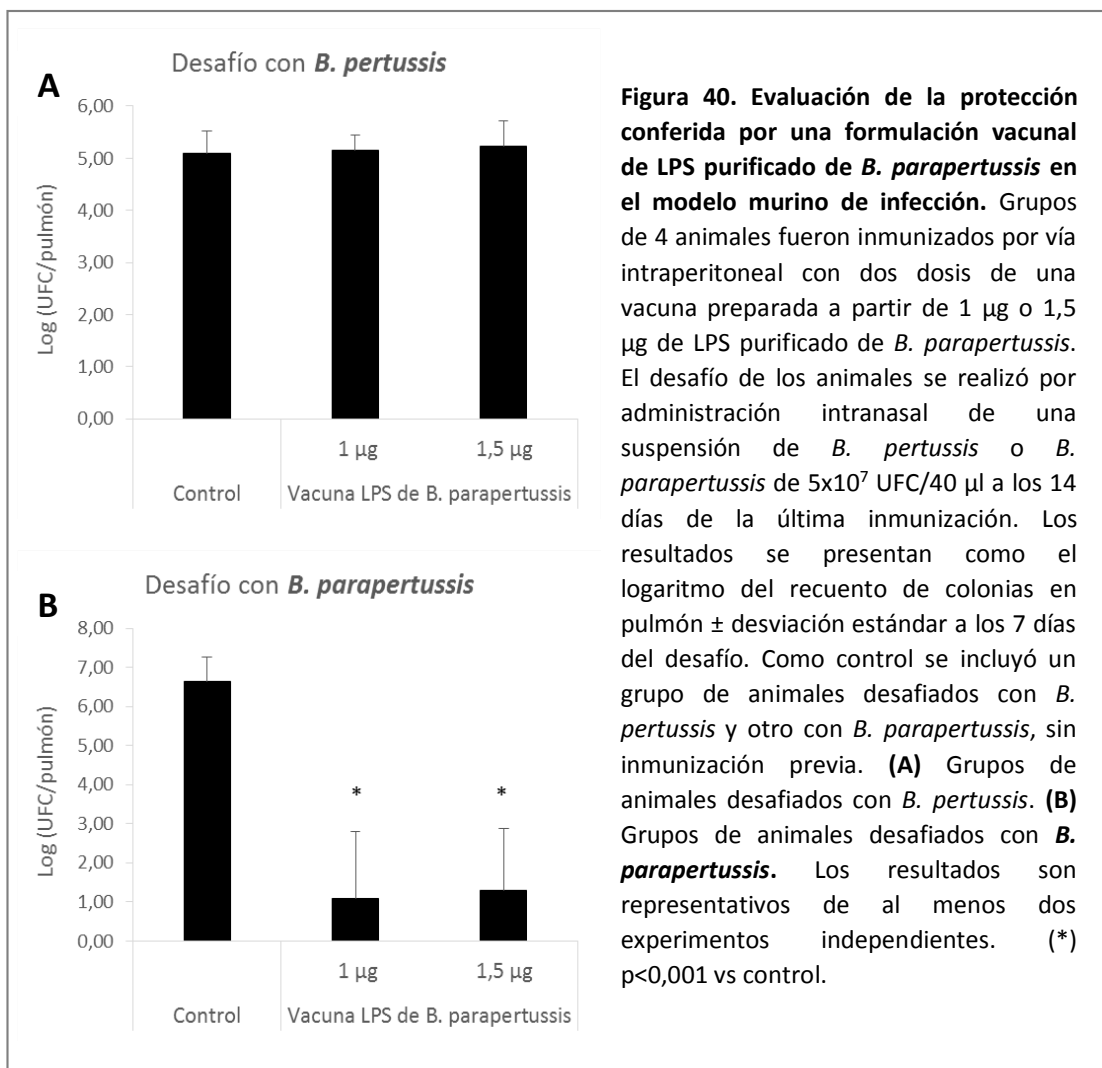
Del análisis de las gráficas se desprende que independientemente de la cantidad de LPS empleada en las formulaciones preparadas, *B. pertussis* no es eliminada de los pulmones detectándose valores de UFC similares a los hallados para el control negativo. Al extender el experimento a *B. parapertussis* no pudimos detectar una disminución en el número de colonias como consecuencia de la vacunación.

Los resultados obtenidos a partir de la vacunación con el LPS de *B. pertussis* parecieran indicar que el mismo no es capaz producir una respuesta protectora por sí mismo. Existen en la bibliografía reportes que muestran que en el contexto de las infecciones por otros patógenos como *F. tularensis* y *Shigella flexneri* la inmunización con LPS purificado a partir de las mismas confiere protección, la cual estaría relacionada con la presencia de antígeno O en la estructura del LPS [209, 210]. El LPS de *B. parapertussis*, a diferencia del LPS de *B. pertussis*, no presenta trisacárido sino que tiene en su lugar el antígeno O [211, 212]. Este antígeno O parece evitar la muerte de *B. parapertussis* dentro de los PMN. Este mecanismo protector del antígeno O se anularía cuando la misma es opsonizada, condición que lleva a que *B. parapertussis* sea eficientemente fagocitada por los PMN [213]. Estos datos no sólo aportan nuevos conocimientos sobre los mecanismos que mediarían la protección contra la infección por *B. parapertussis* sino que marcan la importancia crucial de anticuerpos opsonizantes en la inmunidad protectora contra este patógeno. En función de estas evidencias decidimos evaluar la capacidad del LPS de *B. parapertussis* de inducir un respuesta protectora frente a sí misma y frente a *B. pertussis*.

Para este fin empleamos nuevamente el modelo de desafío intranasal en ratones. Específicamente trabajamos con grupos de animales a los que inmunizamos con una vacuna preparada a partir de LPS de *B. parapertussis*. En este caso ensayamos

también dos dosis de LPS de purificado: 1  $\mu\text{g}$  y 1,5  $\mu\text{g}$ . El desafío realizado a los 14 días luego de la segunda inmunización fue realizado con *B. pertussis* y *B. parapertussis* ( $5 \times 10^7$  UFC/40  $\mu\text{l}$ ). La protección se evaluó mediante el recuento de colonias a nivel de pulmón a los 7 días post-desafío. Como control negativo de protección se utilizaron grupos de animales no inmunizados desafiados con cada una de las especies bacterianas estudiadas. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 40 como el logaritmo del recuento de colonias en pulmón para cada tratamiento.

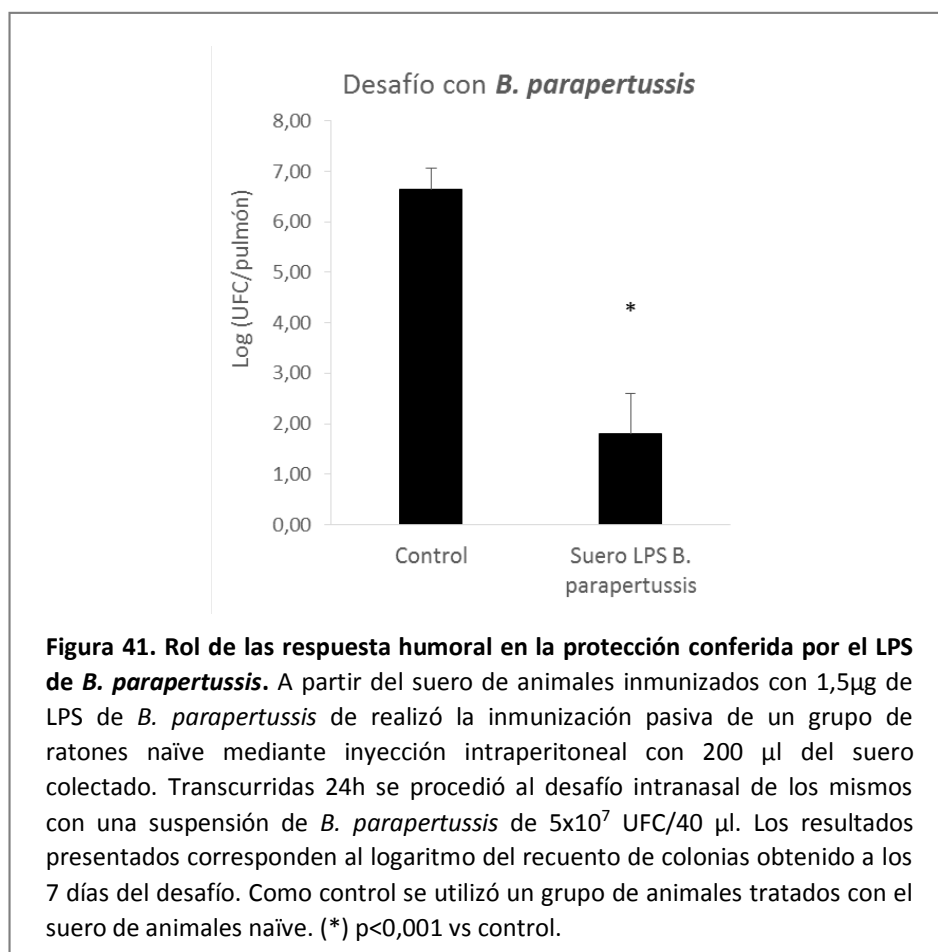
Al analizar los resultados encontramos que la inmunización con LPS de *B. parapertussis* no confiere protección frente al desafío con *B. pertussis* (Figura 40-A), recuperándose en los animales tratados con las dos dosis de LPS, números de bacterias equivalentes a los del grupo sin vacunar (más de  $10^5$  UFC/pulmón). Por el contrario, la





inmunización con el LPS de *B. parapertussis* si resultó ser efectiva frente a *B. parapertussis* (Figura 40-B), encontrando que tanto el tratamiento con 1 µg como con 1,5 µg confieren protección. Para las dos dosis ensayadas los recuentos resultaron ser aproximadamente 5 órdenes de magnitud menores que los de la condición control ( $p < 0,001$ ).

En base a estos resultados y teniendo en cuenta los resultados *in vitro* que muestran el rol de los anticuerpos en la inducción de la fagocitosis mediada por los PMN más arriba descrita, decidimos evaluar si la protección conferida por el LPS de *B. parapertussis* contra sí misma se debe, al menos parcialmente, a una respuesta humoral mediada por anticuerpos. Para tal fin se vacunaron animales con LPS de *B. parapertussis* (1,5 µg/dosis) según el plan de inmunización ya descrito y a los 14 días de la segunda dosis se colectaron muestras de sangre para obtener sueros inmunes. Estos sueros, luego de ser titulados, fueron utilizados para ensayos de inmunización pasiva que consistieron en la administración intraperitoneal del suero inmune (200 µl).



A las 24 h de inmunizados, los ratones fueron desafiados con una suspensión de *B. paraptussis* conteniendo  $5 \times 10^7$  UFC/40  $\mu$ l y los 7 días post desafío evaluamos la protección mediante recuento de colonias en pulmón. Como control negativo de protección empleamos ratones tratados con suero proveniente de animales naïve. Los resultados alcanzados se presentan en la Figura 41. Allí se puede observar claramente que los animales que recibieron el suero inmune presentan un número de bacterias en pulmón cinco veces menor que el encontrado en los animales control. Estos resultados indican que la protección conferida por el LPS de *B. paraptussis* estaría mediada por anticuerpos confirmando los resultados alcanzados por otros autores *in vitro*.

## DISCUSIÓN

En el presente capítulo nos propusimos evaluar el rol del LPS como un posible inmunógeno protector. A la fecha se ha demostrado que el reconocimiento de esta molécula es importante para el establecimiento de la respuesta frente al proceso infeccioso mediando el reclutamiento de neutrófilos [123] como adyuvante vacunal en diferentes formulaciones por su gran capacidad para estimular la respuesta inmune [54, 214] y, en el marco de esta Tesis, como agonista Toll en la inmunidad innata de mucosas. Sin embargo el estudio del LPS como inmunógeno protector ha sido poco estudiado por su asociación con posibles efectos adversos ya que se trata de una endotoxina.

De esta manera evaluamos la capacidad protectora del LPS de *B. pertussis* en el marco de un plan de inmunización ya puesto a punto en nuestro laboratorio frente a las dos especies de mayor relevancia epidemiológica para coqueluche: *B. pertussis* y *B. paraptussis*. Mediante los ensayos realizados pudimos evidenciar que el LPS de *B. pertussis* no es capaz de proteger frente a ninguna de las dos especies de interés. Por el contrario, al repetir los ensayos utilizando LPS purificado de *B. paraptussis* encontramos que el mismo es capaz de conferir protección frente a ella misma, aunque no da protección cruzada con *B. pertussis*. Estos resultados se correlacionan con los reportes que indican que el Antígeno O de la molécula de LPS es el responsable

de respuesta inmune protectora desencadenada frente a la inmunización con LPS de diferentes orígenes [209, 210, 215].

Los resultados aquí presentados fueron la base de un desarrollo realizado por nuestro grupo sobre una nueva vacuna basada en vesículas de membrana externa que protege no sólo contra *B. pertussis* sino contra *B. parapertussis*. Los resultados alcanzados han sido objeto de varias publicaciones [206, 216] y de una patente internacional en trámite (patente PCT/IB2014/060143).



# **DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES**

**MARÍA EUGENIA ZURITA. TRABAJO DE TESIS DOCTORAL 2015.**



Durante la mayor parte de la historia humana, las enfermedades infecciosas constituyeron la principal causa de muerte, aparte de las ocasionadas por la guerra. Con la invención de las vacunas, por un momento pareció haberse derrotado a las enfermedades infecciosas, sin embargo aún quedan dolencias de vieja data por controlar y/o erradicar.

La primera evidencia escrita relacionada con los procesos de vacunación data del siglo XI y se encuentran en la literatura china. Existen dos textos “El tratamiento adecuado de la viruela” y “El espejo dorado de la Medicina” que describen diferentes formas de inoculación antivariólica en la que se explica cómo se puede prevenir el contagio de viruela inoculándose con pus proveniente de pacientes que habían contraído la enfermedad. Esta práctica era relativamente común y constituía una práctica surgida de la necesidad de evitar esta enfermedad que causaba epidemias de gran envergadura Sin embargo esta medida no estaba exenta de riesgos pues aproximadamente el 3% de las personas inoculadas contraían la enfermedad. De hecho las condiciones en las que se comenzó a practicar esta “variolización” tuvo desastrosas consecuencias en algunos lugares ya que la incorrecta inoculación que se hacía en aquella época ocasionó que algunas personas fueran contagiadas de viruela o incluso de sífilis en aquellos casos en los que el pus provenía de personas con esta enfermedad. Más allá de estos aspectos indeseables, la “variolización” constituye el primer intento de la humanidad por evitar las enfermedades infecciosas. Pero fue Edward Jenner quien diseñó en Inglaterra la primera vacuna contra la viruela. De hecho la palabra vacuna surge precisamente de sus trabajos. En las comunidades donde Jenner trabajaba como médico existía una enfermedad de las vacas llamada Vaccina o viruela de las vacas. Esta enfermedad produce erupción en las ubres de estos animales semejante a las que produce la viruela humana. Jenner observó que las lecheras de estos lugares raramente enfermaban de viruela y pensó que esto podría deberse al contacto con las vacas infectadas que las protegía de la viruela humana. Jenner evaluó esta hipótesis en 1776 a través del siguiente experimento: extrajo pus de una lechera que se había contagiado con la “viruela buena”, la viruela de las vacas, y la inoculó a un niño pequeño sano y estudió como se desarrollaba el niño durante los días siguientes a la inoculación. Tras mostrar leves síntomas de molestias el niño se

repuso rápidamente. Posteriormente el médico inglés inoculó al niño con pus de un enfermo de viruela humana, el resultado fue que el niño no enfermó aunque en el lugar de la inoculación si se desarrolló una lesión típica de la viruela.

El método de las ordeñadoras experimentado por Jenner tenía ventajas sobre la variolización como la practicaban los chinos porque esta vacuna no ocasionaba riesgo de muerte ni era foco de contagio a través de las personas vacunadas. Por ello en algunos textos y cartas Jenner recomendaba esta práctica para que los padres inocularan a sus hijos pequeños.

Casi dos siglos después, en 1979 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró erradicada la viruela en todo el mundo gracias al uso de vacunas como las diseñadas por Jenner. Los estudios de Jenner, además de su importancia respecto de la viruela y la vacunación, dejaron en claro que la pre-inoculación con un agente potencialmente infeccioso podía prevenir de posteriores infecciones y en el siglo XIX este método era ya comúnmente realizado en Europa y Norte América.

La evolución de las vacunas desde la variolización y la vacunación contra la viruela ha implicado numerosos avances en la microbiología e inmunología lo que ha llevado al desarrollo de numerosas vacunas. Así hoy en día las vacunas se clasifican como vacunas víricas y bacterianas; y a su vez, cada una de ellas se dividen en dos grupos: a) vacunas de microorganismos vivos atenuados y b) vacunas de microorganismos muertos o inactivados. Estas últimas a su vez se clasifican en enteras, cuando contienen el virus o la bacteria completa, y de subunidades cuando lo que contienen son antígenos secretados o fracciones víricas o bacterianas de distinta naturaleza (Tabla 2).



<b>Tabla 2 Clasificación microbiológica de las vacunas</b>		
<b>VÍRICAS</b>	<b>Vivas atenuadas</b>	<b>Inactivadas (muertas)</b>
<b>Virus enteros</b>	Varicela Fiebre amarilla Polio oral Sarampión Rubéola Parotiditis	Rabia Gripe Polio parenteral Hepatitis A Encefalitis japonesa
<b>Subunidades</b>		Gripe Hepatitis B
<b>BACTERIANAS</b>	<b>Vivas atenuadas</b>	<b>Inactivadas (muertas)</b>
<b>Células enteras</b>	BCG Cólera oral Tifoidea oral	Cólera parental Tos ferina
<b>Subunidades Toxoides</b>		Difteria Tétanos
<b>Polisacáridos Simples</b>		Meningococo A,C,Y, W 135 Neumococo 23-valente
<b>Conjugadas</b>		Hib conjugada Meningococo C Neumococo 7-valente
<b>Acelulares</b>		Pertussis acelular

A pesar de todos los avances hechos en materia de vacunas, muchas enfermedades infecciosas siguen siendo un problema para los sistemas de salud por sus altas tasas de morbilidad y/o mortalidad a nivel mundial. En algunos casos se debe a la falta de una vacuna aceptable y en otros a la necesidad de mejorar las que ya existen. Dentro de las enfermedades inmunoprevenibles entre las peores controladas se encuentra la tos convulsa o pertussis. Esta enfermedad infecciosa aguda de las vías respiratorias, causada principalmente por *Bordetella pertussis* y también por *B. parapertussis*, no sólo no se ha podido erradicar pese al uso masivo de vacunas desde los años cincuenta, sino que en la actualidad ha resurgido. Para ejemplificar esta situación epidemiológica de resurgencia basta con revisar los datos registrados en los últimos años en distintos países. En Estados Unidos y en particular en el estado de California el número de casos de pertussis notificados en el 2010 fue de 9.477 casos, el más alto en 65 años desde 1945, cuando se registró un total de 13.492 casos. En otros estados como Washington, en el año 2012 se registró un brote fuera de escala con más de 1.300 casos, la mayoría de ellos (72%) en menores de 13 años. Argentina no es ajena a esta situación ya que viene registrando un aumento sostenido de casos desde

el año 2002, con brotes de envergadura en diferentes provincias. En particular en el año 2011 se registró un brote epidémico en todo el país con más de 8.300 casos notificados y 76 muertes en niños menores de 6 meses de edad ([www.snvs.msal.gov.ar](http://www.snvs.msal.gov.ar)). Particularmente, nuestro laboratorio como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR), ha contribuido a este registro realizando los test diagnósticos específicos sobre más de 15.000 muestras clínicas, obteniendo resultados positivos que fueron incrementándose año tras año.

La situación epidemiológica actual marca la necesidad de revisar las estrategias de control que hoy se emplean. En particular existe preocupación respecto de la corta duración de la inmunidad conferida por las vacunas que oscila entre 5 y 10 años y de la composición de las mismas ya que están constituidas por cepas o componentes que divergen antigénicamente de los de la población bacteriana circulante. Estas diferencias alélicas parecerían agravar la situación de re emergencia de la enfermedad.

Frente a esta situación, la aplicación de nuevas estrategias de control y/o el desarrollo de nuevas vacunas más efectivas resulta urgente. Respecto al desarrollo de vacunas entre otras cosas se requiere de la profundización del conocimiento del proceso infeccioso siendo fundamental el entendimiento no sólo de los mecanismos de patogenia sino también de los mecanismos inmunológicos involucrados en la defensa del huésped y la resolución de la infección. En el marco de este trabajo de Tesis decidimos abordar el estudio de los procesos que intervienen en el fenómeno StIR, el cual fue recientemente descrito por nuestro grupo en el marco de la infección por *B. pertussis*. Este fenómeno constituye un modelo muy interesante de ser estudiado ya que el mismo desencadena la eliminación del patógeno del huésped en un muy breve lapso de tiempo.

El fenómeno StIR fue descrito hace pocos años en el marco de infecciones respiratorias como un fenómeno de activación de la respuesta antimicrobiana de vías aéreas con capacidad de interrumpir el curso de infecciones por agentes etiológicos diversos tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Aspergillus niger* [78, 79]. En estos sistemas se obtuvieron las primeras evidencias de la capacidad del sistema inmune innato de evitar infecciones letales en respuesta a la estimulación exacerbada de la mucosa respiratoria. Los trabajos originales de Tuvim, Evans y

colaboradores empleaban un lisado de *H. influenza* para inducir el StIR [78-80]. Este tratamiento implica la estimulación de múltiples vías de activación de la respuesta innata, potenciales disparadores del fenómeno de StIR. En trabajos posteriores, establecieron que en sus sistemas de trabajo, la funcionalidad del adaptador de TLRs MyD88 es clave para la ocurrencia del fenómeno de StIR, aunque no lograron provocar el fenómeno por estimulación de distintos agonistas TLR en forma aislada [82, 217, 218]. Sin embargo, la administración conjunta de Pam3Cys y CpG, agonistas de TLR-2/6 y TLR-9, lograba emular el fenómeno StIR. En este trabajo usaron como agonista de TLR-4 al monofosforil lípido A (MPL), agonista parcial de TLR-4 que depende del adaptador TRIF [219]. Resulta importante destacar que en el caso de *B. pertussis*, el fenómeno StIR resulta ser dependiente de la funcionalidad de TLR-4 [17]. Estos resultados están de acuerdo con la importancia del receptor TLR-4 en control de la infección por *B. pertussis* [123] y en el establecimiento de una respuesta inmune protectora [52-54, 56].

Para profundizar la caracterización del fenómeno StIR en nuestro laboratorio comenzamos evaluando la cinética de la respuesta frente al tratamiento con el agonista TLR-4, para lo cual trabajamos sobre el modelo de infección en ratones ya puesto punto en nuestro laboratorio. Mediante los ensayos de colonización pudimos evidenciar que la estimulación de la vía TLR-4 es efectiva en la eliminación de *B. pertussis* no solamente cuando el fenómeno es desencadenado previo a la infección, sino que también es capaz de inducir la eliminación de la bacteria una vez establecida la misma. Interesantemente, pudimos observar que, en concordancia con lo observado el marco del StIR para otros patógenos [78], la eliminación completa de *B. pertussis* de los pulmones del huésped se hace evidente ya a las 2 h luego de la estimulación con el LPS.

El análisis del perfil de expresión de un panel de quimoquinas y citoquinas inflamatorias claves en la defensa antimicrobiana como IL-6, IL-1 $\beta$  y CXCL2 en distintas zonas del árbol respiratorio, permitieron evidenciar que las tres zonas analizadas narinas y vías de conducción superiores, tráquea y pulmón responden frente al tratamiento con LPS. Estas moléculas participan activamente en la defensa frente a *B. pertussis*, siendo importantes para el establecimiento de mecanismos de la inmunidad

innata y adaptativa en respuesta a la infección [220-222]. El nivel de respuesta para las diferentes áreas se condice con lo esperado, siendo más leve en las vías aéreas superiores, que son menos respondedoras por estar continuamente expuestas a la flora normal, mientras que a nivel de pulmón, donde no deberían encontrarse microorganismos, la respuesta es más exacerbada [223].

En el contexto de la infección por *B. pertussis* ha sido reportado previamente que los neutrófilos son reclutados al pulmón y que para las 6 h post-infección son la población mayoritaria en la cavidad broncoalveolar [123, 131]. Más aún, trabajos previos en nuestro grupo con animales TLR-4 deficientes permitieron demostrar que este reclutamiento es dependiente de la activación de la vía Toll 4. Los resultados obtenidos en el marco del StIR inducido por LPS son coincidentes con reportes previos respecto del reclutamiento de la población neutrofilica [224, 225]. Sin embargo contrariamente con lo que esperábamos encontramos mediante ensayos de depleción de esta población celular que la misma pareciera no tener un rol en la eliminación de *B. pertussis* en el StIR inducido por el LPS. Resultados similares fueron obtenidos en el marco del StIR inducido en *S. pneumoniae* por el tratamiento con NTHi, donde se logró desestimar la acción de neutrófilos y macrófagos [217].

La rapidez con que el LPS es capaz de eliminar a *B. pertussis* del huésped nos hizo pensar que el fenómeno StIR para *B. pertussis* es mediado por la estimulación de mecanismos ya presentes en el huésped. Bajo esta hipótesis decidimos evaluar la ocurrencia de mecanismos de secreción de sustancias antimicrobianas como las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS). Las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno han sido descritas con capacidad antimicrobiana a nivel de las vías aéreas. Más aún se ha podido determinar que a nivel de pulmón existe una producción basal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, asociada a la presencia del complejo enzimático DUOX a nivel del epitelio respiratorio, la cual se incrementa en respuesta a un proceso inflamatorio pudiendo incluso ser determinada en el aire espirado del individuo afectado [226, 227]. Los resultados obtenidos durante el desarrollo de mi trabajo de Tesis nos permitieron identificar por primera vez en el marco del fenómeno StIR la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. Estas sustancias fueron propuestas en el marco del StIR para otros patógenos, junto con la secreción de

péptidos antimicrobianos, pero sin llegar a ponerse en evidencia su rol en los modelos *in vivo* [217].

Por otra parte, los resultados obtenidos respecto del poder bactericida de las especies reactivas del oxígeno *in vivo* sobre *B. pertussis* constituyen un mecanismo novedoso en sí mismo puesto que no existían hasta fecha reportes claros de la susceptibilidad de *B. pertussis* a este mecanismo. Resulta interesante resaltar que a diferencia de lo observado respecto del reclutamiento de neutrófilos, la producción de agua oxigenada frente a la infección es significativamente menor que la encontrada en el BAL de los animales estimulados con LPS. Estos resultados diferenciales podrían deberse en parte a la conocida modulación de la respuesta inmune que ocurre durante la infección [8, 132]. Más allá de la diferencia con la infección, es clara la relación directa entre los niveles de ROS y la estimulación StIR mediada por el LPS. Los ensayos *in vivo* realizados en presencia de un antioxidante como el NAC, que anula la eliminación de *B. pertussis* del huésped inducida por el LPS, confirman el rol del ROS en el fenómeno StIR.

Finalmente mediante el estudio *in vitro* de la respuesta al LPS de los macrófagos alveolares y las células epiteliales pudimos corroborar que, en principio, ambas poblaciones celulares tendrían la capacidad de mediar el fenómeno evidenciado *in vivo*. A pesar de las limitaciones propias del reduccionismo del modelo *in vitro* encontramos que en respuesta a la estimulación de la vía TLR-4 los macrófagos alveolares incrementan la concentración de ROS tanto en el compartimento intracelular como en el extracelular, pudiendo llegar a inducir parcialmente la muerte de *B. pertussis* co-incubada con las mismas. Estudios previos han demostrado que el daño tisular frecuentemente observado a nivel de pulmón en diversas enfermedades inflamatorias se debe en parte a la sobreproducción de mediadores inflamatorios activados vía NF- $\kappa$ B en respuesta a la producción de ROS por el LPS [156, 228, 229].

Por su parte el modelo de células epiteliales elegido nos permitió poner de manifiesto su capacidad de incrementar su concentración de ROS intracelular. Resultados similares en estas células han sido observados en marco de trabajos con *P. aureginosa*, en cuales pudieron evidenciar que en respuesta al tratamiento con LPS purificado del misma se incrementa la producción de ROS, siendo el mismo

proporcional al tiempo de estimulación [230]. Este fenómeno resulta interesante en el marco de la infección por *B. pertussis* debido a que ha sido descrito para este patógeno la capacidad de invadir las células del epitelio respiratorio mediante el reconocimiento de zonas especializadas llamadas lipid raft, lo que constituiría un mecanismo de persistencia para el microorganismo [174-176]. Los resultados obtenidos por nosotros ponen de manifiesto que la estimulación de la vía de señalización TLR-4 logra reducir la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis*.

En su conjunto el trabajo realizado contribuye en el conocimiento de los mecanismos por los cuales *B. pertussis* puede ser eliminada del aparato respiratorio, otorgándole una relevancia central a la producción de las especies reactivas del oxígeno por las poblaciones celulares presentes en el pulmón naïve. El fenómeno StIR caracterizado, aunque no constituya en sí mismo una alternativa aplicable para el tratamiento de la tos convulsa, proporciona herramientas válidas a tener en cuenta al momento de mejorar las vacunas actuales.

En este trabajo de Tesis he abordado también un aspecto poco profundizado en el área de vacunas contra *B. pertussis* referido al rol del LPS como inmunógeno vacunal. Nuestros resultados alcanzados en el modelo de desafío intranasal muestran sin lugar a dudas que el LPS de *B. pertussis* es un inmunógeno no protector frente a las especies *B. pertussis* y *B. parapertussis*, de relevancia epidemiológica. Contrariamente, nuestros ensayos evidenciaron que el LPS de *B. parapertussis* es capaz de inducir protección activa y pasiva contra *B. parapertussis*. Este resultado es sumamente interesante por un lado porque evidencia que el LPS de *B. parapertussis* o un análogo podría ser empleado como inmunógeno contra esta especie para la cual no existe ninguna formulación protectora y por otro porque la toxicidad inducida por este LPS es muy baja comparada con la inducida por el LPS de *B. pertussis*. De hecho nuestro laboratorio está explotando estos resultados y ya ha logrado formular una vacuna eficaz no solo contra *B. pertussis* sino contra *B. parapertussis* (patente PCT/IB2014/060143).

## Perspectivas

Entre las perspectivas de los trabajos realizados en esta Tesis se encuentra la continuación de los estudios *in vitro* realizando co-cultivos con las poblaciones celulares que hemos identificado cumplen un rol en el fenómeno StIR. Estos co-cultivos los realizaríamos empleando distintos esquemas de trabajo en presencia y ausencia de LPS y de NAC en distintas combinaciones, para corroborar más claramente la función de las mismas en el fenómeno StIR.

Por otra parte pensamos analizar cuál es la estructura del LPS que resulta esencial para desencadenar el fenómeno de StIR. Para ello contamos con un panel de cepas de *B. pertussis* que presentan alteraciones en la estructura del LPS bien definidas y conocidas.

Estas moléculas también nos ayudarían a seguir profundizando sobre los mecanismos que pueden llevar a la eliminación de *B. pertussis* a través de ensayos comparativos entre estructuras de LPS que llevan al fenómeno StIR con las que no. De esta manera, podríamos seguir contribuyendo con la comprensión de mecanismos con potencial relevancia para el diseño de estrategias de inmuno-intervención frente a *B. pertussis*. Asimismo, esperamos poder relacionar los aspectos de la respuesta adaptativa protectora con los efectores finales que participan en la eliminación bacteriana.

Por otra parte, aún quedan diversos aspectos por discriminar respecto de la utilización de agonistas de TLR-4 en los protocolos de vacunación. En principio esperamos poder avanzar también en los estudios sobre los efectos adyuvantes de LPS de *B. pertussis* y *B. parapertussis* con vistas de luego poder usar análogos no tóxicos.





# MATERIALES Y MÉTODOS

MARÍA EUGENIA ZURITA. TRABAJO DE TESIS DOCTORAL 2015.



## Medios y condiciones de cultivo

Los stock bacterianos de *B. pertussis* y *B. parapertussis* se conservan como una suspensión en el medio sintético de Stainer-Scholte (SS) a  $-20^{\circ}\text{C}$  en presencia de glicerol 50 % v/v. A partir de estos stock las cepas de *Bordetella spp.* utilizadas se cultivaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 72 h en placas de Petri conteniendo el medio Bordet Gengou suplementado con sangre desfibrinada de carnero al 10 % v/v (BGAS). Transcurridas las 72 horas del primer cultivo se efectúa un subcultivo en el mismo medio durante 24 horas.

A continuación se detalla la composición de los medios de cultivo:

### Agar Bordet – Gengou Sangre (BGAS).

Agar Bordet-Gengou comercial (Difco®)	15 g/l cultivo
Peptona (Difco®)	10 % p/v
Glicerina	1 % v/v

Una vez esterilizado se suplementa con 10 % v/v de sangre de carnero.

### Stainer- Scholte (SS)

Glutamato de sodio monohidrato	10.7 g/l
L- Prolina	0.24 g/l
NaCl	2.50 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.50 g/l
KCl	0.20 g/l
MgCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0.10 g/l
CaCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	0.02 g/l
Tris-HCl	1.52 g/l

Se lleva pH 7.2 con una solución de HCl concentrado y se esteriliza 15 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ . Luego se le adiciona el complemento esterilizado por filtración.

### Complemento (20 ml 1000X)

L-Cisteína	800 mg
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	200 mg
Ac. Ascórbico	400 mg
Ac. Nicotínico	80 mg

HCl<sub>(c)</sub>

2 ml

Se lleva a volumen final con H<sub>2</sub>O destilada.

### **Aislamiento del lipopolisacárido de *Bordetella***

El lipopolisacárido (LPS) de las bacterias fue purificado por el método de extracción con fenol-agua en caliente [231, 232]. Brevemente, el microorganismo correspondiente fue crecido durante 72 h a 37°C en agar Bordet Gengou (Difco) suplementado con 10 % de sangre desfibrinada (medio BGAS), luego las colonias fueron plaqueadas en medio BGAS durante otras 24 h. El cultivo crecido en medio sólido se utilizó para inocular un cultivo líquido de Stainer-Scholte por 20 h a 36°C hasta que el cultivo alcanzó la fase exponencial tardía. La biomasa obtenida se separó del medio de cultivo mediante centrifugación a 8000 g por 30 minutos y luego fue resuspendida en Buffer fosfato (PBS: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,428 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,39 g/l, NaCl 7,2 g/l pH 7,4). A continuación se realizó la extracción mediante agregado de Fenol ácido en una proporción 1:1 con el buffer fosfato. La mezcla se homogeneizó e incubó por 15 minutos en un baño a 60°C y luego se incubó por otros 15 minutos en hielo. Finalmente se realizó una centrifugación a 4°C por 30 minutos a 8000 g conservando la fase acuosa en la que se encuentra el lipopolisacárido. Las muestras obtenidas fueron dializadas frente a agua bidestilada y se incubaron con pronasa (2 mg ml<sup>-1</sup>) durante toda la noche a 37°C. La cuantificación de las mismas se realizó mediante medidas de peso seco de las muestras liofilizadas.

La visualización de la calidad de las muestras de LPS obtenidas se determinó mediante corridas electroforéticas en geles SDS-PAGE. Para lo cual a una alícuota de cada muestra se le agregó Buffer Laemmli (Dodecil sulfato de Sodio (SDS) 8 % p/v, Glicerol 20% v/v, EDTA 0,004 M, Tris-HCl 0,2 M, pH 6,8, 0,01 % de azul de bromofenol), se ebulló por 10 minutos y fue sonicada por 15 minutos. Las muestras así obtenidas se sembraron en geles de poliacrilamida 15 % p/v con SDS.

### **Electroforesis en SDS-PAGE y Tinción de LPS**

Las corridas electroforéticas se realizaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli

[233]. El gel de apilamiento o stacking se preparó en una concentración de 4 % de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 30:0.8) en buffer Tris-HCl 1M a pH 6.8 y SDS 10 % p/v, mientras que el gel de separación se preparó en una concentración de 15 % de poliacrilamida (acrilamida : bisacrilamida 30:0.8), con TrisHCl 1M a pH 8.8 y SDS 10 % p/v. Las corridas se realizaron en equipos Miniprotean II (Bio-Rad) durante 60 a 90 minutos a 100 volts utilizando como buffer de corrida Glicina 0.37 M, SDS 10 % p/v, Tris-HCl 0.05M pH 8.3. Una vez finalizada la corrida, los LPS se visualizaron mediante una tinción de plata según se describe a continuación. El gel fue fijado durante al menos 2 horas en solución de ácido acético 5 % v/v en etanol 40 % v/v: luego se incubó en solución de ácido periódico 0,7 % p/v durante 10 minutos con el fin de oxidar a los grupos OH adyacentes que se encuentran en los azúcares del LPS . Luego se realizaron 5 lavados con agua bidestilada de 5 minutos cada uno para retirar el oxidante excedente. Posteriormente se realizó la coloración con una solución de plata al 10 % v/v (Bio-Rad). Transcurridos 10 minutos se realizaron seis lavados de 5 segundos cada uno con agua bidestilada y se procedió al agregado del desarrollador 1.5 % p/v (Bio-Rad). El gel se incubó con dicha solución hasta aparición de color en las bandas correspondientes a los LPS presentes. La reacción se detuvo con ácido acético 5% v/v. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara digital bajo iluminación blanca.

## **Caracterización *in vivo* del fenómeno StIR empleando el modelo murino de infección intranasal**

### **1-Cepas de animales**

En este trabajo se emplearon distintas cepas murinas: Balb/C, C3H/HeJ y C3H/HeN. Estas dos últimas cepas poseen el mismo background genético pero a diferencia de los C3H/HeN, empleados como control, la cepa C3H/HeJ es deficiente en la funcionalidad del receptor TLR-4. Los animales de la cepa C3H/HeJ poseen una mutación puntual en el gen que sustituye un residuo conservado de prolina por un residuo de lisina [234] en el dominio de intracitoplasmático del receptor TLR-4 En todos los casos se emplearon animales hembras de 4 a 6 semanas de edad.

## **2-Ensayos de infección**

Para realizar estos ensayos se emplearon la cepa *B. pertussis* Tohama I (CIP 8132, Collection de l'Institut Pasteur, France) y la cepa de *B. parapertussis* AR729.

En todos los ensayos la infección fue realizada por vía intranasal con suspensiones bacterianas ajustadas a  $5 \times 10^7$  UFC/ 40  $\mu$ l. Los animales fueron anestesiados con isoflurano e infectados de modo que el inóculo de infección fue distribuido equitativamente entre ambas narinas. En los grupos de animales que fueron tratados con LPS, éste se adicionó al inóculo bacteriano de infección en una dosis de 1  $\mu$ g de LPS de *B. pertussis/dosis*. Las dosis bacterianas empleadas fueron dosis subletales.

. Para verificar el número de bacterias presentes en el inóculo, se realizaron diluciones seriadas de la suspensión bacteriana, se plaquearon en BGA y luego de 3-4 días de incubación a 37°C se efectuó el recuento de bacterias viables.

## **3-Tipos de muestras colectadas**

### **A-Muestras para análisis de colonización bacteriana**

El efecto de cada tratamiento en la colonización de *B. pertussis* en pulmón fue evaluado por recuento en placa BGA de la carga bacteriana pulmonar al tiempo indicado según el ensayo. Para ello, animales infectados como se describió anteriormente, fueron sacrificados por dislocación cervical y los pulmones fueron recolectados y homogeneizados en 1 ml de PBS estéril. El homogenato fue diluido en forma seriada y distintas diluciones fueron plaqueadas en BGA e incubadas durante 4 días a 37°C. Al cabo de este tiempo, se analizó el número de UFC provenientes de pulmón. Por condición fueron empleados 5 animales en todos los ensayos realizados.

### **B-Muestras para análisis de expresión génica**

A partir de animales naïve, infectados con *B. pertussis* ( $5 \times 10^7$  UFC/40 $\mu$ l) o tratados con LPS (1  $\mu$ g) se colectaron, luego de 2 horas de tratamiento, muestras correspondientes a narinas y vías de conducción distales, tráquea y pulmón. Las mismas fueron conservadas en buffer de lisis para la extracción de RNA a -80°C hasta su procesamiento.

### **Obtención de muestras por Microdissección láser**

Para estos ensayos los pulmones de los animales fueron embebidos en OCT y congelados en nitrógeno líquido, luego de lo cual fueron mantenidos a -80°C hasta su procesamiento. A partir de cada bloque así obtenido se realizaron cortes histológicos de 15 micrones empleando el Criostato Shandon Cryotome de THERMO los cuales se depositaron sobre membranas para microdissección (Membrane Slides PEN-Membrane 2,0 µm, Leica, Alemania).

Los cortes histológicos fueron teñidos en condiciones libres de RNAsa de la siguiente manera: Etanol 70% x 30 segundos, hematoxilina férrica x 30 segundos, y dos lavados de 1 minuto con etanol 95% y etanol 100% respectivamente.

La disección del tejido fue realizada con el Sistema de Microdissección de la marca LEICA Modelo LMD6000 y las fracciones celulares definidas: bronquios, bronquiolos y parénquima pulmonar fueron recolectadas en 20 µl de buffer de lisis para la posterior extracción de RNA.

### **C-Muestras para análisis histopatológico de pulmón**

Para estos ensayos los pulmones de los animales fueron embebidos en formol al 4 %, luego de lo cual fueron mantenidos a 4°C hasta su procesamiento. A partir de cada bloque así obtenido se realizaron cortes histológicos.

Los cortes histológicos fueron teñidos de la siguiente manera: Etanol 70 % 30 segundos, hematoxilina férrica 30 segundos, dos lavados de 1 minuto con etanol 95 % y etanol 100 % respectivamente. Se obtuvieron imágenes de los cortes histológicos utilizando una cámara fotográfica asociada a un microscopio óptico NIKON.

### **D-Muestras de lavado broncoalveolar**

Para estos ensayos los animales fueron sacrificados por administración intraperitoneal de dosis apropiadas del compuesto comercial EUTHANYLE®, según indicaciones del proveedor. El lavado broncoalveolar (BAL) se realizó por canulación de la tráquea e introducción y aspiración de 1 ml de PBS 1% BSA estéril. Este proceso fue repetido tres veces.

En las muestras colectadas para análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo se utilizó buffer de lisis Acetato de K durante tres minutos a temperatura

ambiente para eliminar la contaminación por células rojas. El recuento de celular fue realizado en cámara de Neubauer's.

Las muestras de BAL colectadas para la determinación de ROS/NOS fueron centrifugadas a 640 g por 15 minutos, luego de lo cual se realizó la determinación correspondiente a partir del sobrenadante.

## **4-Determinaciones realizadas**

### ***A-Experimentos de expresión génica***

#### ***Obtención de ARN***

Todos los experimentos de expresión génica se realizaron a partir de ARN total de la muestra de interés. El ARN total fue obtenido mediante utilización del Kit Nucleospin RNAII (Macherey-Nagel, Germany) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ARN obtenido fue realizada por medida de absorbancia a 260 nm usando el espectrofotómetro ND-1000 NanoDrop. La medida A260/280 se empleó para determinar la pureza de las muestras que fueron almacenadas a -80°C hasta ser procesadas.

#### ***Obtención de cDNA***

La síntesis de cDNA fue realizada empleando 500 ng de RNA por muestra, utilizando random primers (Invitrogen) y la transcriptasa reversa MMLV-RT (Invitrogen), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente, el ARN y los random primers son mezclados e incubados a 65°C durante 5 minutos y luego colocados inmediatamente en hielo hasta la incorporación de la enzima, el buffer de reacción y los dNTPs. Para preservar la integridad del ARN se emplearon inhibidores de RNAasas (RNAse out Invitrogen). La transcripción reversa se realizó en la cicladora térmica Mastercycler eppendorf de acuerdo al siguiente protocolo: 10 minutos a 25°C, 90 minutos a 42°C para la transcripción reversa y 15 minutos a 90°C para la desnaturalización enzimática.

#### ***Medida de los niveles de expresión génica por PCR cuantitativa (Real Time PCR)***

La reacción fue realizada empleando SYBRgreen master mix 2X (Invitrogen) y diluciones 1/20 del cDNA. Todas las muestras, incluidos los controles negativos empleando agua en lugar de cDNA, fueron corridas en duplicados. La reacción fue



llevada a cabo en el equipo MyiQ™- Single color realtime PCR detection system (Bio-Rad) de acuerdo al siguiente protocolo: 2 minutos a 50°C y 10 minutos a 95° seguido por una amplificación de 40 ciclos con 1 minuto de annealing/ extensión a 60°C y 15 segundos a 95° para desnaturalización. Al final de la corrida se realizó una curva de melting para controlar la calidad de los amplicones obtenidos. El software empleado fue Bio-Rad iQ5™ versión 2.0.

Los datos fueron analizados haciendo el cálculo de  $\Delta\Delta C_t$  normalizando los niveles de expresión de todos los genes respecto de los niveles de expresión de  $\beta$ -actina [208]. Los resultados fueron expresados como incremento relativo ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) respecto de los valores correspondientes a los controles.

Los primers empleados se diseñaron utilizando el Software Primer Express (Applied Biosystems, USA) y las secuencias correspondientes son las siguientes:

Gen	forward	reverse
$\beta$ actina (murino)	CGTCATCCATGGCGAACTG	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT
IL-6 (murino)	GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA	AAGTGCATCATCGTTGTTTCA ACA
IL-1 $\beta$ (murino)	AATCTATACCTGTCCTGTCCTGTGTAATGA AAGAC	TGGGTATTGCTTGGGATCCA
CXCL2 (murino)	CCCTCAACGGAAGAACCAAAA	CACATCAGGTACGATCCAGGC
$\beta$ actina (humano)	CCTGGCACCCAGCACAAT	GCCGATCCACACGGAGTACT
CXCL2 (humano)	AAGGTGAAGTCCCCCGGAC	GCCCATTCTTGAGTGTGGCT

### **B-Análisis y cuantificación de células reclutadas al espacio broncoalveolar**

Las células obtenidas como se describió anteriormente fueron teñidas con anticuerpos conjugados a fluorocromos a la dilución adecuada, durante 45 minutos a 4°C para análisis por citometría de flujo en el equipo FACSCalibur de Becton Dickinson. Los anticuerpos utilizados fueron: CD11c (clon N418, hamster IgG, eBioscience), CD11b (clon M1/70.15, Rat IgG2b, CALTAG LABORATORIOS), Gr-1 (clon RB6-8C5, Rat IgG2b, eBioscience), Ly-6C (clon AL-21, Rat IgM,k) y Ly6G (clon 1A8, Rat IgG2a). Para cada caso fueron empleados los controles de isotipos correspondientes. Para cada muestra

fueron adquiridos 10.000 eventos en la región de interés. El análisis de los resultados fue realizado con el software Flojow © (Tree Star, Inc.).

### **C-Cuantificación de ROS**

La concentración de agua oxigenada fue determinada mediante el kit Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante. El reactivo Amplex® Red en presencia de peroxidasa reacciona con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una proporción 1:1 dando el producto fluorescente resorufin. El mismo tiene su máximo de excitación a 571 nm y de emisión a 585 nm. Esta reacción permite determinar concentraciones de agua oxigenada de hasta 50 nM.

Para la determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cada muestra de BAL se mezclaron 50 µl de la misma con 50 µl del reactivo Amplex (Solución Stock Amplex® Red 10 mM, solución Stock de HRP 10 U/ml y Buffer de reacción 1X) y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. A continuación se determinó la fluorescencia en FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH). En paralelo se realizó la curva de calibración con un patrón de agua oxigenado provisto por el fabricante.

### **D-Cuantificación de NOS**

La producción de especies reactivas del nitrógeno en sobrenadante de BAL fue estimada mediante cuantificación de la concentración de nitritos/nitratos por el método espectrofotométrico descrito por Miranda y colaboradores, con las modificaciones propuestas por Beda y Nedospasov [149, 150]. Brevemente, a 20 µl del sobrenadante de BAL se le adicionan 100 µl del reactivo de Griess (Sulfanilamida al 2 % en HCl al 5%, N<sup>1</sup>-(1-naftil), N<sup>2</sup>-dietilendiamina oxalato en agua) y 880 µl de agua. La mezcla es agitada y luego de 5 minutos se mide la absorbancia a 540 nm. Las determinaciones se realizan en simultáneo con la curva de calibración.

## **5-Tratamientos de depleción**

### ***A-Depleción de neutrófilos***

Los neutrófilos de animales Balb/C fueron depletados mediante administración intraperitoneal de ascitis conteniendo el anticuerpo monoclonal anti-Gr1 de ratón (clon RB6-8C5). Los niveles de proteína de la ascitis fueron medidos por el método de

BSA, normalizando por dilución los distintos lotes de ascitis a una concentración proteica de 8 mg/ml.

El esquema de administración empleado es el siguiente: administración de 500 µl de ascitis 24 h previas a la infección de *B. pertussis*. El efecto de la depleción fue evaluado por citometría de flujo. Como control se emplearon animales no tratados. Para cada condición se emplearon 5 animales.

### ***B-Depleción de ROS***

Para bloquear la producción de especies reactivas del oxígeno utilizó antioxidante N-acetil-cisteína (NAC; Fluka). La preparación de la solución de NAC se realizó en todas las ocasiones el mismo día de su utilización.

El tratamiento con N-acetil-cisteína se realizó por administración intranasal de una solución conteniendo 3,2 µg de NAC (40 µl de una solución de NAC 0,5 mM). En los grupos tratados con LPS el antioxidante fue coadministrado con el mismo. En los ensayos de colonización el tratamiento con NAC fue realizado 2 h antes de la infección con *B. pertussis* ( $5 \times 10^7$  UFC/40 µl). La inhibición de los ROS fue confirmada mediante determinación de los mismos en el sobrenadante del lavado broncoalveolar como ya fue descrito.

### ***C-Depleción de NOS***

El bloqueo de la producción de especies reactivas del nitrógeno se realizó mediante inhibición de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) por administración del inhibidor Aminoguanidina (5 µg/kg de peso; Sigma).

El tratamiento se realizó mediante administración intraperitoneal del inhibidor 2 h antes de la estimulación con LPS o de la infección con *B. pertussis*, según corresponda. La inhibición fue corroborada mediante la determinación de nitritos/nitratos en el sobrenadante de BAL de los animales.

## **Ensayos *in vitro* empleando la línea celular A549**

### **1-Condiciones de cultivo**

Como modelo de células epiteliales de pulmón se utilizó la línea celular humana (Neumocitos tipo II) A549 (ATCC CCL185). Las células A549 fueron cultivadas en botellas (Nunc) en medio simple modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, 100 unidades/ml de penicilina, y 100 mg/ml de streptomina (Pen/Strep) en estufas a 37 °C, con 5 % de CO<sub>2</sub> y 100 % de humedad. Cuando el cultivo alcanzó un 70-80 % de confluencia, las células fueron removidas con TrypLE™ Express Enzyme (1X) (Life Technologies) y cultivadas en placas de 24 fosas o 96 fosas, según corresponda. El estado del cultivo se testeó por observación microscópica y recuento de células viables por exclusión mediante tinción con Trypan blue de fosas elegidas al azar.

### **2-Ensayos de estimulación**

Para los ensayos de estimulación con LPS las células fueron sembradas en placas de cultivo Nunclon Delta (Nunc) de 24 fosas o 96 fosas 18 h antes de cada ensayo según se indica a continuación:

- Para los análisis de expresión génica, determinación de ROS en sobrenadante de cultivo y ensayos de co-cultivo con *B. pertussis*, se utilizaron placas de 24 fosas con aproximadamente  $1 \times 10^5$  células.
- Para la determinación de ROS intracelular por el método de CM-H<sub>2</sub>DCFDA se utilizaron placas de 96 fosas de baja fluorescencia con aproximadamente  $2 \times 10^4$  células por fosa.

Cuatro horas antes de realizar la estimulación con LPS (0,5 µg/300 µl DMEM) el medio suplementado con SFB y antibióticos fue reemplazado por medio fresco sin suplementar.

### **3-Ensayos de expresión génica**

La recolección de muestras para la determinación del nivel de expresión génica se realizó con 100 µl buffer de lisis para extracción de RNA. Las muestras se conservaron a -80°C hasta su procesamiento, como se indicó previamente.

Los primers empleados se diseñaron utilizando el Software Primer Express (Applied Biosystems, USA) y las secuencias correspondientes son las siguientes:

<b>Gen</b>	<b>forward</b>	<b>reverse</b>
$\beta$ actina (humano)	CCTGGCACCCAGCACAAT	GCCGATCCACACGGAGTACT
CXCL2 (humano)	AAGGTGAAGTCCCCCGGAC	GCCCATTCCTTGAGTGTGGCT

#### **4-Determinación de ROS en sobrenadante de cultivo**

La concentración de agua oxigenada en los sobrenadantes de cultivo de las células epiteliales fue determinada mediante el kit Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante, como se indicó previamente.

#### **5-Determinación de ROS intracelular por el método de CM-H<sub>2</sub>DCFDA**

Para la determinación ROS intracelular las células A549 fueron estimuladas con LPS (0,5  $\mu$ g/300  $\mu$ l DMEM) por 1 h. A continuación las fosas fueron lavadas con buffer PBS-HEPES (1mM) 3 veces, luego de lo cual se las incubó por 30 minutos en la oscuridad a 37°C en presencia de 100  $\mu$ l de una solución 4  $\mu$ M de CM-H<sub>2</sub>DCFDA en PBS-HEPES. Finalmente se lavaron con buffer PBS-HEPES tres veces. Las fosas destinadas para control positivo fueron tratadas con agua oxigenada por 15 minutos.

La fluorescencia se determinó mediante microscopía de fluorescencia. Se compensaron las condiciones de captura de manera tal que la saturación de pixel en la cámara CCD corresponda al control con peróxido de hidrógeno. Se mantuvieron las condiciones de captura (aumento 20X, tiempo de integración, filtros de excitación y factor de ganancia) durante la captura de todas las imágenes del ensayo. El análisis de las imágenes obtenidas se realizó mediante la técnica puesta a punto por el Dr. David Romanin en el marco de su trabajo de Tesis doctoral [235].

#### **6-Depleción de ROS**

La inhibición de la producción de ROS en la línea de células epiteliales A549 se realizó mediante tratamiento con NAC administrado en simultáneo o 2 h antes de la

estimulación con LPS. Las concentraciones del antioxidante evaluadas fueron 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  y 4  $\mu\text{M}$ .

### **7-Co-cultivo de células A549 con *B. pertussis***

Para los ensayos co-cultivo de *B. pertussis* con la línea celular A549 las células fueron sembradas en placas de cultivo Nunclon Delta (Nunc) de 24 fosas con aproximadamente  $1 \times 10^5$  células. Luego de 18 h se reemplazó el medio de cultivo por DMEM fresco sin suplementar e incubó por 4 h, a partir de lo cual se realizaron los ensayos de co-incubación según se detalla a continuación.

#### **A-Evaluación de la sobrevida extracelular de *B. pertussis***

Para los ensayos de poder bactericida extracelular las células se incubaron con una suspensión de *B. pertussis* por 1 hora a 37°C y 5 % de  $\text{CO}_2$  ( $1 \times 10^7$  UFC/fosa, correspondientes a una proporción bacteria:células de 100:1). Las co-incubaciones se realizaron en presencia y ausencia de estimulación previa con LPS (1 h, 0,5  $\mu\text{g}/300 \mu\text{l}$  DMEM). Las placas fueron centrifugadas a 640 g por 15 minutos para favorecer el contacto entre ambos tipos celulares. Finalmente se realizaron diluciones seriadas de los sobrenadantes y se plaqueó para recuento de colonias en BGA.

#### **B-Ensayos de Invasión**

Para evaluar la capacidad de *B. pertussis* de invadir las células de línea A549 las mismas se incubaron con dos suspensiones de *B. pertussis* correspondientes a una MOI 100:1 ( $1 \times 10^7$  UFC/fosa) y una MOI 150:1 ( $1,5 \times 10^7$  UFC/fosa) a 37°C y 5 %  $\text{CO}_2$  por 1, 2 y 3h. Previo a la incubación las placas habían sido sometidas a una centrifugación por 15 minutos a 640 g para favorecer la interacción entre ambos tipos celulares. Posteriormente se incubaron todas las fosas por dos horas con Polimixina B 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para eliminar las bacterias extracelulares. Se realizaron lavados con PBS para eliminar los restos de antibiótico y finalmente se lisaron las células por tratamiento con saponina y se plaquearon diluciones seriadas de los sobrenadantes en BGA para recuento de UFC de *B. pertussis*

#### **C-Evaluación de la sobrevida intracelular de *B. pertussis***

Para los ensayos de poder bactericida intracelular se agregaron a cada fosa  $1 \times 10^7$  UFC de *B. pertussis* (correspondientes a una proporción bacteria:células de 100:1), se

centrifugó a 640 g por 15 minutos para favorecer la interacción y se incubó por 2 horas. Transcurrido ese tiempo se cambió el medio y se trató las células por 30 min o 1h con 0,5 µg de LPS a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se incubaron todas las fosas por dos horas con Polimixina B 200 µg/ml para eliminar las bacterias extracelulares. Finalmente se lisaron las células por tratamiento con saponina y se realizaron diluciones seriadas de los sobrenadantes que se plaquearon en BGA para recuento de UFC de *B. pertussis*.

Los controles realizados en estos ensayos fueron: (a) control de viabilidad celular: pocillos con células y sin el agregado de bacterias pero sometidos a todos los tratamientos del ensayo fueron chequeados por observación y recuento de células viables durante todo el experimento, (b) control de muerte bacteriana por Polimixina B en tubo:  $1 \times 10^7$  bacterias suspendidas en 300 µl de medio DMEM suplementado con SFB fueron incubadas con Polimixina B (100 µg/ ml) durante 2 h a 37 °C. Finalizado este tiempo, las bacterias se lavaron con PBS y se sembraron en BGA para recuento de UFC. El tratamiento con Polimixina B resultó en una disminución de 99.98 % de las UFC obtenidas, indicando que éste antibiótico mata eficientemente a las bacterias en las condiciones de trabajo, (c) control de viabilidad bacteriana en pocillos sin células:  $1 \times 10^7$  bacterias suspendidas en 300 µl de medio DMEM con y sin agregado de LPS fueron adicionadas a pocillos sin células. Se obtuvieron recuentos similares para las incubaciones con y sin LPS, (d) control de inóculo bacteriano: el inóculo bacteriano se determinó por recuento de viables en BGA.

## **Ensayos *in vitro* empleando macrófagos alveolares**

### **1-Condiciones de cultivo**

Las células obtenidas a partir del BAL de animales Balb/c naïve fueron resuspendidas en RPMI 10 % SFB y sembradas en placa de cultivo. Se incubaron por 1 hora a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>, luego se lavaron las células no adheridas y se procedió a realizar la estimulación correspondiente.

## **2-Ensayos de estimulación**

Para los ensayos de estimulación con LPS las células fueron sembradas en placas de cultivo Nunclon Delta (Nunc) de 24 fosas o 96 fosas según se indica a continuación:

- placas Nunc de baja fluorescencia de 96 fosas con  $2 \times 10^4$  células/ fosa para los ensayos de cuantificación de ROS intracelular por el método de CM-H<sub>2</sub>DCFDA.
- placas de 24 fosas con  $1 \times 10^5$  células/ fosa para los ensayos de determinación de ROS en sobrenadante de cultivo y ensayos de co-cultivo con *B. pertussis*

La estimulación fue realizada con LPS (0,5 µg/300 µl RPMI) durante 15 min, 30 min o 60 min a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub> según se indique.

## **3-Determinación de ROS en sobrenadante de cultivo**

La concentración de agua oxigenada en los sobrenadantes de cultivo de macrófagos alveolares fue determinada mediante el kit Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante, como se indicó previamente.

## **4-Determinación de ROS intracelular por el método de CM-H<sub>2</sub>DCFDA**

Para la determinación ROS intracelular los macrófagos alveolares fueron estimulados con LPS (0,5 µg/300 µl DMEM) por 1 h. La cuantificación de los ROS intracelulares se realizó como se indicó previamente.

## **5-Co-cultivo de macrófagos alveolares con *B. pertussis***

Para los ensayos co-cultivo con *B. pertussis* los macrófagos alveolares sembrados en placa de 24 fosas como se indicó previamente fueron estimulados con LPS (0,5 µg/300 µl RPMI) durante 15 min, 30 min o 60 min a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Luego de lo cual se adicionó una suspensión de *B. pertussis*  $1 \times 10^7$  UFC/fosa, correspondientes a una proporción bacteria:células de 100:1. Las placas se centrifugaron a 640 g por 15 minutos y luego se incubaron por 1 hora a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Finalmente se realizaron diluciones seriadas de los sobrenadantes y se plaqueó para recuento de UFC de *B. pertussis* en placas BGA.



Los controles realizados en estos ensayos fueron: (a) control de viabilidad celular: pocillos con células y sin el agregado de bacterias pero sometidos a todos los tratamientos del ensayo fueron chequeados por observación y recuento de células viables durante todo el experimento, (b) control de viabilidad bacteriana en pocillos sin células:  $1 \times 10^7$  bacterias suspendidas en 300  $\mu\text{l}$  de medio RPMI con y sin agregado de LPS fueron adicionadas a pocillos sin células. Se obtuvieron recuentos similares para las incubaciones con y sin LPS, (c) control de inóculo bacteriano: el inóculo bacteriano se determinó por recuento de viables en BGA.

### **Determinación del poder bactericida del agua oxigenada *in vitro***

Para evaluar el poder bactericida del agua oxigenada sobre *B. pertussis* se realizaron incubaciones de una suspensión con  $1 \times 10^7$  UFC de la misma con diferentes concentraciones de agua oxigenada comercial. Las mezclas se incubaron por 1h a 37°C. Las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  evaluadas fueron: 2,26  $\mu\text{M}$ , 22,6  $\mu\text{M}$ , 226  $\mu\text{M}$ ,  $2,26 \times 10^3$   $\mu\text{M}$  y  $2,26 \times 10^4$   $\mu\text{M}$ . Como control negativo se utilizó una suspensión bacteriana sin agregado de agua oxigenada. Luego de la incubación se realizaron diluciones seriadas de las mezclas y se plaquearon en BGA para posterior recuento de colonias.

### **Estudios *in vivo* de la capacidad protectora del LPS empleando el modelo de desafío intranasal en ratón**

#### **1-Preparación de vacunas en el laboratorio**

Se partió de LPS purificados y cuantificados de *B. pertussis* y *B. parapertussis* que fueron formulados en una dosis correspondiente a 1  $\mu\text{g}$  y 1,5  $\mu\text{g}$  de LPS en 40  $\mu\text{l}$ . Estos fueron detoxificados mediante incubación con formol al 0,35 % final por 20 h a 37 °C. Finalmente se adicionó el adyuvante  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (Biol SAIC) en una concentración final 1mg/ml. Las vacunas se conservaron a 4°C por no más de una semana.

#### **2-Ensayos de Inmunización activa**

Se utilizaron grupos de ratones Balb/c hembras de 3 a 4 semanas de edad (5 por tratamiento). Los ratones fueron inmunizados 2 veces con intervalos de 14 días. Las

inmunizaciones se realizaron mediante inyección intraperitoneal con vacunas conteniendo 1 µg o 1,5 µg de LPS purificado de *B. pertussis* o *B. parapertussis* preparadas por nosotros.

Para el desafío se utilizó una suspensión bacteriana realizada a partir de un crecimiento de 24 h en BGA. La infección se realizó a los 14 días de la última inmunización por inoculación intranasal en las narinas del ratón bajo leve anestesia con 40 µl de una suspensión conteniendo  $5 \times 10^7$  UFC de *B. pertussis* o *B. parapertussis*. Los ratones desafiados fueron sacrificados mediante dislocación cervical a los 7 días del desafío. Se extrajeron los pulmones en esterilidad y se homogeneizaron en 1 ml de PBS. Luego se realizaron diluciones seriadas de los homogenatos de pulmón, se plaquearon en medio BGAS y se realizó recuento de las UFC después de 3-4 días de incubación a 37°C.

### **3-Ensayos de Inmunización pasiva**

Para este ensayo como primera medida se procedió a obtener las muestras de suero correspondientes a animales inmunizados con dos dosis de una vacuna conteniendo 1,5 µg/dosis de LPS de *B. parapertussis*. Para este fin a los 14 días de la segunda inmunización se sacaron muestras de sangre de todos los animales inmunizados y se obtuvo el suero. Se realizó una mezcla a partir de todos los sueros obtenidos la cual se utilizó para realizar la inmunización pasiva, previa determinación del título, como se detalla a continuación.

Grupos de 5 animales fueron inyectados por vía intraperitoneal con 200 µl del suero proveniente de los animales inmunizados con el LPS de *B. parapertussis*. Luego de 24 horas los mismos fueron desafiados por vía intranasal con una suspensión de *B. parapertussis* conteniendo  $5 \times 10^7$  UFC/40 µl.

Los ratones desafiados fueron sacrificados mediante dislocación cervical a los 7 días del desafío. Se extrajeron los pulmones en esterilidad y se homogeneizaron en PBS. Luego se realizaron diluciones seriadas de los homogenatos de pulmón, se plaquearon en medio BGAS y se realizó recuento de las UFC después de 3-4 días de incubación a 37°C.

## **Análisis estadístico**

Los gráficos y el análisis estadístico fueron realizados con el programa GraphPad versión 5.00 (San Diego, California, USA). Para el análisis estadístico se realizaron ANOVA de una o dos vías seguidas del test de Bonferroni para la evaluación de diferencias de medias.

Además se realizaron Test de Student pareados y no pareados de acuerdo a los datos a evaluar.



# BIBIOGRAFÍA

MARÍA EUGENIA ZURITA. TRABAJO DE TESIS DOCTORAL 2015.



1. Caroff, M., et al., *Structure of the Bordetella pertussis 1414 endotoxin*. FEBS Lett, 2000. **477**(1-2): p. 8-14.
2. Quinello, C., et al., *Passive acquisition of protective antibodies reactive with Bordetella pertussis in newborns via placental transfer and breast-feeding*. Scand J Immunol, 2010. **72**(1): p. 66-73.
3. Elder, K.D. and E.T. Harvill, *Strain-dependent role of BrkA during Bordetella pertussis infection of the murine respiratory tract*. Infect Immun, 2004. **72**(10): p. 5919-24.
4. Khelef, N., et al., *Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis: two immunologically distinct species*. Infect Immun, 1993. **61**(2): p. 486-90.
5. Mattoo, S., et al., *Mechanisms of Bordetella pathogenesis*. Front Biosci, 2001. **6**: p. E168-86.
6. Mattoo, S. and J.D. Cherry, *Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to Bordetella pertussis and other Bordetella subspecies*. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(2): p. 326-82.
7. Pishko, E.J., et al., *Bordetella pertussis acquires resistance to complement-mediated killing in vivo*. Infect Immun, 2003. **71**(9): p. 4936-42.
8. Carbonetti, N.H., *Immunomodulation in the pathogenesis of Bordetella pertussis infection and disease*. Curr Opin Pharmacol, 2007. **7**(3): p. 272-8.
9. Carbonetti, N.H., et al., *Pertussis toxin targets airway macrophages to promote Bordetella pertussis infection of the respiratory tract*. Infect Immun, 2007. **75**(4): p. 1713-20.
10. Mills, K.H., *Immunity to Bordetella pertussis*. Microbes Infect, 2001. **3**(8): p. 655-77.
11. Jackson, D.W. and P. Rohani, *Perplexities of pertussis: recent global epidemiological trends and their potential causes*. Epidemiol Infect, 2014. **142**(4): p. 672-84.
12. Aguas, R., G. Goncalves, and M.G. Gomes, *Pertussis: increasing disease as a consequence of reducing transmission*. Lancet Infect Dis, 2006. **6**(2): p. 112-7.
13. <http://www.unicef.org/immunization/les/SlidesGlobalImmunization.pdf>, World Health Organization: Progress Towards Global Immunization Goals 2012.
14. Wearing, H.J. and P. Rohani, *Estimating the duration of pertussis immunity using epidemiological signatures*. PLoS Pathog, 2009. **5**(10): p. e1000647.
15. Mooi, F.R., I.H. van Loo, and A.J. King, *Adaptation of Bordetella pertussis to vaccination: a cause for its reemergence?* Emerg Infect Dis, 2001. **7**(3 Suppl): p. 526-8.
16. Warfel, J.M., L.I. Zimmerman, and T.J. Merkel, *Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(2): p. 787-92.
17. Errea, A., et al., *Mucosal innate response stimulation induced by lipopolysaccharide protects against Bordetella pertussis colonization*. Med Microbiol Immunol, 2010. **199**(2): p. 103-8.
18. World Health Organization, W., *Pertussis vaccines: WHO position paper*. Wkly Epidemiol Rec, 2010. **85**(40): p. 385-400.
19. Rodgers, L., et al., *Epidemiologic and laboratory features of a large outbreak of pertussis-like illnesses associated with cocirculating Bordetella holmesii and Bordetella pertussis--Ohio, 2010-2011*. Clin Infect Dis, 2013. **56**(3): p. 322-31.
20. Poland, G.A., *Pertussis outbreaks and pertussis vaccines: new insights, new concerns, new recommendations?* Vaccine, 2012. **30**(49): p. 6957-9.
21. Gabutti, G., et al., *Pertussis: Current perspectives on epidemiology and prevention*. Hum Vaccin Immunother, 2014. **11**(1).
22. Clark, T.A., *Changing pertussis epidemiology: everything old is new again*. J Infect Dis, 2014. **209**(7): p. 978-81.
23. Celentano, L.P., et al., *Resurgence of pertussis in Europe*. Pediatr Infect Dis J, 2005. **24**(9): p. 761-5.

24. Clark, T.A., N.E. Messonnier, and S.C. Hadler, *Pertussis control: time for something new?* Trends Microbiol, 2012. **20**(5): p. 211-3.
25. Gzyl, A., et al., *Pertussis in Poland.* Int J Epidemiol, 2004. **33**(2): p. 358-65.
26. Schmidt, J.E., et al., *The EUVAC-NET survey: national pertussis surveillance systems in the European Union, Switzerland, Norway, and Iceland.* Euro Surveill, 2001. **6**(6): p. 98-104.
27. Carlsson, R.M. and B. Trollfors, *Control of pertussis--lessons learnt from a 10-year surveillance programme in Sweden.* Vaccine, 2009. **27**(42): p. 5709-18.
28. Carlsson, R., et al., *Surveillance of infant pertussis in Sweden 1998-2012; severity of disease in relation to the national vaccination programme.* Euro Surveill, 2015. **20**(6).
29. van Hoek, A.J., et al., *The burden of disease and health care use among pertussis cases in school aged children and adults in England and Wales; a patient survey.* PLoS One, 2014. **9**(11): p. e111807.
30. Juretzko, P., et al., *Pertussis in Germany: regional differences in management and vaccination status of hospitalized cases.* Epidemiol Infect, 2001. **127**(1): p. 63-71.
31. Romanin, V., et al., *Epidemiological situation of pertussis and strategies to control it: Argentina, 2002-2011.* Arch Argent Pediatr, 2014. **112**(5): p. 413-20.
32. Falleiros Arlant, L.H., et al., *Pertussis in Latin America: epidemiology and control strategies.* Expert Rev Anti Infect Ther, 2014. **12**(10): p. 1265-75.
33. Locht, C., *Bordetella: Molecular Microbiology.* 2007, Institut Pasteur de Lille, France

Horizon Bioscience.

34. Parkhill, J., et al., *Comparative analysis of the genome sequences of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica.* Nat Genet, 2003. **35**(1): p. 32-40.
35. van der Zee, A., et al., *Molecular evolution and host adaptation of Bordetella spp.: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences.* J Bacteriol, 1997. **179**(21): p. 6609-17.
36. Bradford, A., et al., *Interim report on clinic intake and safety data collected from 17 NIDA-funded naltrexone studies.* NIDA Res Monogr, 1976(9): p. 163-71.
37. Diss, T.C., et al., *Parvovirus B19 is associated with benign testes as well as testicular germ cell tumours.* Mol Pathol, 1999. **52**(6): p. 349-52.
38. Stainer, D.W. and M.J. Scholte, *A simple chemically defined medium for the production of phase I Bordetella pertussis.* J Gen Microbiol, 1970. **63**(2): p. 211-20.
39. Floret, D., et al., *[Action to be taken when facing one or more cases of whooping-cough].* Arch Pediatr, 2005. **12**(8): p. 1281-91.
40. Hovinga, J., E.R. Kraal, and L.A. Roorda, *A follow-up of osteotomies for dysgnathia.* J Maxillofac Surg, 1979. **7**(4): p. 271-82.
41. Crowcroft, N.S. and R.G. Pebody, *Recent developments in pertussis.* Lancet, 2006. **367**(9526): p. 1926-36.
42. Cherry, J.D., *The epidemiology of pertussis: a comparison of the epidemiology of the disease pertussis with the epidemiology of Bordetella pertussis infection.* Pediatrics, 2005. **115**(5): p. 1422-7.
43. Gilberg, S., et al., *Evidence of Bordetella pertussis infection in adults presenting with persistent cough in a french area with very high whole-cell vaccine coverage.* J Infect Dis, 2002. **186**(3): p. 415-8.
44. Carbonetti, N.H., et al., *Pertussis toxin plays an early role in respiratory tract colonization by Bordetella pertussis.* Infect Immun, 2003. **71**(11): p. 6358-66.
45. Crowcroft, N.S., et al., *How best to estimate the global burden of pertussis?* Lancet Infect Dis, 2003. **3**(7): p. 413-8.
46. Dingle, K.E., et al., *Multilocus sequence typing system for Campylobacter jejuni.* J Clin Microbiol, 2001. **39**(1): p. 14-23.



47. Preston, A., *Bordetella pertussis: the intersection of genomics and pathobiology*. CMAJ, 2005. **173**(1): p. 55-62.
48. Cotter, P.A., et al., *Filamentous hemagglutinin of Bordetella bronchiseptica is required for efficient establishment of tracheal colonization*. Infect Immun, 1998. **66**(12): p. 5921-9.
49. Kaneko, J.J. and R. Mills, *Erythrocytic enzyme activity, ion concentrations, osmotic fragility, and glutathione stability in bovine erythropoietic porphyria and its carrier state*. Am J Vet Res, 1969. **30**(10): p. 1805-10.
50. Marr, N., et al., *Variability in the lipooligosaccharide structure and endotoxicity among Bordetella pertussis strains*. J Infect Dis, 2010. **202**(12): p. 1897-906.
51. Caroff, M., et al., *Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides*. Microbes Infect, 2002. **4**(9): p. 915-26.
52. Banus, H.A., et al., *Host genetics of Bordetella pertussis infection in mice: significance of Toll-like receptor 4 in genetic susceptibility and pathobiology*. Infect Immun, 2006. **74**(5): p. 2596-605.
53. Higgins, S.C., et al., *Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to Bordetella pertussis by inhibiting inflammatory pathology*. J Immunol, 2003. **171**(6): p. 3119-27.
54. Banus, S., et al., *The role of Toll-like receptor-4 in pertussis vaccine-induced immunity*. BMC Immunol, 2008. **9**: p. 21.
55. Fransen, F., et al., *Differential effect of TLR2 and TLR4 on the immune response after immunization with a vaccine against Neisseria meningitidis or Bordetella pertussis*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15692.
56. Higgins, S.C., et al., *TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to Bordetella pertussis: role of IL-17-producing T cells*. J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7980-9.
57. Leef, M., et al., *Protective immunity to Bordetella pertussis requires both B cells and CD4(+) T cells for key functions other than specific antibody production*. J Exp Med, 2000. **191**(11): p. 1841-52.
58. Mills, K.H., et al., *A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against Bordetella pertussis*. Infect Immun, 1998. **66**(2): p. 594-602.
59. Redhead, K., et al., *Effective immunization against Bordetella pertussis respiratory infection in mice is dependent on induction of cell-mediated immunity*. Infect Immun, 1993. **61**(8): p. 3190-8.
60. Barbic, J., et al., *Role of gamma interferon in natural clearance of Bordetella pertussis infection*. Infect Immun, 1997. **65**(12): p. 4904-8.
61. Mills, K.H., et al., *Cell-mediated immunity to Bordetella pertussis: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model*. Infect Immun, 1993. **61**(2): p. 399-410.
62. Spensieri, F., et al., *Bordetella pertussis inhibition of interleukin-12 (IL-12) p70 in human monocyte-derived dendritic cells blocks IL-12 p35 through adenylate cyclase toxin-dependent cyclic AMP induction*. Infect Immun, 2006. **74**(5): p. 2831-8.
63. McKenzie, B.S., R.A. Kastelein, and D.J. Cua, *Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway*. Trends Immunol, 2006. **27**(1): p. 17-23.
64. Wolfe, D.N., et al., *Comparative role of immunoglobulin A in protective immunity against the Bordetellae*. Infect Immun, 2007. **75**(9): p. 4416-22.
65. Hellwig, S.M., et al., *Immunoglobulin A-mediated protection against Bordetella pertussis infection*. Infect Immun, 2001. **69**(8): p. 4846-50.
66. Bordet, J.G., O., *Le microbe de la coqueluche*. Ann. Inst. Pasteur, 1906. **20**: p. 731-741.

67. Shapiro-Shapin, C.G., *Pearl Kendrick, Grace Eldering, and the pertussis vaccine*. Emerg Infect Dis, 2010. **16**(8): p. 1273-8.
68. Klein, N.P., *Licensed pertussis vaccines in the United States. History and current state*. Hum Vaccin Immunother, 2014. **10**(9): p. 2684-90.
69. Rigo-Medrano, M.V., et al., *[Acellular vaccines (DTPa/dTpa) against whooping cough, protection duration.]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2015.
70. Wendelboe, A.M.V.R.A., Salmaso S., Englund J.A., *Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination*. Pediatr Infect Dis J, 2005. **24** (5 suppl): p. 58-61.
71. McGirr, A. and D.N. Fisman, *Duration of Pertussis Immunity After DTaP Immunization: A Meta-analysis*. Pediatrics, 2015. **135**(2): p. 331-343.
72. Forsyth, K.D., et al., *Prevention of pertussis: recommendations derived from the second Global Pertussis Initiative roundtable meeting*. Vaccine, 2007. **25**(14): p. 2634-42.
73. Stokley, S., et al., *Adolescent vaccination-coverage levels in the United States: 2006-2009*. Pediatrics, 2011. **128**(6): p. 1078-86.
74. Coudeville, L., et al., *Adult vaccination strategies for the control of pertussis in the United States: an economic evaluation including the dynamic population effects*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6284.
75. Guiso, N., J. Liese, and S. Plotkin, *The Global Pertussis Initiative: meeting report from the fourth regional roundtable meeting, France, April 14-15, 2010*. Hum Vaccin, 2011. **7**(4): p. 481-8.
76. Liese, J.G., et al., *Clinical and epidemiological picture of B pertussis and B parapertussis infections after introduction of acellular pertussis vaccines*. Arch Dis Child, 2003. **88**(8): p. 684-7.
77. Long, G.H., et al., *Acellular pertussis vaccination facilitates Bordetella parapertussis infection in a rodent model of bordetellosis*. Proc Biol Sci, 2010. **277**(1690): p. 2017-25.
78. Evans, S.E., et al., *Stimulated innate resistance of lung epithelium protects mice broadly against bacteria and fungi*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **42**(1): p. 40-50.
79. Clement, C.G., et al., *Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(12): p. 1322-30.
80. Tuvim, M.J., et al., *Augmented lung inflammation protects against influenza A pneumonia*. PLoS One, 2009. **4**(1): p. e4176.
81. Evans, S.E., et al., *Inhaled innate immune ligands to prevent pneumonia*. Br J Pharmacol, 2011. **163**(1): p. 195-206.
82. Duggan, J.M., et al., *Synergistic interactions of TLR2/6 and TLR9 induce a high level of resistance to lung infection in mice*. J Immunol, 2011. **186**(10): p. 5916-26.
83. Kirimanjeswara, G.S., et al., *The complex mechanism of antibody-mediated clearance of Bordetella from the lungs requires TLR4*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7504-11.
84. Kimman, T.G., et al., *Association of interacting genes in the toll-like receptor signaling pathway and the antibody response to pertussis vaccination*. PLoS ONE, 2008. **3**(11): p. e3665.
85. Chen, R., et al., *Nontypeable Haemophilus influenzae lipoprotein P6 induces MUC5AC mucin transcription via TLR2-TAK1-dependent p38 MAPK-AP1 and IKKbeta-IkappaBalpha-NF-kappaB signaling pathways*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **324**(3): p. 1087-94.
86. Ha, U., et al., *A novel role for IkappaB kinase (IKK) alpha and IKKbeta in ERK-dependent up-regulation of MUC5AC mucin transcription by Streptococcus pneumoniae*. J Immunol, 2007. **178**(3): p. 1736-47.
87. Lemjabbar, H. and C. Basbaum, *Platelet-activating factor receptor and ADAM10 mediate responses to Staphylococcus aureus in epithelial cells*. Nat Med, 2002. **8**(1): p. 41-6.

88. Li, D., et al., *Cloning of the amino-terminal and 5'-flanking region of the human MUC5AC mucin gene and transcriptional up-regulation by bacterial exoproducts*. J Biol Chem, 1998. **273**(12): p. 6812-20.
89. Wang, B., et al., *Novel cytoplasmic proteins of nontypeable Haemophilus influenzae up-regulate human MUC5AC mucin transcription via a positive p38 mitogen-activated protein kinase pathway and a negative phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(2): p. 949-57.
90. Cole, A.M. and T. Ganz, *Antimicrobial peptides and proteins in the CF airway*. Methods Mol Med, 2002. **70**: p. 447-64.
91. Brogden, K.A., *Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?* Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(3): p. 238-50.
92. Brogden, K.A., et al., *The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection*. Nat Immunol, 2005. **6**(6): p. 558-64.
93. Wang, Y., et al., *High-level expression and novel antifungal activity of mouse beta defensin-1 mature peptide in Escherichia coli*. Appl Biochem Biotechnol, 2010. **160**(1): p. 213-21.
94. Jiang, Y., et al., *Expression of mouse beta-defensin-3 in MDCK cells and its anti-influenza-virus activity*. Arch Virol, 2009. **154**(4): p. 639-47.
95. Ganz, T., *Antimicrobial polypeptides*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(1): p. 34-8.
96. Pastva, A.M., J.R. Wright, and K.L. Williams, *Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D: implications in lung disease*. Proc Am Thorac Soc, 2007. **4**(3): p. 252-7.
97. Fischer, H., *Mechanisms and function of DUOX in epithelia of the lung*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(10): p. 2453-65.
98. Schwarzer, C., et al., *NADPH oxidase-dependent acid production in airway epithelial cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(35): p. 36454-61.
99. Conner, G.E., M. Salathe, and R. Forteza, *Lactoperoxidase and hydrogen peroxide metabolism in the airway*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(12 Pt 2): p. S57-61.
100. Tran Minh, N.N., et al., *Cell-mediated immune responses to antigens of Bordetella pertussis and protection against pertussis in school children*. Pediatr Infect Dis J, 1999. **18**(4): p. 366-70.
101. Mills, K.H. and K. Redhead, *Cellular immunity in pertussis*. J Med Microbiol, 1993. **39**(3): p. 163-4.
102. Ryan, M., et al., *Bordetella pertussis-specific Th1/Th2 cells generated following respiratory infection or immunization with an acellular vaccine: comparison of the T cell cytokine profiles in infants and mice*. Dev Biol Stand, 1997. **89**: p. 297-305.
103. Elahi, S., J. Holmstrom, and V. Gerdts, *The benefits of using diverse animal models for studying pertussis*. Trends Microbiol, 2007. **15**(10): p. 462-8.
104. Weiss, A.A. and M.S. Goodwin, *Lethal infection by Bordetella pertussis mutants in the infant mouse model*. Infect Immun, 1989. **57**(12): p. 3757-64.
105. Caroff, M., et al., *Variations in the carbohydrate regions of Bordetella pertussis lipopolysaccharides: electrophoretic, serological, and structural features*. J Bacteriol, 1990. **172**(2): p. 1121-8.
106. Caroff, M., et al., *Structural variability and originality of the Bordetella endotoxins*. J Endotoxin Res, 2001. **7**(1): p. 63-8.
107. Wong, J.P., M. E. Christopher, S. Viswanathan, N. Karpoff, X. Dai, D. Das, L. Q. Sun, M. Wang, and A. M. Salazar, *Activation of toll-like receptor signaling pathway for protection against influenza virus infection*. Vaccine, 2009. **27**: p. 3481-3483.
108. Ryu, J.H., C.H. Kim, and J.H. Yoon, *Innate immune responses of the airway epithelium*. Mol Cells, 2010. **30**(3): p. 173-83.
109. Holt, P.G., et al., *Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(2): p. 142-52.

110. Kovach, M.A. and T.J. Standiford, *Toll like receptors in diseases of the lung*. Int Immunopharmacol, 2011. **11**(10): p. 1399-406.
111. Basith, S., et al., *Toll-like receptor modulators: a patent review (2006-2010)*. Expert Opin Ther Pat, 2011. **21**(6): p. 927-44.
112. Dunne, A., N.A. Marshall, and K.H. Mills, *TLR based therapeutics*. Curr Opin Pharmacol, 2011. **11**(4): p. 404-11.
113. Gambuzza, M., et al., *Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics for multiple sclerosis management*. J Neuroimmunol, 2011. **239**(1-2): p. 1-12.
114. Romagne, F., *Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors*. Drug Discov Today, 2007. **12**(1-2): p. 80-7.
115. Zhu, J. and C. Mohan, *Toll-like receptor signaling pathways--therapeutic opportunities*. Mediators Inflamm, 2010. **2010**: p. 781235.
116. Gordon, S., *Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response*. Cell, 2002. **111**(7): p. 927-30.
117. Hippenstiel, S., et al., *Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia--molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction*. Respir Res, 2006. **7**: p. 97.
118. Errea, A., et al., *Intranasal administration of TLR agonists induces a discriminated local innate response along murine respiratory tract*. Immunol Lett, 2015. **164**(1): p. 33-39.
119. Iwamura, C. and T. Nakayama, *Toll-like receptors in the respiratory system: their roles in inflammation*. Curr Allergy Asthma Rep, 2008. **8**(1): p. 7-13.
120. Perros, F., B.N. Lambrecht, and H. Hammad, *TLR4 signalling in pulmonary stromal cells is critical for inflammation and immunity in the airways*. Respir Res, 2011. **12**: p. 125.
121. Hoppstadter, J., et al., *Differential cell reaction upon Toll-like receptor 4 and 9 activation in human alveolar and lung interstitial macrophages*. Respir Res, 2010. **11**: p. 124.
122. Jenner, R.G. and R.A. Young, *Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(4): p. 281-94.
123. Moreno, G., et al., *Toll-like receptor 4 orchestrates neutrophil recruitment into airways during the first hours of Bordetella pertussis infection*. Microbes Infect, 2013. **15**(10-11): p. 708-18.
124. Banus, S., et al., *Lung response to Bordetella pertussis infection in mice identified by gene-expression profiling*. Immunogenetics, 2007. **59**(7): p. 555-64.
125. Ulich, T.R., et al., *Intratracheal administration of endotoxin and cytokines. VI. Antiserum to CINC inhibits acute inflammation*. Am J Physiol, 1995. **268**(2 Pt 1): p. L245-50.
126. Craig, A., et al., *Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia*. Infect Immun, 2009. **77**(2): p. 568-75.
127. Matsuzaki, G. and M. Umemura, *Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections*. Microbiol Immunol, 2007. **51**(12): p. 1139-47.
128. Tsai, W.C., et al., *CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine Pseudomonas aeruginosa pneumonia*. Infect Immun, 2000. **68**(7): p. 4289-96.
129. Tateda, K., et al., *Chemokine-dependent neutrophil recruitment in a murine model of Legionella pneumonia: potential role of neutrophils as immunoregulatory cells*. Infect Immun, 2001. **69**(4): p. 2017-24.
130. Ye, P., et al., *Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense*. J Exp Med, 2001. **194**(4): p. 519-27.
131. Andreasen, C. and N.H. Carbonetti, *Role of neutrophils in response to Bordetella pertussis infection in mice*. Infect Immun, 2009. **77**(3): p. 1182-8.

132. Andreassen, C. and N.H. Carbonetti, *Pertussis toxin inhibits early chemokine production to delay neutrophil recruitment in response to Bordetella pertussis respiratory tract infection in mice*. Infect Immun, 2008. **76**(11): p. 5139-48.
133. Toews, G.B., W.C. Vial, and E.J. Hansen, *Role of C5 and recruited neutrophils in early clearance of nontypable Haemophilus influenzae from murine lungs*. Infect Immun, 1985. **50**(1): p. 207-12.
134. Kirimanjeswara, G.S., et al., *Pertussis toxin inhibits neutrophil recruitment to delay antibody-mediated clearance of Bordetella pertussis*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3594-601.
135. El-Benna, J., et al., *Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005. **53**(3): p. 199-206.
136. Zumbihl, R., et al., *IL-1 stimulates a diverging signaling pathway in EL4 6.1 thymoma cells. IL-2 release, but not IL-2 receptor expression, is sensitive to pertussis toxin*. J Immunol, 1995. **155**(1): p. 181-9.
137. Fang, F.C., *Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(10): p. 820-32.
138. Nathan, C. and M.U. Shiloh, *Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 8841-8.
139. Cooper, A.M., et al., *Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2243-7.
140. Chan, J., et al., *Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1995. **63**(2): p. 736-40.
141. Chiang, C.H., et al., *N-acetylcysteine attenuates ventilator-induced lung injury in an isolated and perfused rat lung model*. Injury, 2012.
142. Lei, S., et al., *Effects of N-acetylcysteine on nicotinamide dinucleotide phosphate oxidase activation and antioxidant status in heart, lung, liver and kidney in streptozotocin-induced diabetic rats*. Yonsei Med J, 2012. **53**(2): p. 294-303.
143. Lin, Y.S., et al., *Activations of TRPA1 and P2X receptors are important in ROS-mediated stimulation of capsaicin-sensitive lung vagal afferents by cigarette smoke in rats*. J Appl Physiol (1985), 2010. **108**(5): p. 1293-303.
144. Zhou, M., et al., *A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases*. Anal Biochem, 1997. **253**(2): p. 162-8.
145. Mohanty, J.G., et al., *A highly sensitive fluorescent micro-assay of H2O2 release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative*. J Immunol Methods, 1997. **202**(2): p. 133-41.
146. Ding, A.H., C.F. Nathan, and D.J. Stuehr, *Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production*. J Immunol, 1988. **141**(7): p. 2407-12.
147. Drapier, J.C., J. Wietzerbin, and J.B. Hibbs, Jr., *Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages*. Eur J Immunol, 1988. **18**(10): p. 1587-92.
148. Lyons, C.R., G.J. Orloff, and J.M. Cunningham, *Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line*. J Biol Chem, 1992. **267**(9): p. 6370-4.
149. Miranda, K.M., M.G. Espey, and D.A. Wink, *A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite*. Nitric Oxide, 2001. **5**(1): p. 62-71.
150. Beda, N. and A. Nedospasov, *A spectrophotometric assay for nitrate in an excess of nitrite*. Nitric Oxide, 2005. **13**(2): p. 93-7.

151. Cluff, C.W., et al., *Synthetic toll-like receptor 4 agonists stimulate innate resistance to infectious challenge*. *Infect Immun*, 2005. **73**(5): p. 3044-52.
152. Deng, J.C., et al., *CpG oligodeoxynucleotides stimulate protective innate immunity against pulmonary Klebsiella infection*. *J Immunol*, 2004. **173**(8): p. 5148-55.
153. Lee, J.S., et al., *TLR-4 pathway mediates the inflammatory response but not bacterial elimination in E. coli pneumonia*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005. **289**(5): p. L731-8.
154. Vareille, M., et al., *The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses*. *Clin Microbiol Rev*, 2011. **24**(1): p. 210-29.
155. Wang, H. and J.S. Yadav, *DNA damage, redox changes, and associated stress-inducible signaling events underlying the apoptosis and cytotoxicity in murine alveolar macrophage cell line MH-S by methanol-extracted Stachybotrys chartarum toxins*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006. **214**(3): p. 297-308.
156. Tiwari, M., U.N. Dwivedi, and P. Kakkar, *Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by Cymbopogon citratus D. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages*. *Food Chem Toxicol*, 2010. **48**(10): p. 2913-9.
157. Gwinn, M.R. and V. Vallyathan, *Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages*. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2006. **9**(1): p. 27-39.
158. Underhill, D.M. and A. Ozinsky, *Phagocytosis of microbes: complexity in action*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 825-52.
159. Torre, D., et al., *Effects of recombinant human gamma interferon on intracellular survival of Bordetella pertussis in human phagocytic cells*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1994. **9**(3): p. 183-8.
160. Mahon, B.P. and K.H. Mills, *Interferon-gamma mediated immune effector mechanisms against Bordetella pertussis*. *Immunol Lett*, 1999. **68**(2-3): p. 213-7.
161. Canthaboo, C., et al., *Investigation of role of nitric oxide in protection from Bordetella pertussis respiratory challenge*. *Infect Immun*, 2002. **70**(2): p. 679-84.
162. Halonen, S.K., F. Chiu, and L.M. Weiss, *Effect of cytokines on growth of Toxoplasma gondii in murine astrocytes*. *Infect Immun*, 1998. **66**(10): p. 4989-93.
163. Alberati-Giani, D., et al., *Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression by nitric oxide and inflammatory mediators in IFN-gamma-activated murine macrophages and microglial cells*. *J Immunol*, 1997. **159**(1): p. 419-26.
164. Mayer, A.K., M. Muehmer, J. Mages, K. Gueinzus, C. Hess, K. Heeg, R. Bals, R. Lang, and A. H. Dalpke, *Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells*. *J Immunol* 2007. **178**: p. 3134-3142.
165. Pichavant, M., et al., *Impact of bronchial epithelium on dendritic cell migration and function: modulation by the bacterial motif KpOmpA*. *J Immunol*, 2006. **177**(9): p. 5912-9.
166. Contoli, M., et al., *Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations*. *Nat Med*, 2006. **12**(9): p. 1023-6.
167. Wark, P.A., et al., *Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus*. *J Exp Med*, 2005. **201**(6): p. 937-47.
168. Cox, G., J. Gauldie, and M. Jordana, *Bronchial epithelial cell-derived cytokines (G-CSF and GM-CSF) promote the survival of peripheral blood neutrophils in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1992. **7**(5): p. 507-13.
169. Bleck, B., et al., *Diesel exhaust particle-exposed human bronchial epithelial cells induce dendritic cell maturation*. *J Immunol*, 2006. **176**(12): p. 7431-7.
170. Bae, Y.S., M.K. Choi, and W.J. Lee, *Dual oxidase in mucosal immunity and host-microbe homeostasis*. *Trends Immunol*, 2010. **31**(7): p. 278-87.
171. Leto, T.L. and M. Geiszt, *Role of Nox family NADPH oxidases in host defense*. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**(9-10): p. 1549-61.

172. Rada, B., et al., *The Pseudomonas toxin pyocyanin inhibits the dual oxidase-based antimicrobial system as it imposes oxidative stress on airway epithelial cells*. J Immunol, 2008. **181**(7): p. 4883-93.
173. Moskwa, P., et al., *A novel host defense system of airways is defective in cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(2): p. 174-83.
174. Lamberti, Y., et al., *Cholesterol-dependent attachment of human respiratory cells by Bordetella pertussis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2009. **56**(2): p. 143-50.
175. Lamberti, Y., et al., *Bordetella pertussis entry into respiratory epithelial cells and intracellular survival*. Pathog Dis, 2013. **69**(3): p. 194-204.
176. Lamberti, Y., et al., *Cholesterol-rich domains are involved in Bordetella pertussis phagocytosis and intracellular survival in neutrophils*. Microb Pathog, 2008. **44**(6): p. 501-11.
177. Grassme, H., et al., *Host defense against Pseudomonas aeruginosa requires ceramide-rich membrane rafts*. Nat Med, 2003. **9**(3): p. 322-30.
178. Grassme, H., H. Schwarz, and E. Gulbins, *Molecular mechanisms of ceramide-mediated CD95 clustering*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **284**(4): p. 1016-30.
179. Baorto, D.M., et al., *Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic*. Nature, 1997. **389**(6651): p. 636-9.
180. Duncan, M.J., et al., *Bacterial penetration of bladder epithelium through lipid rafts*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18944-51.
181. Konkel, M.E., et al., *Characteristics of the internalization and intracellular survival of Campylobacter jejuni in human epithelial cell cultures*. Microb Pathog, 1992. **13**(5): p. 357-70.
182. Gatfield, J. and J. Pieters, *Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages*. Science, 2000. **288**(5471): p. 1647-50.
183. Watarai, M., *Interaction between Brucella abortus and cellular prion protein in lipid raft microdomains*. Microbes Infect, 2004. **6**(1): p. 93-100.
184. Watarai, M., et al., *Modulation of Brucella-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication*. Cell Microbiol, 2002. **4**(6): p. 341-55.
185. Rodriguez, M.E., et al., *Bordetella pertussis attachment to respiratory epithelial cells can be impaired by fimbriae-specific antibodies*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006. **46**(1): p. 39-47.
186. Konczol, M., et al., *Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: role of ROS, JNK, and NF-kappaB*. Chem Res Toxicol, 2011. **24**(9): p. 1460-75.
187. Li, W., et al., *P. aeruginosa lipopolysaccharide-induced MUC5AC and CLCA3 expression is partly through Duox1 in vitro and in vivo*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63945.
188. Song, L., et al., *Hydroxysafflor yellow a inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory signal transduction in human alveolar epithelial A549 cells*. Fitoterapia, 2013. **84**: p. 107-14.
189. Kumar, A., et al., *The bacterial fermentation product butyrate influences epithelial signaling via reactive oxygen species-mediated changes in cullin-1 neddylation*. J Immunol, 2009. **182**(1): p. 538-46.
190. Kumar, A., et al., *Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species*. EMBO J, 2007. **26**(21): p. 4457-66.
191. Smaldini, P.L., et al., *Down-regulation of NF-kappaB signaling by Gordonia bronchialis prevents the activation of gut epithelial cells*. Innate Immun, 2013. **20**(6): p. 626-638.
192. Lamberti, Y.A., et al., *Intracellular trafficking of Bordetella pertussis in human macrophages*. Infect Immun. **78**(3): p. 907-13.
193. Higgs, R., et al., *Immunity to the respiratory pathogen Bordetella pertussis*. Mucosal Immunol, 2012.

194. Bassinet, L., et al., *Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by Bordetella pertussis*. Infect Immun, 2000. **68**(4): p. 1934-41.
195. Gueirard, P., et al., *Ultrastructural analysis of the interactions between Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica and human tracheal epithelial cells*. Microb Pathog, 2005. **38**(1): p. 41-6.
196. Daniels, A.U., et al., *Macrophage cytokine response to particles and lipopolysaccharide in vitro*. J Biomed Mater Res, 2000. **49**(4): p. 469-78.
197. Zhang, P., et al., *Innate immunity and pulmonary host defense*. Immunol Rev, 2000. **173**: p. 39-51.
198. Wilmott, R.W., G. Khurana-Hershey, and J.M. Stark, *Current concepts on pulmonary host defense mechanisms in children*. Curr Opin Pediatr, 2000. **12**(3): p. 187-93.
199. Hawdon, N.A., et al., *Cellular responses of A549 alveolar epithelial cells to serially collected Pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis patients at different stages of pulmonary infection*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010. **59**(2): p. 207-20.
200. van der Vliet, A., *NADPH oxidases in lung biology and pathology: host defense enzymes, and more*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(6): p. 938-55.
201. Harper, R.W., et al., *Differential regulation of dual NADPH oxidases/peroxidases, Duox1 and Duox2, by Th1 and Th2 cytokines in respiratory tract epithelium*. FEBS Lett, 2005. **579**(21): p. 4911-7.
202. Agnese, D.M., et al., *Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections*. J Infect Dis, 2002. **186**(10): p. 1522-5.
203. Arbour, N.C., et al., *TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans*. Nat Genet, 2000. **25**(2): p. 187-91.
204. Harju, K., V. Glumoff, and M. Hallman, *Ontogeny of Toll-like receptors Tlr2 and Tlr4 in mice*. Pediatr Res, 2001. **49**(1): p. 81-3.
205. Geurtsen, J., et al., *Lipopolysaccharide analogs improve efficacy of acellular pertussis vaccine and reduce type I hypersensitivity in mice*. Clin Vaccine Immunol, 2007. **14**(7): p. 821-9.
206. Gaillard, M.E., et al., *Acellular pertussis vaccine based on outer membrane vesicles capable of conferring both long-lasting immunity and protection against different strain genotypes*. Vaccine, 2014. **32**(8): p. 931-7.
207. Asensio, C.J., et al., *Outer membrane vesicles obtained from Bordetella pertussis Tohama expressing the lipid A deacylase PagL as a novel acellular vaccine candidate*. Vaccine, 2011. **29**(8): p. 1649-56.
208. Roberts, R., et al., *Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis*. Vaccine, 2008. **26**(36): p. 4639-46.
209. Phalipon, A., et al., *Characterization of functional oligosaccharide mimics of the Shigella flexneri serotype 2a O-antigen: implications for the development of a chemically defined glycoconjugate vaccine*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1686-94.
210. Li, J., et al., *Attenuation and protective efficacy of an O-antigen-deficient mutant of Francisella tularensis LVS*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 9): p. 3141-53.
211. Preston, A., et al., *Complete structures of Bordetella bronchiseptica and Bordetella parapertussis lipopolysaccharides*. J Biol Chem, 2006. **281**(26): p. 18135-44.
212. Preston, A., et al., *Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in bordetellae*. Infect Immun, 1999. **67**(8): p. 3763-7.
213. Zhang, X., M.E. Rodriguez, and E.T. Harvill, *O antigen allows B. parapertussis to evade B. pertussis vaccine-induced immunity by blocking binding and functions of cross-reactive antibodies*. PLoS ONE, 2009. **4**(9): p. e6989.
214. Fedele, G., et al., *Lipopolysaccharides from Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis differently modulate human dendritic cell functions resulting in divergent prevalence of Th17-polarized responses*. J Immunol, 2008. **181**(1): p. 208-16.



215. Zhang, X., et al., *The O antigen is a critical antigen for the development of a protective immune response to Bordetella parapertussis*. Infect Immun, 2009. **77**(11): p. 5050-8.
216. Bottero, D., et al., *Outer membrane vesicles derived from Bordetella parapertussis as an acellular vaccine against Bordetella parapertussis and Bordetella pertussis infection*. Vaccine, 2013. **31**(45): p. 5262-8.
217. Cleaver, J.O., et al., *Lung epithelial cells are essential effectors of inducible resistance to pneumonia*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(1): p. 78-88.
218. Tuvim, M.J., et al., *Synergistic TLR2/6 and TLR9 activation protects mice against lethal influenza pneumonia*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30596.
219. Needham, B.D., et al., *Modulating the innate immune response by combinatorial engineering of endotoxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(4): p. 1464-9.
220. Dunne, A., et al., *Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against Bordetella pertussis*. J Immunol, 2010. **185**(3): p. 1711-9.
221. Zhang, X., et al., *Decreased leukocyte accumulation and delayed Bordetella pertussis clearance in IL-6-/- mice*. J Immunol, 2011. **186**(8): p. 4895-904.
222. Zhang, X., et al., *Interleukin-1 receptor signaling is required to overcome the effects of pertussis toxin and for efficient infection- or vaccination-induced immunity against Bordetella pertussis*. Infect Immun, 2011. **79**(1): p. 527-41.
223. Bartlett, J.A., A.J. Fischer, and P.B. McCray, Jr., *Innate immune functions of the airway epithelium*. Contrib Microbiol, 2008. **15**: p. 147-63.
224. Tuinman, P.R., et al., *High-dose acetylsalicylic acid is superior to low-dose as well as to clopidogrel in preventing lipopolysaccharide-induced lung injury in mice*. Shock, 2013. **40**(4): p. 334-8.
225. van Zoelen, M.A., et al., *Endogenous MCP-1 promotes lung inflammation induced by LPS and LTA*. Mol Immunol, 2011. **48**(12-13): p. 1468-76.
226. Kietzmann, D., et al., *Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS*. Intensive Care Med, 1993. **19**(2): p. 78-81.
227. Jobsis, Q., et al., *Hydrogen peroxide and nitric oxide in exhaled air of children with cystic fibrosis during antibiotic treatment*. Eur Respir J, 2000. **16**(1): p. 95-100.
228. Lu, Y. and L.M. Wahl, *Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 through enhancement of NF-kappa B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes*. J Immunol, 2005. **175**(8): p. 5423-9.
229. Hsu, H.Y. and M.H. Wen, *Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression*. J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22131-9.
230. Liu, X., K. Shao, and T. Sun, *SIRT1 regulates the human alveolar epithelial A549 cell apoptosis induced by Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide*. Cell Physiol Biochem, 2013. **31**(1): p. 92-101.
231. westphal, O., *Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further application of the procedure*. Methods Carbohydr Chem., 1965. **5**: p. 83-91.
232. Hozbor, D., et al., *Release of lipopolysaccharide during Bordetella pertussis growth*. Res Microbiol, 1993. **144**(3): p. 201-9.
233. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
234. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
235. Romanin, D., *Modulación de la Respuesta Inmune Innata Epitelial por Microorganismos Potencialmente Probióticos Aislados de Kefir*. Trabajo de Tesis doctoral de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, 2013.





**MARÍA EUGENIA ZURITA. TRABAJO DE TESIS DOCTORAL 2015.**

**ESTUDIO DE LA ESTIMULACIÓN DE LA RESPUESTA  
INNATA EN MUCOSAS INDUCIDA POR AGONISTAS  
EN LA PROTECCIÓN CONTRA ***PERTUSSIS***,  
UNA ENFERMEDAD CONSIDERADA RESURGENTE.**

DIRECTOR DRA. DANIELA HOZBOR / CODIRECTOR DR. MARTÍN RUMBO  
Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Cs. Exactas.  
Departamento de Ciencias Biológicas.