



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral**

**Mecanismos moleculares involucrados en la formación  
de biofilm por aislados clínicos de *Bordetella pertussis*.  
Rol de la proteína de membrana externa OmpQ.**

---

**Tesista**

**Lic. Natalia Cattelan**

**Director**

**Dr. Osvaldo Yantorno**

**Año 2016**



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





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

**Cattelan, N;** Villalba, MI; Parisi, G; Arnal, L; Serra, DO; Aguilar, M; Yantorno, O (2016). "The outer membrane protein OmpQ of *Bordetella bronchiseptica* is required for mature biofilm formation". Microbiology, En prensa. DOI: 10.1099/mic.0.000224.

**Cattelan, N;** Dubey, P; Arnal, L; Yantorno, O; Deora, R (2015). "*Bordetella* Biofilms: a lifestyle leading to persistent infections". Pathogens and Disease. 2015 74 (1):ftv108, DOI: 10.1093/femspd/ftv108

Arnal, L\*; Grunert T\*; **Cattelan, N;** De Gouw D; Villalba, MI; Serra, DO; Mooi, FR; EhlingSchulz, M; Yantorno, OM (2015). "*Bordetella pertussis* isolates from Argentinean whooping cough patients display enhanced biofilm formation capacity compared to Tohama I reference strain". Frontiers in Microbiology, 6:1352. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01352. \*Autores contribuyeron igualmente.



## **MI RECONOCIMIENTO**

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por concederme las becas que posibilitaron el desarrollo de esta Tesis doctoral.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT), por el financiamiento otorgado que permitió el desarrollo de esta investigación científica.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCYT), por el financiamiento otorgado para la realización de una estadía de cooperación.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI - Fac. Cs Exactas, UNLP - CONICET) y a su director, Dr. Edgardo Donati, por permitirme utilizar sus instalaciones y equipamiento para la realización de esta Tesis.

Al Departamento de Microbiología Funcional de la Universidad Veterinaria de Viena, Austria, y al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Escuela de Ciencias Médicas de la Universidad Wake Forest, Estados Unidos, por permitirme llevar a cabo pasantías de investigación en sus instituciones.



## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo de Tesis no hubiera sido posible sin la participación de personas que me han brindado su ayuda y apoyo. Por eso, quisiera expresar en este espacio mi agradecimiento a todos ellos.

Al Dr. Osvaldo Yantorno, por acompañarme durante esta etapa bajo su dirección. Por compartir sus conocimientos y consejos. Sobre todo, por haberme brindado su confianza y apoyo en cada una de mis experiencias a lo largo de estos 5 años.

Al Dr. Diego Serra, quien acompañó mis primeros pasos en investigación. Por enseñarme a trabajar con criterio y dedicación; por darme una mano siempre que lo necesité, aún desde lejos.

A la Dra. Alejandra Bosch por aportar su experiencia en espectroscopía. Por su calidez y su apoyo en mi trabajo.

Al Dr. Mario Aguilar, por transmitir sus conocimientos en biología molecular y poner a mi disposición su equipamiento.

Al Dr. Gustavo Parisi, por su colaboración en los estudios bioinformáticos realizados en este trabajo.

A la Dra. Monika Ehling-Schulz por permitirme realizar una estadía de investigación en su laboratorio, en mi primera experiencia fuera del país.

Al Dr. Raj Deora, por darme la posibilidad de finalizar la parte experimental de mi trabajo en su laboratorio. Por el constante interés y sugerencias, y por tratarme como si fuera uno más de sus becarios.

A los compañeros y amigos del Lab 2, por compartir los logros y aliviar las dificultades. Por ayudarme cada vez que lo necesité. Por los buenos mates, las risas y las complicidades. Gracias Lau, Jime, Juano, Huguito, Yani, Hila, Ine, Clau, Ceci, Maru, Juan Marcos y Pablo, ¡no podría haber tenido mejores compañeros durante estos 5 años!

A Julito, muy especialmente, por su invaluable ayuda en el laboratorio y su infinita paciencia.

A Jime, por la gran ayuda en inducciones, inmunizaciones, ELISAs y Westerns.

A Iva, por escucharme en mis malos y buenos momentos, por tener siempre la palabra justa. Y también por prestarme las cubetas de cuarzo.

A Priscila, por dejarme colarme en su laboratorio a usar la qPCR.

A Jamie, por la paciencia al enseñarme a trabajar con ratones y por alivianarme con su ayuda el plaqueo de cientos de placas.

A quienes hicieron que estar lejos en mis etapas de intercambio fueran experiencias inolvidables. A Tom y a Karen, por hacerme sentir bienvenida y abrirme las puertas de sus hogares. A mis "Winston-Salem friends", Trine, Aurora, Chro y Oli, por brindarme su amistad y por los momentos compartidos.

A quienes permitieron mi desarrollo como docente, muy especialmente a Flavia Luna, por ayudar a superarme y mejorar en esta tarea. Sobre todo en esta última etapa, por alegrarse conmigo de cada uno de mis logros, y por ser "mi ángel de la guarda" en el CINDEFI.

A la Dra. María Eugenia Rodríguez, por los consejos y las palabras de apoyo que siempre tuvo conmigo.

A toda la gente del CINDEFI, quienes hicieron que trabajar junto a ellos fuera una experiencia maravillosa.

Agradezco profundamente a mi mamá, a mi papá, a Vi y a Juan, por escucharme, aconsejarme, alegrarse de mis logros y apoyarme en las dificultades. Gracias por acompañarme de manera incondicional en cada etapa de mi vida.

## LISTA DE ABREVIATURAS

A540	Absorbancia a 540 nm
A590	Absorbancia a 590 nm
ABG	Agar Bordet-Gengou
ACT	Toxina adenilato ciclasa
ADNe	ADN extracelular
Bps	Exopolisacárido de <i>Bordetella</i>
Bvg <sup>-</sup>	Fase de avirulencia
Bvg <sup>+</sup>	Fase de virulencia
Bvg <sup>i</sup>	Fase intermedia
BvgAS	Sistema de dos componentes (BvgA, BvgS) de <i>Bordetella</i>
CBM-B	Concentración Bactericida Mínima en <i>Biofilm</i>
Cef	Cefalexina
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
Cm	Cloramfenicol
CSLM	Microscopía de Escaneo Láser Confocal
CV	Cristal Violeta
DNT	Toxina dermonecrótica
DO <sub>650</sub>	Densidad óptica a 650 nm
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
FHA	Hemaglutinina filamentosa
Fim	Fimbria
FT-IR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
GFP	Proteína verde fluorescente
GMP-di-c	3'5' guanosín-monofosfato cíclico
HCA	Análisis Jerárquico de Clústers
Heptakis	(2,6-bi-O-metil) $\beta$ -ciclodextrina

IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
IR	Infrarrojo
Km	Kanamicina
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LPS	Lipopolisacárido
OmpQr	OmpQ recombinante
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIA	<i>Polysaccharide intracellular adhesin</i>
PNAG	Poli-N-acetil glucosamina
Prn	Pertactina
PTx	Toxina pertussis
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
Sm	Estreptomina
SN	Suero normal pre-inmune
SS	Medio de cultivo Stainer-Scholte
TCT	Citotoxina traqueal
UFC	Unidades formadoras de colonias
vags	genes activados en virulencia
vrg	genes reprimidos en virulencia



# ÍNDICE

<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>1</b>
<b>1.1. <i>BORDETELLA PERTUSSIS</i></b>	<b>3</b>
1.1.1. EL GÉNERO <i>BORDETELLA</i>	3
1.1.2. TOS CONVULSA O PERTUSSIS	3
1.1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD	4
1.1.4. TRATAMIENTO	5
1.1.5. EPIDEMIOLOGÍA	6
1.1.6. FACTORES DE VIRULENCIA	9
1.1.7. CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA	13
1.1.8. PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN POR <i>B. PERTUSSIS</i>	17
<b>1.2. <i>BIOFILMS</i></b>	<b>18</b>
1.2.1. EL CONCEPTO DE <i>BIOFILM</i>	18
1.2.2. IMPACTO DE LOS <i>BIOFILMS</i> EN EL ÁREA DE SALUD	20
1.2.3. ETAPAS DEL DESARROLLO EN <i>BIOFILM</i>	20
1.2.4. EVIDENCIAS DE PRODUCCIÓN DE <i>BIOFILM</i> POR <i>B. PERTUSSIS</i> EN EL TRACTO RESPIRATORIO HUMANO	23
1.2.5. PROCESO DE FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i> POR <i>BORDETELLA SPP</i>	25
<b>1.3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO</b>	<b>29</b>
<b>1.4. REFERENCIAS</b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>43</b>
<b>2.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>45</b>
<b>2.2. OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
<b>2.3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>51</b>
2.3.1. CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO	51
2.3.2. ENSAYO DE FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i> EN PLACAS MULTIPOCILLO	51
2.3.3. CUANTIFICACIÓN DE LA FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i> POR TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA	52
2.3.4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS POR FT-IR	53
2.3.5. MEDIDAS POR FT-IR Y ANÁLISIS DE ESPECTROS	53
2.3.6. CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO PLANCTÓNICO	54
2.3.7. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE GLUTAMATO, BIOMASA TOTAL PRODUCIDA Y RENDIMIENTO DE BIOMASA CON RESPECTO AL SUSTRATO	54
<b>2.4. RESULTADOS</b>	<b>57</b>
2.4.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE <i>B. PERTUSSIS</i> MEDIANTE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	57
2.4.2. CARACTERIZACIÓN RÁPIDA DE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i> DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE <i>B. PERTUSSIS</i>	58
2.4.3. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LOS <i>BIOFILMS</i> FORMADOS POR CEPAS CLÍNICAS DE <i>B. PERTUSSIS</i>	59
2.4.4. CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO EN CULTIVO PLANCTÓNICO DE CEPAS CLÍNICAS DE <i>B. PERTUSSIS</i>	64
<b>2.5. DISCUSIÓN</b>	<b>69</b>
<b>2.6. CONCLUSIONES</b>	<b>73</b>

<b>2.7. REFERENCIAS</b>	<b>75</b>
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>77</b>
<hr/>	
<b>3.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>79</b>
<b>3.2. OBJETIVOS</b>	<b>83</b>
<b>3.3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>85</b>
3.3.1. CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO	85
3.3.2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i> SOBRE TUBOS DE VIDRIO Y SOBRE PLACAS MULTIPOCILLO	86
3.3.3. ENSAYO DE AUTOAGREGACIÓN	86
3.3.4. ENSAYO DE HEMAGLUTINACIÓN	86
3.3.5. DETECCIÓN DE FHA POR TÉCNICA DE ELISA	87
3.3.6. TRANSFORMACIÓN DE CEPAS DE <i>B. PERTUSSIS</i> CON PLÁSMIDOS CON PROTEÍNAS GFP	87
3.3.7. EVALUACIÓN DE LA ADHESIÓN A CUBREOBJETOS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	88
3.3.8. FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i> SOBRE CUBREOBJETOS	88
3.3.9. PRUEBA DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN PLACA Y EN <i>BIOFILM</i>	89
3.3.10. DISRUPCIÓN ENZIMÁTICA DE <i>BIOFILMS</i> PREFORMADOS	90
3.3.11. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE ARN	90
3.3.12. PREPARACIÓN DE ADNC Y PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL	90
3.3.13. ADHESIÓN A CÉLULAS EPITELIALES A549	91
3.3.14. ENSAYOS CON ANIMALES	92
3.3.15. BIOÉTICA	92
<b>3.4. RESULTADOS</b>	<b>95</b>
3.4.1. CUANTIFICACIÓN POR CRISTAL VIOLETA DE <i>BIOFILMS</i> FORMADOS POR CEPAS CLÍNICAS PROVENIENTES DE ARGENTINA Y DE ESTADOS UNIDOS	95
3.4.2. ENSAYOS DE AUTOAGREGACIÓN	98
3.4.4. ENSAYO DE HEMAGLUTINACIÓN	99
3.4.3. CUANTIFICACIÓN DE FHA POR ELISA	100
3.4.5. ANÁLISIS DE LA ADHESIÓN TEMPRANA A CUBREOJETOS	101
3.4.6. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS <i>BIOFILMS</i> POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE ESCANEAMIENTO LÁSER	103
3.4.7. TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE LOS <i>BIOFILMS</i>	107
3.4.9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE <i>FIM</i> Y <i>BPSA</i> EN CULTIVOS PLANCTÓNICO Y EN <i>BIOFILM</i>	110
3.4.8. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	111
3.4.10. ADHESIÓN A CÉLULAS EPITELIALES	112
3.4.11. ENSAYOS EN RATONES	113
<b>3.5. DISCUSIÓN</b>	<b>115</b>
<b>3.6. CONCLUSIONES</b>	<b>121</b>
<b>3.7. REFERENCIAS</b>	<b>123</b>
<b>CAPÍTULO 4:</b>	<b>127</b>
<hr/>	
<b>4.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>129</b>
<b>4.2. OBJETIVOS</b>	<b>133</b>
<b>4.3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>135</b>

4.3.1. MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	135
4.3.2. MUTAGÉNESIS VÍA INTERRUPCIÓN GÉNICA POR INTEGRACIÓN DE VECTOR SUICIDA	136
4.3.2.1. Generación de las construcciones pRE112-3842int y pRE112-3993int	136
4.3.2.2. Transformación de <i>B. bronchiseptica</i> RB50 con las construcciones pRE112-3842int y pRE112-3993int y selección de recombinantes	137
4.3.3. MUTAGÉNESIS POR INTERCAMBIO ALÉLICO	138
4.3.3.1. Generación de la construcción pRE112- AB3993	138
4.3.3.2. Transformación de <i>B. bronchiseptica</i> RB50 con la construcción pRE112-AB3993 y selección de simples recombinantes	140
4.3.3.3. Segundo evento de recombinación y selección del mutante $\Delta ompQ$	140
4.3.4. COMPLEMENTACIÓN GENÉTICA DEL GEN <i>OMPQ</i>	141
4.3.5. TRANSFORMACIÓN DE CEPAS DE <i>B. BRONCHISEPTICA</i> PARA LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE FLUORESCENCIA VERDE (GFP)	142
4.3.6. CULTIVO PLANCTÓNICO DE <i>B. BRONCHISEPTICA</i> RB50 Y DEL MUTANTE $\Delta ompQ$	142
4.3.7. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)	142
4.3.8. CULTIVOS EN <i>BIOFILM</i> DE <i>B. BRONCHISEPTICA</i> RB50 Y DEL MUTANTE $\Delta ompQ$	143
4.3.8.1. Placas multipocillo	143
4.3.8.3. Evaluación de la adhesión a superficies abióticas por microscopía de fluorescencia	143
4.3.8.4. Análisis estructural de <i>biofilms</i> por microscopía de escaneo láser confocal (CLSM)	144
4.3.9. CUANTIFICACIÓN DEL NIVEL RELATIVO DE EXPRESIÓN DEL GEN <i>OMPQ</i>	144
4.3.10. CLONADO DEL GEN <i>OMPQ</i> PARA LA PRODUCCIÓN DE OMPQ RECOMBINANTE	145
4.3.11. EXPRESIÓN DE OMPQ RECOMBINANTE Y PURIFICACIÓN	146
4.3.12. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS	146
4.3.13. ENSAYO DE WESTERN BLOT	147
4.3.14. INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i>	147
4.3.15. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y MODELADO PROTEICO	147
<b>4.4. RESULTADOS</b>	<b>149</b>
4.4.1. OBTENCIÓN DE CEPAS MUTANTES POR INTERRUPCIÓN GÉNICA	149
4.4.2. GENERACIÓN DE LA CEPA MUTANTE <i>B. BRONCHISEPTICA</i> $\Delta ompQ$	150
4.4.3. CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>B. BRONCHISEPTICA</i> $\Delta ompQ$ EN CONDICIONES DE CULTIVO PLANCTÓNICO	154
4.4.4. CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE <i>B. BRONCHISEPTICA</i> EN EL MEDIO SÓLIDO ABG	156
4.4.5. CRECIMIENTO EN <i>BIOFILM</i> DE LAS CEPAS DE <i>B. BRONCHISEPTICA</i>	156
4.4.5.1. Formación de <i>biofilm</i> sobre placas multipocillo	156
4.4.5.2. Efecto de la ausencia de expresión de OmpQ en la adhesión a cubreobjetos de borosilicato	157
4.4.5.3. Análisis estructural de <i>biofilms</i> producidos en sistemas de cultivo estático y de flujo continuo	158
4.4.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE <i>OMPQ</i> A LO LARGO DEL CULTIVO EN <i>BIOFILM</i>	161
4.4.7. EXPRESIÓN DE OMPQ RECOMBINANTE (OMPQR) Y OBTENCIÓN DE SUERO ANTI-OMPQR	162
4.4.8. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i>	164
4.4.9. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA ESTRUCTURA PROTEICA DE OMPQ Y OMP	165
<b>4.5. DISCUSIÓN</b>	<b>169</b>
<b>4.6. CONCLUSIONES</b>	<b>173</b>
<b>4.7. REFERENCIAS</b>	<b>175</b>
<b>CAPÍTULO 5</b>	<b>179</b>

<b>5.1. DISCUSIÓN GENERAL</b>	
<b>5.2. REFERENCIAS</b>	

<b>181</b>
<b>190</b>

# **Capítulo 1**

## **Introducción general**



## 1.1. *Bordetella pertussis*

### 1.1.1. El género *Bordetella*

El género *Bordetella* comprende un grupo de bacterias Gram-negativas pertenecientes a la familia *Alcaligenaceae* de las  $\beta$ -proteobacterias. Cuatro especies del género han sido asociadas principalmente con enfermedades respiratorias en humanos, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica* y *Bordetella holmesii*. Las tres primeras especies se encuentran estrechamente relacionadas, y son conocidas como las especies “clásicas” de *Bordetella* [6, 7]. *B. bronchiseptica* infecta una gran variedad de mamíferos (como cerdos, perros, conejos y cobayos), causando enfermedades respiratorias leves y crónicas [7]. Ocasionalmente, *B. bronchiseptica* puede causar infecciones en humanos, en especial en personas inmunocomprometidas [10]. *B. pertussis* es un patógeno estrictamente humano que causa la tos convulsa o pertussis [7]. Por su parte, dos linajes de *B. parapertussis* han sido identificados, uno de ellos con especificidad hacia el huésped humano y el otro, ovino, *B. parapertussis*Hu y *B. parapertussis*Ov, respectivamente [6]. Estudios filogenéticos han demostrado que tanto *B. pertussis* como *B. parapertussis*Hu evolucionaron de *B. bronchiseptica*, posiblemente en dos eventos independientes [11, 12].

### 1.1.2. Tos Convulsa o pertussis

Por su importante repercusión sobre la salud humana, la tos convulsa, producida por *B. pertussis*, es la enfermedad de mayor notoriedad e importancia entre las afecciones causadas por las bacterias del género *Bordetella*. Pertussis se caracteriza por una inflamación traqueobronquial y accesos típicos de tos violenta, espasmódica y con sensación de asfixia, que terminan con un ruido estridente (tos convulsiva o convulsa) durante la inspiración [13]. La enfermedad dura de 4 a 6 semanas, y si bien la misma puede presentarse a cualquier edad, es más severa en niños y lactantes de menos de un año que no han sido inmunizados. En estos casos los cuidados y controles deben ser minuciosos ya que el desenlace puede ser fatal [7].

De Bayou fue quien describió por primera vez la enfermedad, llamándola *Tussis quinta*, al referirse a una epidemia en París en el año 1578. Posteriormente, en el año 1679, Sydenham llamó a la enfermedad pertussis, que significa tos violenta. Fue recién a principios de 1900 que Bordet, trabajando junto a Gengou, logró asociar la

enfermedad con una bacteria específica, desarrollando un medio de cultivo que permitiera su aislamiento y crecimiento (hoy llamado medio Bordet-Gengou) [14].

A partir del aislamiento de la bacteria, rápidamente se iniciaron los estudios para desarrollar las primeras vacunas. La introducción de las vacunas celulares en los años 40 resultó en una marcada disminución de la morbilidad y la mortalidad causada por la enfermedad. Sin embargo, a pesar de su efectividad, las vacunas formuladas con células enteras fueron asociadas con efectos secundarios, como encefalopatías, lo que llevó a una resistencia social al uso de las mismas, aún cuando no se encontraban evidencias suficientes que conectasen estas manifestaciones con la vacunación [15]. Como consecuencia, la comunidad científica apuntó al desarrollo de vacunas acelulares contra pertussis, siendo Japón el pionero en dicho desarrollo. Las nuevas formulaciones de estas vacunas contienen factores de virulencia seleccionados, purificados y detoxificados. Si bien los componentes fueron cambiando en cuanto al número y tipo de antígeno seleccionado, actualmente todas las vacunas acelulares contra pertussis contienen al menos Toxina pertussis (PTx) detoxificada. Otras formulaciones incluyen PTx detoxificada con Hemaglutinina filamentosa (FHA); FHA y Pertactina (Prn); o FHA, Prn y dos tipos de Fimbria: Fim2 y Fim3, en proporciones variables. En los países desarrollados, estas vacunas han reemplazado desde el año 1950 a las vacunas celulares [15]. Aunque se suponía que este tipo de vacunas serían más seguras y menos reactogénicas que las vacunas celulares, actualmente se reconoce que las vacunas acelulares son también menos efectivas, lo que ha repercutido marcadamente en la epidemiología de la enfermedad [16].

### **1.1.3. Manifestaciones clínicas de la enfermedad**

Varios factores pueden afectar las manifestaciones clínicas de una infección por *B. pertussis*, entre ellos, la edad del paciente, inmunizaciones o infecciones previas, presencia de anticuerpos, y tratamiento antibiótico [7]. De este modo la enfermedad puede aparecer con una presentación clásica o bien con una sintomatología más leve.

#### *Presentación clásica*

La enfermedad generalmente cursa a través de tres etapas. La Fase Inicial, conocida como período catarral, tiene una duración aproximada de entre una y dos semanas. Durante este período, el diagnóstico puede ser difícil debido a que los



primeros síntomas son similares a los desarrollados por otras infecciones del tracto respiratorio superior. Estos síntomas incluyen rinorrea, estornudos y tos leve. En general no se observa un aumento de la temperatura corporal. La tos se vuelve más frecuente de modo gradual. Durante esta etapa la enfermedad es altamente contagiosa [17, 18].

Luego de la Fase Inicial, aparece la Etapa Paroxística, que se caracteriza por tos severa, y con una duración de entre una y seis semanas (aunque puede extenderse hasta diez semanas). La tos se produce en eventos paroxísticos durante una única exhalación, y es seguida por un sonido agudo producido cuando el paciente intenta respirar luego de un ataque severo de tos repetitiva. Estos eventos paroxísticos son un síntoma común en la mayoría de los niños, aunque puede estar ausente en infantes mayores a 6 meses, adolescentes y adultos, quienes pueden presentar únicamente tos severa. El paroxismo puede durar varias semanas y se presenta asociado a otros síntomas, como vómitos post-tusivos, cianosis, alteraciones de la función neurológica, apnea, etc [17, 18].

Una vez que desaparece la severidad del paroxismo, comienza la Fase de Convalecencia. Este período dura aproximadamente dos o tres semanas. Es posible que aparezcan otras enfermedades respiratorias durante este período. Dentro de las complicaciones comunes de la manifestación clásica de pertussis se encuentran: neumonía, otitis media, convulsiones y encefalopatía [17, 18].

### *Presentaciones atípicas*

En adultos o adolescentes con inmunidad adquirida de inmunizaciones o infecciones previas, los síntomas de la enfermedad varían ampliamente. En general, la infección cursa de forma asintomática. En las personas con sintomatología, se presenta de forma menos severa y con una duración menor. Pertussis sin su presentación clásica de paroxismo es la causa de hasta un tercio de tos persistente en adolescentes y adultos [17, 19, 20].

#### **1.1.4. Tratamiento**

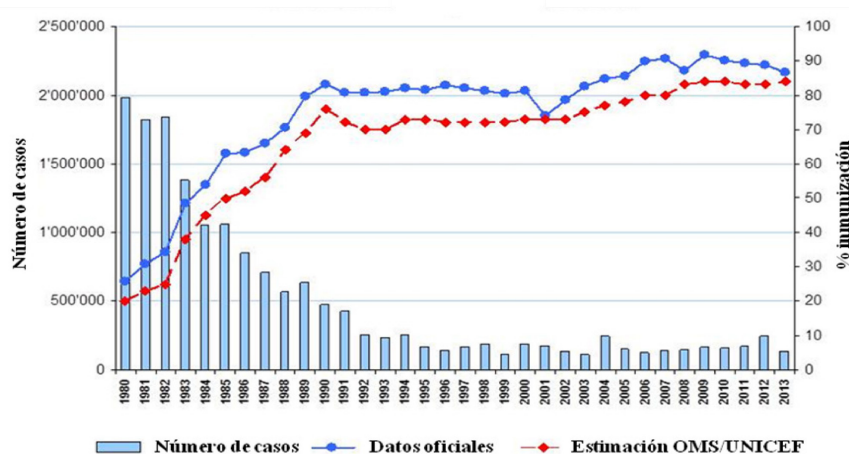
El principal tratamiento utilizado consiste en la administración oral de antibióticos, tradicionalmente eritromicina. Aunque la eficacia del tratamiento antibiótico ha sido cuestionada ya que no reduce la mortalidad o altera significativamente el curso de la enfermedad, los antibióticos permiten la “erradicación” de la bacteria de la nasofaringe, y por lo tanto, la reducción de la transmisión de la

enfermedad hacia otras personas. A su vez, el momento en el que se inicia el tratamiento antibiótico puede determinar la eficacia del mismo. La administración de antibióticos luego del inicio de la etapa paroxística generalmente no beneficia la duración o la severidad de la enfermedad. En la actualidad, el tratamiento consiste en la administración de los macrólidos azitromicina y claritromicina [21, 22].

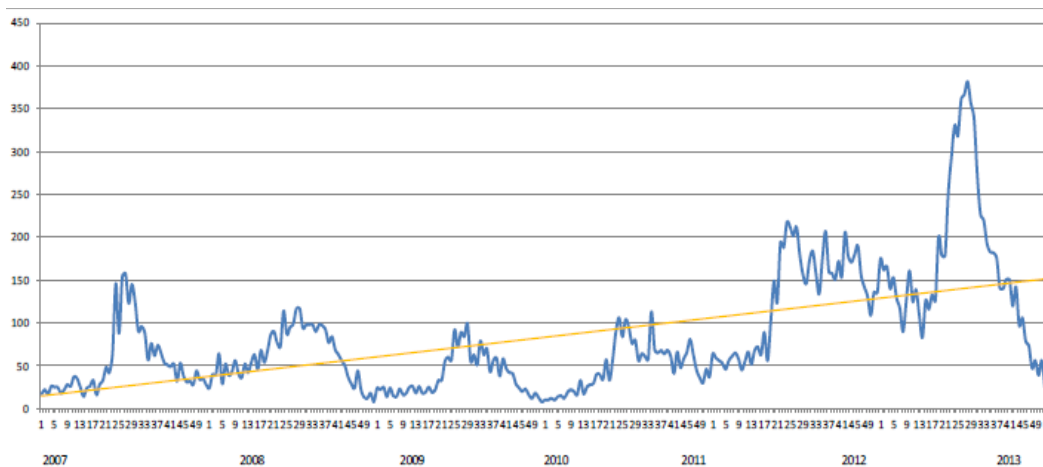
### 1.1.5. Epidemiología

Entre las enfermedades inmunoprevenibles por vacunación de la infancia, la tos convulsa es la más antigua que aún causa brotes epidémicos de importancia a nivel global. Actualmente, a pesar de las altas tasas de vacunación particularmente en países desarrollados, se han venido registrando globalmente cientos de miles de casos de pertussis por año, el 90% de los cuales se reportan en países en desarrollo, como bien puede observarse en la **Figura 1.A** [23]. Según datos oficiales registrados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que en el año 2008 hubo alrededor de 16 millones de casos y 195.000 muertes a causa de pertussis [23]. Estos números no se han modificado mucho en los últimos años, e incluso en los países más desarrollados que reportan las mayores tasas de vacunación se ha registrado un importante aumento en el número de casos detectados. Es por este motivo que se considera a la tos convulsa como una enfermedad reemergente y endémica, con epidemias que ocurren cada 2 a 5 años [24]. En Argentina, su reemergencia fue marcadamente notoria en el período 2003-2008, y desde el año 2007 la prevalencia de la enfermedad ha mostrado una tendencia creciente en el número de casos, como puede observarse en la **Figura 1.B** [25, 26]. Estos indicadores ubican a la tos convulsa como la segunda enfermedad inmunoprevenible de mayor incidencia en Argentina, luego de la parotiditis o paperas [23].

A



B



**Figura 1.** Datos estadísticos oficiales sobre la prevalencia de pertussis. **A.** Número de casos oficiales reportados anualmente (barras) y porcentaje global de cobertura de la vacuna DTP3 (difteria- tétanos-pertussis; línea azul, datos oficiales, línea roja, datos estimados). Fuente: Base de datos de la OMS, actualizados a julio de 2014. **B.** Número de casos notificados de pertussis en Argentina durante el período 2007-2013. Datos actualizados al 21 de enero de 2014. Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud, Ministerio de Salud.

Las razones que explicarían la reemergencia de *B. pertussis* parecen ser complejas. Se han propuesto varios factores que podrían influir en esta situación. Uno de ellos es la disminución en la inmunidad inducida por la vacunación y/o infección con el transcurso del tiempo. Se considera que la inmunidad después de una infección o inmunización comienza a descender a partir del 5° año y se extiende hasta los 8-10 años posteriores [27, 28]. Otro factor se asocia con la eficacia de las vacunas actuales, que se estima que oscila entre el 70 y el 90%, luego de la tercera dosis. Cabe destacar respecto de este aspecto que las vacunas actuales previenen la enfermedad, pero no la infección.

Esto se debe a que la eficacia de las vacunas es inferior a la proporción crítica de inmunización necesaria para bloquear la transmisión [22, 24, 29, 30]. Otro de los factores considerados como partícipes de la resurgencia de pertussis son los cambios genéticos en las cepas que circulan actualmente en la población. Se ha reportado en varios estudios que los aislamientos clínicos muestran perfiles genéticos diferentes a los de las cepas utilizadas para la producción de vacunas [31-35]. Así, por ejemplo, se han detectado cepas deficientes en Prn, un factor de virulencia incluido dentro de los componentes de las vacunas acelulares; dichos aislados han demostrado una eficiencia mayor que cepas de referencia en la infección del tracto respiratorio de ratones [36-38]. Asimismo, se ha observado una correlación entre aislamientos que contienen un determinado alelo del promotor para el gen de la toxina PTx (*ptx*) con una mayor expresión de factores de virulencia [39]. Éste y otros aspectos que promoverían la reemergencia de la enfermedad, han puesto de manifiesto la necesidad de comprender con más detalle el proceso infeccioso de *B. pertussis*, a fin de poder reevaluar el diseño de vacunas y de nuevas estrategias que permitan controlar la enfermedad y erradicarla de forma definitiva.

Conjuntamente con la reemergencia de pertussis a nivel mundial, se ha registrado un cambio en el perfil epidemiológico de la enfermedad. *B. pertussis* es potencialmente capaz de infectar cualquier ser humano, aunque los riesgos de infección son más altos en infantes no vacunados. Sin embargo, la infección puede permanecer asintomática o causar síntomas leves en niños más grandes, adolescentes y adultos [40]. En las últimas décadas, se ha puesto énfasis en la detección de la infección en adolescentes y adultos [35, 41-44]. Varios estudios enfocados en la transmisión de *B. pertussis* demostraron que los miembros de la familia en contacto cercano podrían ser considerados como la causa del 76-83 % de los casos confirmados de pertussis en niños [20, 27, 45]. De este modo, los adultos infectados podrían actuar como transportadores de la bacteria y serían quienes transmiten la enfermedad a niños susceptibles.

Considerando estos hechos, ha sido globalmente aceptado que pertussis no es exclusivamente una enfermedad de la infancia y como consecuencia varios países han implementado diversos refuerzos en sus esquemas de vacunación. En Argentina, el plan completo de vacunación, actualizado en el año 2014 es el siguiente: Quíntuple pentavalente: incluyendo la Triple bacteriana celular DTP (Difteria, Tétanos y Pertussis) a los 2, 4 y 6 meses; primer refuerzo Quíntuple pentavalente, a los 15-18 meses;

segundo refuerzo Triple bacteriana celular DPT, al inicio escolar (5-6 años); Triple bacteriana acelular dTap, refuerzo a los 11 años, a mujeres embarazadas y al personal de salud.

La reemergencia de pertussis como un problema de salud pública global presenta entonces dos desafíos. Por un lado, el desarrollo de vacunas con un perfil de seguridad aceptable, que provean una inmunidad duradera, reduzcan la tasa de infección y prevengan la misma. Por otro lado, el desarrollo de agentes terapéuticos y estrategias de tratamiento que reduzcan la morbilidad y mortalidad en poblaciones vulnerables. Ambos objetivos requieren una mejor comprensión del agente etiológico y de los mecanismos por medio de los cuales causa la enfermedad.

### 1.1.6. Factores de virulencia

Los factores de virulencia o determinantes de virulencia son componentes o productos elaborados por un patógeno que cumplen un rol durante su ciclo infeccioso en el hospedador. *B. pertussis* presenta un número importante de factores de virulencia. Estos factores de virulencia se pueden clasificar en adhesinas y toxinas, así como también en otras moléculas que permiten la interacción con las células del hospedador para alterar su función.

#### *Adhesinas*

**Hemaglutinina Filamentosa (FHA).** Es una proteína de 232 kDa, la cual ha sido considerada como la principal adhesina de *B. pertussis*. Localizada en su superficie celular, es a su vez secretada al medio extracelular. Junto a FhaC forma parte de un Sistema de Secreción TPS (del inglés *Two- Partner Secretion System*). Contiene varios dominios que promueven la adhesión a las células ciliadas del epitelio respiratorio, incluyendo dominios RGD (Arg-Gly-Asp), de reconocimiento a carbohidratos y de unión a heparina. Si bien FHA es considerada como la adhesina más importante de *B. pertussis*, la misma cumple su función junto con otras adhesinas, como las fimbrias o pertactina. Durante la infección, FHA induce una fuerte respuesta de anticuerpos y por esta razón es incluida en las formulaciones de vacunas acelulares [46-50].

**Fimbria.** Las fimbrias son estructuras largas y delgadas que se extienden desde la membrana externa de las bacterias y que median adhesión. *B. pertussis* produce dos

serotipos de fimbrias, el serotipo 2 y el serotipo 3, compuestos por la subunidad mayor Fim2 (22,5 kDa) o Fim3 (22 kDa) y que se asocian con una subunidad menor de 40 kDa, FimD, que sirve como adhesina. La expresión de los genes *fim2* y *fim3* está regulada por mutaciones en sus regiones promotoras, lo que resulta en un cambio de serotipo. Como resultado, algunas cepas producen ambos serotipos de fimbria, otras producen sólo un serotipo o ninguno de ellos. De manera similar a FHA, las fimbrias se unen a glicoconjugados sulfatados presentes en la superficie de células epiteliales [51-53].

**Pertactina (Prn).** Es miembro de la familia de los autotransportadores y es caracterizada por su habilidad de dirigir su propia secreción a través de la membrana externa usando la maquinaria Sec. Prn madura (también conocida como p.69) es producida a partir de un precursor proteico de 93 kDa (p.93), seguido de la remoción de un péptido señal de 34 aminoácidos en la región N-terminal y una región C-terminal de 30 kDa. (p.30). Prn contiene dos regiones ricas en prolina y un motivo RGD que han sido implicados en la adhesión. En los últimos años, se han identificado cepas de *B. pertussis* que no producen Prn, señalando una adaptación del patógeno a las estrategias adoptadas para su control, ya que ciertas formulaciones de vacunas acelulares contienen Prn [37, 54, 55].

**Otros autotransportadores.** Varios genes adicionales, activados por el sistema de reconocimiento de señales de dos componentes BvgAS, codifican proteínas de superficie o que son secretadas, que se sospecha tienen roles en la patogénesis. BrkA, TcfA, BapC, Vag8, Sph1 y Phg son proteínas autotransportadoras cuyos posibles roles en la patogénesis bacteriana incluyen mediación de adhesión, resistencia a suero, evasión de la clarificación de la infección mediada por anticuerpos y procesamiento proteolítico de otras proteínas de superficie [56-62]. BipA y BcfA, reguladas por BvgAS, son miembros de la familia intimina/invasina, y aunque sus roles en la patogénesis son desconocidos, la inmunización de ratones tanto con BcfA como con BipA contribuye a la protección contra *B. bronchiseptica* y *B. pertussis* respectivamente [63-65].

---

*Toxinas*

La mayoría de las toxinas de *B. pertussis* son de naturaleza proteica, con excepción del lipopolisacárido y la citotoxina traqueal la cual es un fragmento del peptidoglicano de *Bordetella*. Las tres toxinas proteicas más importantes son la toxina pertussis, la toxina adenilato ciclasa y la toxina dermonecrótica. La expresión de estas tres toxinas se encuentra bajo control del sistema de dos componentes BvgAS.

**Toxina pertussis (PTx).** PTx es una toxina proteica secretada y que es producida exclusivamente por *B. pertussis*. Es una toxina hexamérica del tipo AB<sub>5</sub>, de un tamaño de 117 kDa, consistente en cinco subunidades diferentes (llamadas PTxA-E o S1-S5). Es transportada a través de la membrana externa por el sistema de secreción tipo IV Ptl, que se co-transcribe junto con los genes *ptx*. La parte A consiste en la subunidad PTxA, que contiene el dominio catalítico de la toxina (ribosilación de ADP). El oligómero B<sub>5</sub> contiene las subunidades PTxB-PTxE (con dos copias de PTxD), y se encuentra involucrado en la unión a los receptores celulares de superficie. PTx es importante, pero no esencial para la infección. La ribosilación con ADP de las proteínas G heterotriméricas afecta la transducción de señales en varios tipos celulares. Como resultado biológico, PTx induce linfocitosis, alteración de la secreción de insulina y el incremento de la sensibilidad a histamina y otros mediadores [66-69].

**Adenilato ciclasa (ACT).** Otra toxina secretada con un rol importante para la patogénesis de *B. pertussis* es la adenilato ciclasa, que es un polipéptido de 200 kDa secretado a través de un sistema de secreción tipo I. ACT contiene dos dominios, uno catalítico que incluye el sitio activo y el sitio de unión a calmodulina. La funcionalidad de ACT es dependiente de modificaciones post-traduccionales, acilaciones e incorporación de ácido palmítico. Esta toxina transfiere su dominio de adenilato ciclasa dentro de las células del hospedador, lo que incrementa los niveles de AMPc, resultando en la inhibición de la función fagocítica y la activación de la apoptosis en algunos tipos celulares [70, 71].

**Toxina dermonecrótica (DNT).** La toxina dermonecrótica induce necrosis en ratones cuando es inyectada de forma intradérmica y es letal cuando se administra en bajas dosis de manera intravenosa. DNT es una toxina de tipo AB, compuesta por un dominio de unión a receptor en su N-terminal de 54 aminoácidos, y un dominio

enzimático de 300 aminoácidos. Aún no se conoce el receptor al que se une DNT o sus células blanco, pero se reportó que DNT es internalizada vía endocitosis. Esta toxina posee actividad transglutaminasa y puede activar GTPasas Rho [72, 73].

**Citotoxina traqueal (TCT).** La citotoxina traqueal contribuye a la adhesión de *B. pertussis* a las células epiteliales respiratorias. TCT es un disacárido-tetrapéptido que es liberado del peptidoglicano de la pared celular. Aunque la mayoría de las bacterias Gram-negativas reciclan esta molécula, *B. pertussis* lo hace de manera ineficiente, y libera una gran cantidad de TCT al medio extracelular. Esta toxina actúa de forma sinérgica junto con el lipooligosacárido para estimular la producción de citoquinas proinflamatorias e iNOS, resultando en la destrucción y extrusión de las células ciliadas de la superficie epitelial. Aunque ha sido propuesto que la citotoxicidad medida por TCT contribuye a la tos característica de pertussis, la falta de evidencia en modelos animales ha impedido corroborar esta hipótesis. Por lo tanto, la contribución de TCT a la patogénesis de la enfermedad en humanos aún es poco clara [16, 74-76].

**Lipopolisacárido.** *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* producen diferentes formas de lipopolisacárido (LPS). El LPS de *B. pertussis* se compone de una porción lipídica (lípidos A) unida a un núcleo trisacárido complejo. Debido a la ausencia del antígeno O, el LPS de *B. pertussis* es también llamado lipooligosacárido (LOS). Como todas las endotoxinas de otras bacterias Gram-negativas, el LPS de *B. pertussis* es pirogénico, mitogénico y tóxico y puede activar e inducir la producción del factor de necrosis tumoral (Tnf) en macrófagos. Tiene capacidad adyuvante y ha sido caracterizado por ser responsable de la reactogenicidad adversa observada en las vacunas celulares contra pertussis [77-79].

### *Otros factores asociados a virulencia*

**Sistema de Secreción Tipo III (SST3).** El sistema de secreción Tipo III representa un aparato de secreción especializado, que es utilizado por una amplia variedad de bacterias Gram-negativas para interferir con el funcionamiento de las células del huésped. Estos sistemas permiten la traslocación de proteínas efectoras directamente al citosol de la célula del hospedador. La mayoría de las proteínas efectoras son enzimas que modifican blancos citoplasmáticos involucrados en eventos celulares de importancia, incluyendo señales intracelulares, apoptosis, etc. En



*Bordetella*, el SST3 es regulado por BvgAS. Este sistema de secreción probablemente induce una forma necrótica de muerte celular. Pocos efectores han sido caracterizados hasta la actualidad. Se conoce que el sistema es activo cuando las bacterias se encuentran en un entorno in vivo, mientras que cuando las bacterias pasan a ser cultivadas en condiciones in vitro, luego de un determinado número de pasajes, el sistema de secreción es inactivado [80-84].

**Sistemas de captura de hierro.** *B. pertussis*, como todas las bacterias, requiere de hierro para ciertos procesos celulares esenciales. Sin embargo, la concentración de hierro libre en el ser humano se encuentra estrechamente regulada, con una concentración de  $\text{Fe}^{+3}$  en el orden de  $10^{-24}$  M en la superficie de las mucosas, mientras que el crecimiento bacteriano es soportado con una concentración sobre  $10^{-7}$  M [85]. Para permitir la infección del hospedador, *B. pertussis* es capaz de utilizar múltiples sistemas propios de captura de hierro, y a su vez es capaz de utilizar hierro unido a sideróforos exógenos [86]. Tres sistemas de transporte de alta afinidad han sido caracterizados genéticamente en *B. pertussis*; éstos incluyen alcalignina, enterobactina y los sistemas de utilización de hemo [87-89]. Bajo condiciones de exceso de hierro, la expresión global de estos sistemas es inhibida por el represor transcripcional dependiente de hierro Fur [90]. Bajo condiciones de limitación de hierro, los genes regulados por Fur se des-reprimen. La expresión de cada uno de estos sistemas puede ser regulada independientemente por activadores transcripcionales que responden a su fuente de hierro [91]. Aunque los sistemas de transporte de hierro han sido bien estudiados, se conoce muy poco sobre el rol de otros metales trazas importantes, como magnesio, manganeso, cobre, cobalto, zinc, etc., que cumplen roles esenciales en otras bacterias patogénicas [92, 93].

### 1.1.7. Control de la expresión de los factores de virulencia

Una de las primeras observaciones sobre *B. pertussis* que llamó la atención, fue que esta bacteria mostraba una variación en la expresión de antígenos en respuesta a señales del ambiente [6, 94, 95]. Dicho fenómeno (llamado modulación antigénica en ese entonces) se debe a la existencia de un regulador maestro que controla la transcripción de casi todos los genes de virulencia conocidos en *Bordetella*, llamado BvgAS (del inglés *Bordetella virulence gene activator/sensor*). Dado el rol central que este sistema desempeña, se suele clasificar a los factores de virulencia de acuerdo a si

están o no bajo su control. Las adhesinas FHA, FIM y Prn, las toxinas ACT, DNT y Ptx (en el caso de *B. pertussis*) y el sistema de secreción de tipo III se cuentan entre los factores cuya expresión es controlada por el sistema BvgAS, mientras que el LPS, la citotoxina TCT y los sistemas de captura de hierro regulan su expresión de manera independiente de este sistema [7].

BvgA y BvgS integran un sistema de dos componentes que permite la variación dinámica de la expresión génica en respuesta a cambios en señales extracelulares del ambiente. BvgA es un regulador de respuesta de unión a ADN, de 23 kDa [96] y BvgS es una quinasa sensora de transmembrana, de unos 135 kDa. BvgS contiene un dominio periplásmico, una región linker, y dominios transmisor, receptor y de fosfotransferencia a histidina [97]. BvgAS responde a ciertas señales conocidas que pueden modular su expresión, al menos en condiciones de laboratorio. Por ejemplo, cuando *B. pertussis* crece a 37°C induce positivamente la expresión de factores activados por el sistema BvgAS, mientras que la presencia de cantidades milimolares de sulfato o ácido nicotínico, o el crecimiento a una temperatura igual o menor a 25°C, suprime la producción de factores positivamente regulados por BvgAS [97]. De todos los inductores de la actividad del sistema BvgAS, la temperatura resulta ser el más relevante para sensar cambios en el ambiente in vivo. Actualmente, no hay una asociación in vivo sobre la contribución del sulfato o la presencia de ácido nicotínico en la modulación de la bacteria. La condición de cultivo donde se expresa el fenotipo virulento, o “no modulado”, lleva a que la población se exprese fenotípicamente en la forma conocida como fase Bvg<sup>+</sup> o virulenta.

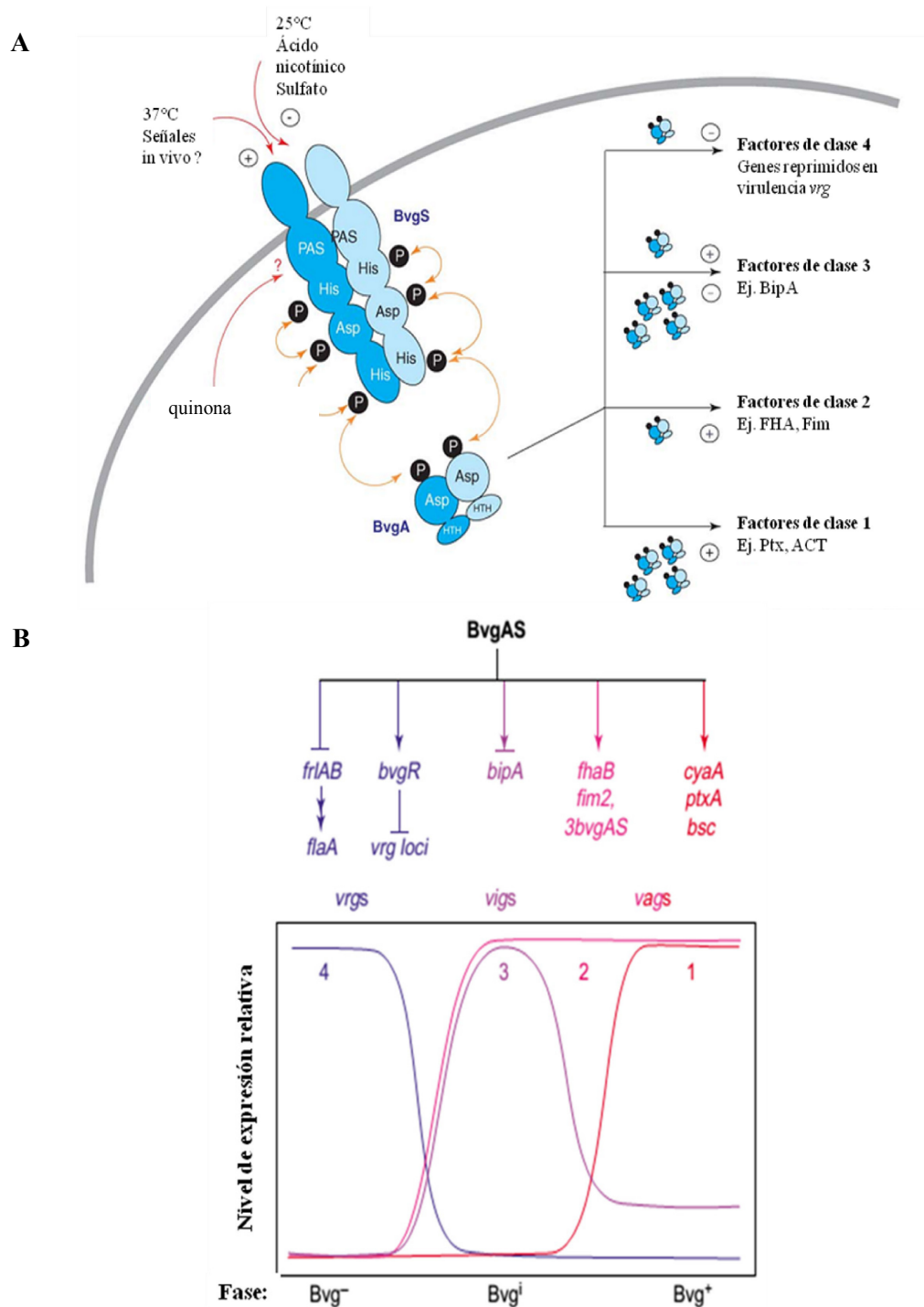
Durante la fase virulenta Bvg<sup>+</sup>, el dominio periplasmático de BvgS transmite las señales ambientales a través de la membrana al dominio transmisor, el cual luego se autofosforila (**Figura 2**). BvgS transmite este grupo fosfato a BvgA (BvgA-P), que entonces se activa y se une a secuencias específicas promotoras, induciendo la expresión de genes específicos de la fase Bvg<sup>+</sup>, llamados *vags* (del inglés *virulence activated genes* o genes activados en virulencia) [98, 99]. En base a experimentos de crecimiento in vitro, los *vags* han sido clasificados en tres diferentes clases temporales: tempranos, intermedios y tardíos [100-102]. Los genes tempranos (o de clase 2), los que codifican por ejemplo las adhesinas FHA y Fim, responden rápidamente a la activación y requieren concentraciones menores de BvgA-P para la inducción de su expresión. Los genes tardíos (o de clase 1), que incluyen aquellos codificantes para las toxinas PTx y

---

ACT, muestran cinéticas de inducción más lentas y requieren altas concentraciones de BvgA-P [101]. El gen codificante para Prn, pertenecería a los genes de clase intermedia [103]. El locus codificante para BvgAS se encuentra autorregulado y pertenece a los genes tempranos, lo que resulta en un nivel adicional de regulación para la expresión de los distintos tipos de genes bajo el control de este sistema [104]. Este fenómeno de expresión génica diferencial se debe a diferencias en las secuencias promotoras de cada gen, donde los promotores de los genes tardíos requieren mayores niveles de BvgA-P en comparación a las secuencias promotoras de los genes tempranos [105]. Como consecuencia, la bacteria puede orquestrar la expresión de sus factores de virulencia de forma tal que se beneficia en el proceso patológico de la infección.

Cuando *B. pertussis* crece bajo condiciones “moduladoras”, la fosforilación de BvgAS es inactivada [106]. Bajo estas condiciones, BvgAS es incapaz de activar la transcripción de los *vags*, y en su lugar, son expresados los *vrgs* (de *virulence repressed genes* o genes reprimidos en virulencia) o de clase 4, debido a la ausencia del represor BvgR, resultando en un fenotipo avirulento referido como fase Bvg<sup>-</sup> o avirulenta. Aún se desconoce si esta fase es relevante y funcional en la patogénesis de *B. pertussis*. En contraste, *B. bronchiseptica* en fase avirulenta tiene la capacidad de sobrevivir durante semanas en agua, sugiriendo que esta condición podría tener un rol en el ciclo de transmisión, permitiendo a la bacteria resistir situaciones de estrés nutricional [107-109].

Además de las fases Bvg<sup>+</sup> y Bvg<sup>-</sup>, se ha identificado una tercera fase, designada intermedia, o Bvg<sup>i</sup>, que puede ser inducida en condiciones de semimodulación [108]. Esta fase se caracteriza por la ausencia de la expresión de los *vrgs*, la expresión de algunos *vags* (como FHA), pero no de otros (como PTx, ACT), y una tercera clase de genes (genes de clase 3) que se expresan exclusivamente en esta fase. El principal representante de la fase Bvg<sup>i</sup> es la proteína de fase Bvg intermedia A (BipA), la cual ha sido sugerida como un factor importante para etapas de colonización temprana de las vías respiratorias [63, 64]. La existencia de esta fase se puede entender en términos de transmisión y colonización temprana del tracto respiratorio, en particular de la región superior, donde la temperatura local es menor que la corporal [63, 110].



**Figura 2. A.** Esquema de la vía de señalización efectuada por el sistema BvgAS. A partir de la presencia de un estímulo externo, se inducen cambios conformacionales y la fosforilación de varios dominios de BvgS, que lleva a la fosforilación del regulador transcripcional BvgA. Se muestra esquemáticamente el requerimiento de la concentración de BvgA fosforilado para la expresión de las cuatro clases de genes de virulencia. **B.** Perfil de la expresión génica de los factores regulados por el sistema BvgAS a lo largo de las tres fases de virulencia: Bvg<sup>+</sup>, Bvg<sup>i</sup> y Bvg<sup>-</sup>. Imágenes tomadas de Cotter y colaboradores, 2003 [4] y de Beier y colaboradores, 2006 [9].

---

Aún cuando las fases Bvg<sup>+</sup>, Bvg<sup>i</sup> y Bvg<sup>-</sup> son distintivas entre sí, es importante considerar que estas descripciones son el resultado de estudios in vitro. El tracto respiratorio humano es un ambiente altamente variable, y es muy posible que bajo estas condiciones, el sistema BvgAS no funcione como un interruptor de encendido y apagado, sino que facilitaría un espectro de niveles de expresión entre las tres fases [100]. Es debido a esta flexibilidad que se considera que el sistema BvgAS funcionaría como un “reóstato” controlando de forma coordinada la expresión diferencial de perfiles de genes asociados con la virulencia.

### 1.1.8. Patogénesis de la infección por *B. pertussis*

Como regla general, los patógenos bacterianos poseen cuatro etapas importantes con respecto al establecimiento de una infección y el desarrollo de una enfermedad, algunas de las cuales son también observadas en *B. pertussis*: la adhesión, la evasión de las defensas del hospedador, el daño local y las manifestaciones sistémicas. En algunos casos particulares, se podría incluir como una eventual quinta etapa la persistencia de la bacteria dentro de su hospedador.

El proceso infeccioso en esta enfermedad comienza con la adhesión de *B. pertussis* a células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio superior. Varios factores, algunos redundantes en su actividad, están implicados en esta etapa (Prn, FHA, Fim, Vag8, etc) [7]. Entre ellos, se destaca FHA como la adhesina más potente [111, 112]. A partir de aquí las bacterias proliferan y se esparcen por las vías respiratorias, donde la secreción de toxinas causa serias alteraciones del aparato mucociliar y facilita la entrada del microorganismo a las células ciliadas de la tráquea y bronquios. Una de las primeras toxinas expresadas es la TCT, que por sí misma es capaz de producir parálisis ciliar e inhibición de la síntesis de ADN en células epiteliales [113]. Como consecuencia del daño tisular producido por las toxinas, se genera un defecto mecánico que dificulta la eliminación de la bacteria del tracto respiratorio.

En la evasión de las defensas del hospedador, participan principalmente las toxinas ACT y PTx. La toxina ACT ayuda a evadir la inmunidad innata, inhibiendo la acción fagocítica de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos [114]. En el proceso infeccioso de *B. pertussis*, la toxina PTx afecta de manera adversa la fagocitosis y la eliminación de la bacteria a través de la inhibición de la migración de linfocitos y macrófagos a las áreas de infección [115].

En el caso de *B. bronchiseptica* se ha demostrado que una vez establecida la infección, la bacteria persiste en el hospedador. Varios trabajos han documentado la presencia de este patógeno en la cavidad nasal de animales infectados hasta 5 meses después de iniciada la infección [116, 117]. En el caso de *B. pertussis*, existen también indicios que sugieren que esto podría ocurrir en aquellos casos atípicos de infección en adolescentes y adultos que no presentan sintomatología o sólo manifiestan signos leves de la enfermedad durante períodos prologados [7, 40]. A pesar de estas evidencias, es poco lo que aún se conoce sobre los eventos que promoverían la persistencia de ambos patógenos en sus hospedadores. En este contexto se han propuesto mecanismos que podrían ayudar a comprender este aspecto. Uno de los mecanismos propuestos incluye la sobrevida del patógeno dentro de células del sistema inmune y del tejido epitelial [118-120]. Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ha propuesto como hipótesis, que tanto la colonización como la persistencia del patógeno en su hospedador están mediadas por la formación de *biofilm*. Investigaciones recientes, entre ellas las realizadas por nuestro grupo de trabajo, han mostrado la capacidad de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* de crecer en *biofilm* in vitro [121-123]. A estas investigaciones, se suman estudios de infección en ratones con *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* que han mostrado la formación de *biofilm* por ambas bacterias en la cavidad nasal de ratones [117]. Asimismo, se ha demostrado que el sistema BvgAS se encuentra involucrado en la regulación del proceso de formación de *biofilms* en ambas especies [121, 124]. El rol de la formación de *biofilm* en la patobiología de *Bordetella* se discute en las siguientes secciones.

### **1.2. Biofilms**

#### **1.2.1. El concepto de *biofilm***

Tradicionalmente, los microorganismos han sido estudiados en condiciones de cultivo planctónico, donde las bacterias crecen en suspensión en medios líquidos. Si bien estos estudios permitieron conocer facetas importantes de la fisiología microbiana, la concepción de células nadando libremente en medios líquidos, dista mucho de representar la forma en que las bacterias existen en la naturaleza. Observaciones microscópicas directas y técnicas recuperativas cuantitativas en una amplia variedad de hábitats naturales han establecido en forma inequívoca que la mayoría de los microbios viven y persisten adheridos a superficies (como células sésiles) dentro de ecosistemas estructurales complejos denominados *biofilms*, y no como organismos flotando

libremente en soluciones acuosas (células planctónicas). Desde las primeras observaciones de este comportamiento microbiano hasta la actualidad, el concepto de *biofilm* ha evolucionado como resultado de numerosas investigaciones en la temática. Una de las definiciones más aceptadas establece que un *biofilm* es una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un substrato o interfase, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas mismas producen y que en tal condición expresan un fenotipo propio [125-128].

La formación de *biofilms* permite a los organismos unicelulares adoptar temporalmente una forma de vida multicelular que facilita la supervivencia en ambientes adversos. Lo que una vez fue definido como una comunidad de microorganismos adheridos a una superficie ha sido reconocido como un proceso de desarrollo complejo, que es multifacético y dinámico. La transición del crecimiento planctónico al *biofilm* ocurre en respuesta a cambios ambientales e involucra sistemas de regulación que transfieren señales que se traducen en cambios en la expresión génica, mediando la reorganización temporal y espacial de las bacterias individuales [129-134].

Dentro del *biofilm*, las bacterias se encuentran protegidas por una matriz extracelular producida por ellas mismas [135]. La matriz está compuesta por sustancias poliméricas, que junto a proteínas de unión a carbohidratos [136-138], pili, flagelos y otras fibras adhesivas [139, 140], y ADN extracelular [141-144], actúa como un estabilizador de la estructura tridimensional del *biofilm*. Dentro de la matriz, los nutrientes son capturados y el agua es retenida por la interacción con polisacáridos hidrofílicos [135]. De este modo, los componentes estructurales de la matriz generan una estructura robusta con una alta fuerza de tensión que mantiene a las bacterias en una proximidad cercana, permitiendo el contacto célula-célula [135, 145], y protegen a la biomasa de la desecación, de moléculas oxidantes, de la radiación y otros agentes tóxicos [135, 146, 147]. La naturaleza resiliente atribuida a los *biofilms* se debe parcialmente a la presencia de gradientes ambientales dentro de la biomasa, donde se encuentran subpoblaciones de bacterias con expresión diferencial de genes en respuesta a la disponibilidad local de nutrientes y de oxígeno [148, 149]. Se ha demostrado la presencia de células metabólicamente inactivas, conocidas como persistores, que son tolerantes a una serie de antibióticos aún cuando son genéticamente idénticas al resto de la población bacteriana [149, 150].

### 1.2.2. Impacto de los *biofilms* en el área de salud

Los *biofilms* microbianos están ampliamente presentes en la naturaleza y pueden ser encontrados prácticamente en cualquier sitio donde haya humedad y una superficie donde adherirse [127]. Por su amplia distribución los *biofilms* tienen impacto en diversos ámbitos como medicina, ambiente e industria. El reconocimiento por parte de microbiólogos clínicos de que los *biofilms* microbianos son ubicuos en la naturaleza condujo al estudio de un gran número de enfermedades infecciosas bajo esta perspectiva de crecimiento microbiano.

Dentro de un hospedador, la matriz extracelular protege a las bacterias del *biofilm* de la exposición a las defensas innatas del sistema inmune, como opsonización y fagocitosis, así como también a los tratamientos con antibióticos [146, 147, 151-154]. Las interacciones inter-bacterianas pueden promover la dispersión de marcadores de resistencia a drogas y otros factores de virulencia [155]. Como resultado, los patógenos formadores de *biofilms* pueden persistir, estableciendo infecciones crónicas y recalcitrantes, como infecciones respiratorias (*Pseudomonas aeruginosa*) [156, 157], infecciones del tracto urinario (*Escherichia coli* uropatógena, *Klebsiella pneumoniae*) [158], periodontitis (infecciones mixtas de *Streptococcus mutans* y otras bacterias) [159], infecciones de catéteres y otros dispositivos médicos, etc. [160, 161].

### 1.2.3. Etapas del desarrollo en *biofilm*

La formación de *biofilm* es un proceso complejo que comprende múltiples etapas. Mientras el mecanismo molecular exacto involucrado en este proceso puede diferir de un organismo a otro, las etapas del desarrollo de un *biofilm* parecen ser conservadas entre un amplio rango de microorganismos, **Figura 3**.

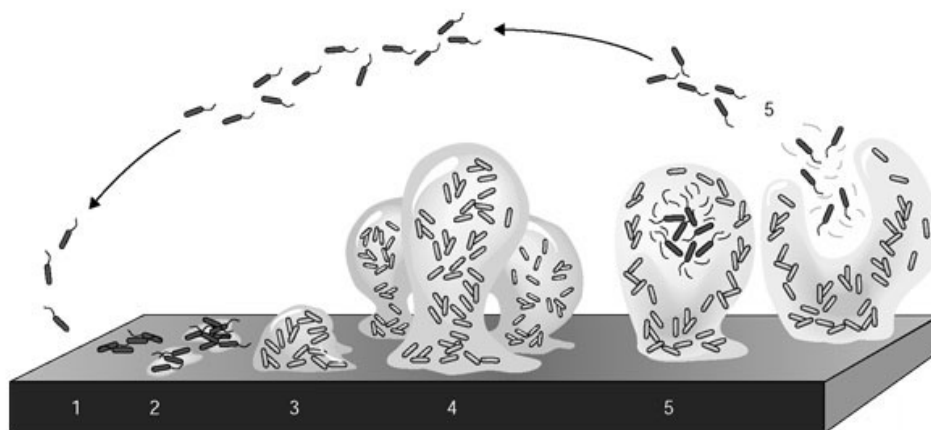
La agregación bacteriana y la subsecuente maduración de un *biofilm* consisten en una serie de etapas reversibles e irreversibles, que involucran ciertos factores conservados y/o específicos de la especie bacteriana. El primer paso consiste en el contacto de las bacterias con una superficie, un proceso que es en parte azaroso, dirigido por el movimiento Browniano y fuerzas gravitacionales, e influenciado por fuerzas hidrodinámicas [128, 162]. Dentro de un nicho, las bacterias encuentran fuerzas atractivas o repulsivas que varían dependiendo de los niveles de nutrientes, pH, fuerza iónica y temperatura. Las bacterias móviles tienen una ventaja competitiva, utilizando



sus flagelos para superar las fuerzas hidrodinámicas y repulsivas. La importancia de la movilidad flagelar para la adhesión inicial ha sido documentada para varios patógenos, como *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* e incluso *B. bronchiseptica*. En algunas especies bacterianas, la quimiotaxis también juega un papel en el direccionamiento de la adhesión [133, 163-167].

Al momento de interceptar una superficie, la adhesión es mediada por apéndices extracelulares llamados adhesinas. Sin embargo, la decisión de una bacteria de permanecer "pegada" no es absoluta, ya que la adhesión inicial es dinámica y reversible, es decir, una bacteria puede despegarse y unirse a la población planctónica si es perturbada por fuerzas hidrodinámicas o en respuesta de la disponibilidad de nutrientes [168-170]. La adhesión irreversible es alcanzada por bacterias que pueden resistir las fuerzas de corte y mantener un agarre o adhesión firme a la superficie, la cual es mediada por factores específicos. En bacterias Gram-negativas (como *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *E. coli*, *Salmonella enterica*) se ha visto que las fimbrias de tipo I, IV, los pili y los lipopolisacáridos son importantes para esta etapa [169, 171].

Una vez establecida la adhesión a la superficie, las bacterias comienzan la formación de agregados celulares pequeños o microcolonias [3]. En algunos microorganismos, la formación de microcolonias resulta del reclutamiento de las bacterias sobre la superficie, mientras que en otros casos se produce a través de eventos de división, donde las células hijas se extienden alrededor del sitio de adhesión inicial [169]. En ambos casos se conoce que los factores de adhesión (ej.: fimbrias, pili, exopolisacáridos) participan en estos eventos promoviendo interacciones célula-célula [128].



**Figura 3.** Modelo de las etapas de la formación de *biofilm*. **1.** Adhesión reversible de células a una superficie; **2.** Adhesión irreversible de las células; **3.** Crecimiento y agregación de células en microcolonias; **4.** Maduración y mantenimiento de la arquitectura del *biofilm*. **5.** Dispersión de células de la estructura para colonizar nuevos ambientes. Imagen adaptada del trabajo publicado por Sauer y colaboradores [3].

Aunque no se ha definido de manera general la etapa en la cual las bacterias comienzan a producir la matriz extracelular de polisacáridos, se sabe que su expresión resulta esencial en la etapa de maduración de la mayoría de los *biofilms* [172]. Numerosos estudios indican que durante esta etapa la secreción de exopolisacáridos es importante para la formación y mantenimiento de la estructura tridimensional del *biofilm* [173]. La composición del exopolisacárido suele ser diferente en cada bacteria, por ejemplo, alginato en *P. aeruginosa* [174], celulosa en *Salmonella typhimurium* [175], poli-N-acetilglucosamina en *Staphylococcus aureus* [176]. Durante la maduración, además de polisacáridos, las bacterias secretan proteínas, ácidos nucleicos, LPS y otros componentes que contribuyen a la composición de la matriz [128].

La mayoría de los *biofilms* presentan en su etapa de maduración arquitecturas complejas y muy heterogéneas. La estructura más representativa de un *biofilm* es la microcolonia. Básicamente, las microcolonias consisten en agregados de células bacterianas en los cuales las mismas interactúan entre sí y con el material extracelular que ellas producen y liberan al medio [171]. Dependiendo principalmente del microorganismo y de las condiciones de crecimiento, las microcolonias pueden adoptar diferentes conformaciones (ej.: forma de hongo, forma convexa o irregular). Generalmente, las microcolonias se intercalan con áreas abiertas donde se forman canales que permiten la incorporación de nutrientes y a su vez la eliminación de desechos o productos metabólicos [171]. Tanto los nutrientes como los desechos

difunden, aunque con ciertas restricciones, dentro y fuera de las microcolonias, a través de diferentes capas o estratos celulares que las integran [177]. Las restricciones de difusión asociadas a la organización estructural de las microcolonias serían también uno de los factores que promovería la marcada resistencia a antibióticos que suelen exhibir los *biofilms* [177, 178].

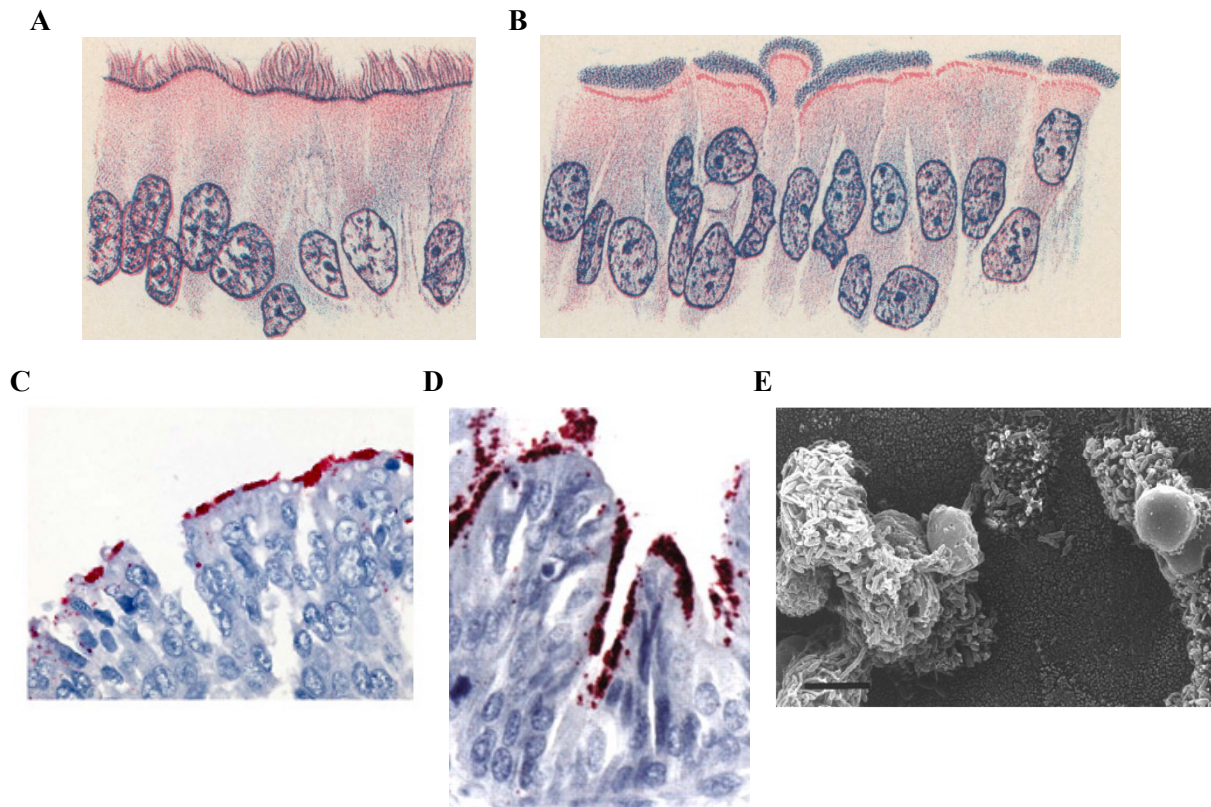
Dentro del *biofilm* maduro existe una comunidad bacteriana que intercambia y comparte activamente productos que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la arquitectura del *biofilm* y proporcionan un ambiente favorable para el resto de las bacterias residentes. Sin embargo, mientras el *biofilm* madura, la dispersión se convierte en una opción. Además de la dispersión pasiva, producida por fuerzas de corte, las bacterias han evolucionado para percibir los cambios del ambiente y decidir si todavía resulta beneficioso residir dentro del *biofilm*, o si es momento de reanudar un estilo de vida planctónico. La dispersión puede ser el resultado de varios factores, como alteraciones en la disponibilidad de nutrientes, fluctuaciones en el oxígeno y el incremento de productos tóxicos [179-182]. Varios de los factores ambientales ejercen su influencia induciendo la activación de mecanismos de regulación (como quórum sensing) que reprimen genes involucrados en la síntesis de adhesinas [131, 171].

La formación de un *biofilm* es un proceso altamente regulado. En el mismo intervienen varios sistemas y/o mecanismos, muchos de ellos interconectados entre sí, que regulan la expresión y la actividad de un número significativo de genes y proteínas que controlan las funciones celulares requeridas para la formación de *biofilm*. Entre los elementos regulatorios descritos que participan en la formación de *biofilm* se destacan: reguladores globales; sistemas de transducción de señales de dos y tres componentes, sistema de señalización mediado por el segundo mensajero (3'5') guanosín-monofosfato-cíclico (GMP-di-c) y los sistemas de quórum sensing [180].

#### **1.2.4. Evidencias de producción de *biofilm* por *B. pertussis* en el tracto respiratorio humano**

Tanto en el caso de *B. bronchiseptica*, como en el caso de *B. pertussis*, si bien se conocen en profundidad los aspectos relacionados a la patogénesis de dichas bacterias, aún resta por entender y caracterizar los mecanismos utilizados en la persistencia en humanos y animales. Este aspecto resulta clave en el caso de *B. pertussis*, ya que el

único hospedador conocido es el ser humano, y que es incapaz de sobrevivir en el ambiente por largos períodos de tiempo [183, 184]. Una de las hipótesis planteadas es que la sobrevivida y continua persistencia de *Bordetella* se debe a la colonización del tracto respiratorio mediante la producción de *biofilms*. Las primeras evidencias de este tipo de colonización fueron presentadas en los primeros reportes asociados al estudio de la enfermedad. En un artículo publicado en 1912, 12 años luego de que se haya aislado a *B. pertussis*, se presentaron imágenes de cortes histológicos tráquea y bronquiolos de pacientes que fallecieron a causa de Tos convulsa (**Figura 4**) [1]. Mallory y Hornor, describen la presencia de masas de pequeños bacilos agrupados entre las cilias que recubren el epitelio, y a su vez, en las secreciones recuperadas de los pacientes. Los dibujos describen claramente grandes números de bacterias en forma de agregados. Casi cien años más tarde, Paddock y colaboradores observaron de modo similar, la presencia de estos mismos agregados en el epitelio ciliado de la tráquea y bronquios de pacientes infectados [2]. Más aún, *B. pertussis* también ha sido encontrada adherida a células ciliadas de explantos nasales humanos, en la forma de microcolonias [8]. En este estudio, los autores describen que las bacterias se encontraban colonizando el tejido como capas, que en algunos casos resultaron ser tan densas que resultó imposible distinguir el tejido subyacente. Si bien en todos estos casos los autores no clasifican de forma directa a la disposición de las bacterias como *biofilm*, las estructuras observadas son similares a aquellas descritas para otros patógenos, y más aún, análogas a las halladas en modelos de estudio animal tanto para *B. bronchiseptica* como para *B. pertussis*.



**Figura 4.** A-B. Dibujos de cortes histológicos del tejido ciliado de la tráquea publicado hace más de 100 años. En A se representa el tejido normal, mientras que en B, el tejido de un paciente que falleció de Tos convulsa [1]. C-D. Tinción inmunohistoquímica de *B. pertussis* presente en tráquea y en bronquiolos [2]. E. Micrografía electrónica de escaneo de explantos humanos nasales infectados con *B. pertussis*. En todos los casos se pueden observar grandes números de bacterias sobre las células ciliadas formando agregados [8].

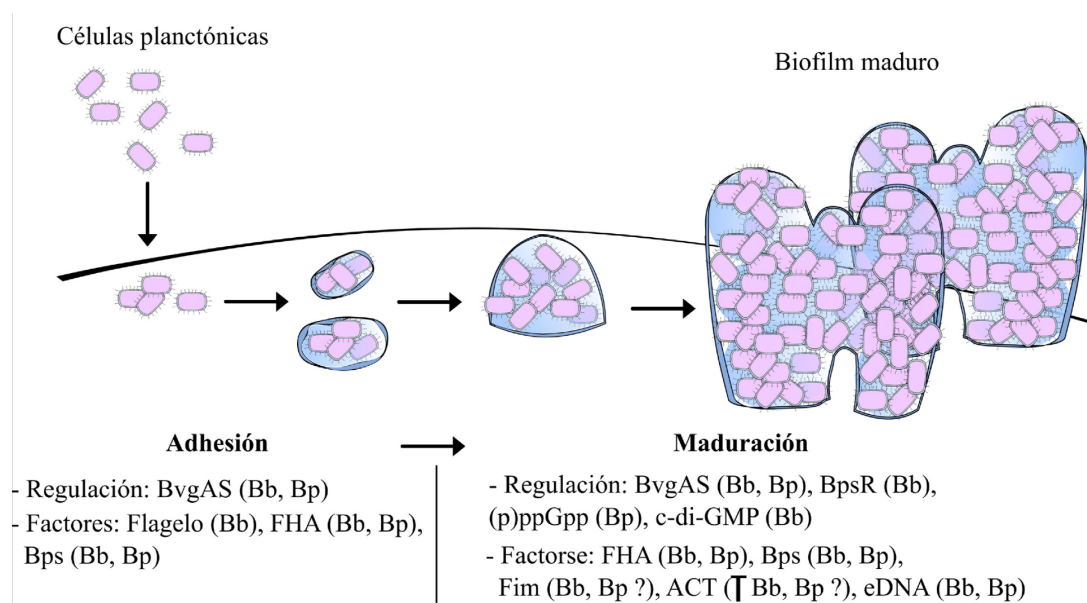
### 1.2.5. Proceso de formación de *biofilm* por *Bordetella* spp

En la última década, varios avances se han establecido con respecto a la caracterización del proceso de formación de *biofilm* en *Bordetella*, en parte gracias al estudio en *B. bronchiseptica*. En la **Figura 5** se resume lo reportado hasta el momento sobre los factores y mecanismos de regulación caracterizados o que se ha observado que se encuentran involucrados en el desarrollo de *biofilm* en *Bordetella*.

Los primeros estudios que demostraron la capacidad de formación de *biofilm* en el género *Bordetella*, se orientaron a analizar la participación del sistema de regulación BvgAS. Experimentos in vitro utilizando a *B. bronchiseptica* y *B. pertussis*, junto con cepas derivadas bloqueadas en fase Bvg<sup>-</sup> demostraron que la formación de *biofilm* ocurre bajo condiciones Bvg<sup>+</sup>, mientras que se reprime en condiciones Bvg<sup>-</sup> [121, 123]. Estos resultados revelaron indirectamente la participación de los factores de virulencia regulados por BvgAS en el desarrollo de *biofilms*. Por otro lado, estudios en *B.*

*bronchiseptica* han mostrado que sería en la fase Bvg<sup>i</sup> donde se produce el máximo nivel de *biofilm* para esta bacteria [124]. Estas condiciones aún no han sido analizadas en el contexto de *B. pertussis*, pero sugiere una participación e interacción entre diferentes factores de virulencia que favorecerían, o no, al desarrollo del *biofilm*.

Otros mecanismos han sido descritos en su participación en la regulación del proceso. Uno de ellos, es mediado por la molécula GMP-di-c, una molécula intracelular que actúa a nivel de transducción de señales y regulación de expresión de genes. Esta molécula cumple un rol clave en la decisión entre un crecimiento planctónico o sésil, actuando a nivel de un amplio rango de efectores controlando así la transcripción y la actividad de diversas enzimas [185, 186]. Sisti y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de la molécula c-di-GMP, especialmente en condiciones de cultivo Bvg<sup>i</sup>, incrementa el nivel de *biofilm* formado por *B. bronchiseptica*. A su vez, han demostrado que el c-di-GMP regula de forma negativa la expresión del flagelo (presente únicamente en *B. bronchiseptica*), contribuyendo posiblemente al desarrollo sésil [187].



**Figura 5.** Modelo del desarrollo de biofilm por *Bordetella* spp. Células planctónicas inician el proceso de adhesión regulado por BvgAS. En este paso, una etapa Bvg<sup>i</sup> es promovida en *B. bronchiseptica*, donde se expresa su flagelo. En *B. pertussis*, FHA es la principal adhesina. Bps es el polisacárido que se encuentra involucrado en la adhesión al epitelio nasal. Las microcolonias se diferencian a una estructura de biofilm maduro, el cual presenta estructuras de capas de bacterias rodeadas de una matriz extracelular y canales de agua de forma irregular. Varios puntos de regulación han sido caracterizados, entre ellos BvgAS, (p)ppGpp, GMP-di-c y BpsR. Bps y ADNe, como componentes de la matriz extracelular, promueven la estabilidad de las microcolonias, junto con FHA, la cual facilita el contacto cercano entre células y con el sustrato, posiblemente junto con Fim. ACT inhibe el desarrollo de biofilm en *B. bronchiseptica*, mediante un mecanismo que podría involucrar su interacción con FHA. Modificado de Cattelan y colaboradores [5].

Por otro lado, se ha reportado que la alarmona (p)ppGpp, que es acumulada en el citoplasma de bacterias que se encuentran bajo estrés nutricional, favorece la expresión de Fim3 y Bsp22, un efector del Sistema de Secreción Tipo III. En estas condiciones, las dos proteínas se encuentran formando proyecciones en forma de filamentos que favorecerían la interacción entre bacterias vecinas, y, de este modo, la formación de *biofilm* en *B. pertussis* [188]. Tanto la regulación de la producción de c-di-GMP como de (p)ppGpp son independientes de BvgAS [187, 188].

A modo de comprender de forma más extensiva el significado de la formación de *biofilms* en la patogénesis de *B. pertussis*, la identificación de los factores involucrados dentro de este proceso es de vital importancia. Como se detalló previamente, los hallazgos de que bajo condiciones de modulación, *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* son incapaces de formar *biofilms*, sugiere que los genes *vags* son importantes para la formación del *biofilm*. Además, debido a que la formación de un *biofilm* es iniciada por la adhesión de células planctónicas a una superficie, las adhesinas jugarían un rol esencial en este proceso. Experimentos *in vitro*, y algunos *in vivo*, han demostrado la participación de FHA y Fim en la adhesión y desarrollo del *biofilm* [124, 189]. Ha sido reportado que estas dos proteínas forman estructuras que facilitarían, en *B. pertussis*, la interacción no sólo bacteria-sustrato, sino también bacteria-bacteria. En particular, Irie y colaboradores reportaron que la atenuación de la formación de *biofilm* en mutantes de *B. bronchiseptica* defectivos en Fim y FHA era dependiente de la fase Bvg [124]. Por un lado, el mutante por delección de Fim se mostró afectado en la formación de *biofilm* bajo condiciones Bvg<sup>+</sup>, mientras que el mutante por delección de FHA mostró un defecto en el crecimiento en *biofilm* bajo condiciones Bvg<sup>i</sup>. A su vez, este estudio reveló que la delección de la toxina ACT resulta en un aumento en la formación de *biofilm*, lo que sugiere que ACT podría directa o indirectamente inhibir la formación de *biofilm* en *B. bronchiseptica* [124][110]. Debido a que ACT se expresa de forma máxima en la fase Bvg<sup>+</sup>, mientras que FHA es expresada en las fases Bvg<sup>+</sup> y Bvg<sup>i</sup> [107], se ha especulado que la interacción entre FHA y ACT en la fase Bvg<sup>+</sup> es la que llevaría a un fenotipo de *biofilm* más débil [190]. *B. pertussis* presenta un perfil de expresión similar de FHA y ACT, motivo por el cual sería interesante estudiar si la interacción entre ambas proteínas tiene el mismo efecto en *B. pertussis*, y si la fase Bvg<sup>i</sup> favorece el desarrollo de forma más fuerte de *biofilm*.

Para la formación de un *biofilm* maduro, las bacterias presentes en una microcolonia necesitan producir y secretar componentes de la matriz extracelular, como proteínas, lípidos, ADN y principalmente polisacáridos. Parise y colaboradores han identificado un locus (*bpsABCD*) requerido para la producción de poli-b-1,6-N-acetil-D-glucosamina, también conocido como polisacárido Bps [122]. Los autores demostraron que la formación de *biofilm* se inhibe al agregar dispersina B (una enzima degradadora de polisacárido) tanto en *B. pertussis* como en *B. bronchiseptica* o bien al delecionar el locus *bpsABCD* en *B. bronchiseptica*. Estos resultados fueron también corroborados in vivo, donde el mutante por delección de *bpsABCD* no fue capaz de producir *biofilms* robustos en el tracto respiratorio de ratones. Más aún, ha sido demostrado que el rol del polisacárido Bps se encuentra restringido en etapas de colonización temprana y en la formación de *biofilms* en la cavidad nasal y en la tráquea, pero no en los pulmones [191]. El polisacárido Bps fue caracterizado como una adhesina, debido a que media específicamente la adhesión a células epiteliales humanas de la cavidad nasal y no a células epiteliales humanas de pulmón. Estos hallazgos sugieren que el receptor al cual Bps se uniría, se encuentra en células del tracto respiratorio superior, y que la formación de *biofilm* podría ser específicamente importante para la colonización y posiblemente para la transmisión.

Conover y colaboradores también demostraron que el ADN es un componente importante de la matriz de *biofilms* de *Bordetella* [192]. El agregado de DNasaI al inicio del crecimiento en *biofilm* produce una inhibición en la formación de *biofilm*. Por otro lado, el tratamiento de *biofilms* maduros con DNasaI llevó a la disrupción de la biomasa, demostrando que el ADN extracelular actúa como un componente estructural de la matriz, no sólo in vitro, sino también in vivo.

A pesar de los importantes avances realizados en la última década sobre el proceso de formación de *biofilm* en *Bordetella*, los aspectos moleculares de este proceso de desarrollo sésil son aún motivo de investigación y representan potenciales implicancias significativas en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas y de control de pertussis.



### 1.3. Antecedentes y objetivos de este trabajo

*B. pertussis* es un patógeno estrictamente humano, agente causal de la tos convulsa o pertussis, una enfermedad altamente contagiosa del tracto respiratorio [7]. Después de más de 50 años de vacunación y de importantes avances logrados para el control de la enfermedad, la OMS sigue reportando miles de casos anuales de pertussis con picos de incidencia de la enfermedad cada 3-5 años, aún en países con alta tasa de vacunación [34, 35, 41]. Como consecuencia, pertussis es considerada en la actualidad como una enfermedad infecciosa reemergente. En nuestro País el incremento de casos de pertussis entre 2002 y 2007 (300%) obligó a incorporar al calendario nacional de vacunación un nuevo refuerzo, la triple bacteriana acelular, a partir de los 11 años [32, 44].

Varios reportes a nivel internacional han discutido la eficacia de las vacunas pertussis actuales, indicando que una forma de mejorarlas, es mantenerlas actualizadas empleando en su producción cepas que no presenten diferencias en cuanto a antígenos relevantes, con respecto a los organismos circulantes en la población [34, 193]. En este sentido ha sido reportado que aislados clínicos locales difieren antigénicamente de los empleados en las vacunas de uso corriente en nuestro país [33, 37, 44, 194]. La aparición de estas cepas podría deberse a la selección de variantes virulentas generadas no sólo por la disimilitud antigénica con las cepas utilizadas en las vacunas, sino también porque las bacterias con las cuales se formulan estas vacunas son obtenidas a partir del crecimiento de células planctónicas en reactores agitados mecánicamente, en condiciones ambientales muy diferentes de las que encuentra el patógeno en el hospedador (medios ricos en nutrientes donde las bacterias alcanzan en fase exponencial su máxima velocidad específica de crecimiento). *B. pertussis*, al menos en la primera etapa de la infección crece adherida a superficies del tejido respiratorio bajo limitación de nutrientes (hierro, etc.) y el ataque por las defensas inmunes del hospedador [7]. Diferencias fenotípicas importantes entre células planctónicas y sus contrapartes poblaciones sésiles, han sido documentadas para muchos organismos, incluso por nuestro laboratorio para *B. pertussis* Tohama I [123, 195].

Al presente se conoce muy poco sobre la forma en que *B. pertussis* vive y persiste en su único hospedador conocido. Avanzar en el esclarecimiento de esta temática permitirá entender mejor el modo de vida del patógeno en el ser humano, y a

partir de esto diseñar nuevas estrategias para controlar la enfermedad, que podrían incluir el diseño de nuevas vacunas. En este sentido, los objetivos que fueron planteados en el contexto de esta Tesis Doctoral al inicio de la misma fueron los siguientes:

- 1- Estudiar la heterogeneidad fenotípica de aislamientos clínicos de *B. pertussis* por medio de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), a partir de organismos crecidos en medio sólido en ágar Bordet-Gengou suplementado con sangre y de células recuperadas de cultivos en *biofilms*.
- 2- Estudiar el fenotipo expresado en condiciones de crecimiento planctónico por aislamientos clínicos seleccionados.
- 3- Monitorear, caracterizar y establecer si existen diferencias estructurales entre *biofilms* formados por la cepa de referencia y por los aislados clínicos seleccionados. Estudiar las características fenotípicas que permiten a dichas cepas alcanzar la producción de *biofilms*.
- 4- Evaluar para los organismos en estudio la capacidad de colonizar órganos del tracto respiratorio superior en un modelo murino.
- 5- Estudiar el rol de las porinas OmpP y OmpQ, analizando los posibles mecanismos por los cuales dichos factores se encontrarían involucrados en el proceso de formación de *biofilms* de *Bordetella*.

---

## 1.4. Referencias

1. Mallory FB, Hornor AA: Pertussis: The histological Lesion in the Respiratory Tract. *J Med Res* 1912, 27(2):115-124 113.
2. Paddock CD, Sanden GN, Cherry JD, Gal AA, Langston C, Tatti KM, Wu KH, Goldsmith CS, Greer PW, Montague JL *et al*: Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin Infect Dis* 2008, 47(3):328-338.
3. Sauer K: The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol* 2003, 4(6):219.
4. Cotter PA, Jones AM: Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol* 2003, 11(8):367-373.
5. Cattelan N, Dubey P, Arnal L, Yantorno OM, Deora R: *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog Dis* 2016, 74(1).
6. de Gouw D, Diavatopoulos DA, Bootsma HJ, Hermans PW, Mooi FR: Pertussis: a matter of immune modulation. *FEMS Microbiol Rev* 2011, 35(3):441-474.
7. Mattoo S, Cherry JD: Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* 2005, 18(2):326-382.
8. Soane MC, Jackson A, Maskell D, Allen A, Keig P, Dewar A, Dougan G, Wilson R: Interaction of *Bordetella pertussis* with human respiratory mucosa in vitro. *Respir Med* 2000, 94(8):791-799.
9. Beier D, Gross R: Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol* 2006, 9(2):143-152.
10. Woolfrey BF, Moody JA: Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin Microbiol Rev* 1991, 4(3):243-255.
11. Diavatopoulos DA, Cummings CA, van der Heide HG, van Gent M, Liew S, Relman DA, Mooi FR: Characterization of a highly conserved island in the otherwise divergent *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* genomes. *J Bacteriol* 2006, 188(24):8385-8394.
12. Diavatopoulos DA, Cummings CA, Schouls LM, Brinig MM, Relman DA, Mooi FR: *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. *PLoS Pathog* 2005, 1(4):e45.
13. Smith AM, Guzman CA, Walker MJ: The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS Microbiol Rev* 2001, 25(3):309-333.
14. Hegerle N, Guiso N: Epidemiology of whooping cough & typing of *Bordetella pertussis*. *Future Microbiol* 2013, 8(11):1391-1403.
15. Storsaeter J WJ, Locht C (ed.): Pertussis vaccines. Oxford: Horizon Bioscience; 2007.
16. Melvin JA, Scheller EV, Miller JF, Cotter PA: *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol* 2014, 12(4):274-288.
17. Kline JM, Lewis WD, Smith EA, Tracy LR, Moerschel SK: Pertussis: a reemerging infection. *Am Fam Physician* 2013, 88(8):507-514.
18. McEniery JA, Delbridge RG, Reith DM: Infant pertussis deaths and the management of cardiovascular compromise. *J Paediatr Child Health* 2004, 40(4):230-232.
19. Birkebaek NH, Kristiansen M, Seefeldt T, Degn J, Moller A, Heron I, Andersen PL, Moller JK, Ostergard L: *Bordetella pertussis* and chronic cough in adults. *Clin Infect Dis* 1999, 29(5):1239-1242.

20. Long SS, Welkon CJ, Clark JL: Widespread silent transmission of pertussis in families: antibody correlates of infection and symptomatology. *J Infect Dis* 1990, 161(3):480-486.
21. Altunajji S, Kukuruzovic R, Curtis N, Massie J: Antibiotics for whooping cough (pertussis). *Cochrane Database Syst Rev* 2007(3):CD004404.
22. Wood N, McIntyre P: Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatr Respir Rev* 2008, 9(3):201-211; quiz 211-202.
23. <http://www.who.int/topics/pertussis>.
24. Organization WH: Pertussis vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2010, 85(40):385-400.
25. Gentile A: Bordetella pertussis infection. *Arch Argent Pediatr* 2010, 108(1):78-81.
26. Ministerio de Salud PdLN: Boletín Integrado de Vigilancia. N° 203 - SE 3:111.
27. Edwards KM: Overview of pertussis: focus on epidemiology, sources of infection, and long term protection after infant vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 2005, 24(6 Suppl):S104-108.
28. Mooi FR, Van Der Maas NA, De Melker HE: Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin. *Epidemiol Infect* 2014, 142(4):685-694.
29. Cherry JD: The science and fiction of the "resurgence" of pertussis. *Pediatrics* 2003, 112(2):405-406.
30. Tan T, Trindade E, Skowronski D: Epidemiology of pertussis. *Pediatr Infect Dis J* 2005, 24(5 Suppl):S10-18.
31. Bouchez V, Caro V, Levillain E, Guigon G, Guiso N: Genomic content of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in areas of intensive children vaccination. *PLoS One* 2008, 3(6):e2437.
32. Caro V, Bouchez V, Guiso N, Gatti B, Agosti MR, Ayala SE: Pertussis in Argentina and France. *Vaccine* 2007, 25(22):4335-4339.
33. Fingerhann M, Fernandez J, Sisti F, Rodriguez ME, Gatti B, Bottero D, Graieb A, Gaillard ME, Ayala SG, Mooi FR *et al*: Differences of circulating *Bordetella pertussis* population in Argentina from the strain used in vaccine production. *Vaccine* 2006, 24(17):3513-3521.
34. Kallonen T, He Q: *Bordetella pertussis* strain variation and evolution postvaccination. *Expert Rev Vaccines* 2009, 8(7):863-875.
35. van Amersfoort SC, Schouls LM, van der Heide HG, Advani A, Hallander HO, Bondeson K, von König CH, Riffelmann M, Vahrenholz C, Guiso N *et al*: Analysis of *Bordetella pertussis* populations in European countries with different vaccination policies. *J Clin Microbiol* 2005, 43(6):2837-2843.
36. Hegerle N, Dore G, Guiso N: Pertactin deficient *Bordetella pertussis* present a better fitness in mice immunized with an acellular pertussis vaccine. *Vaccine* 2014, 32(49):6597-6600.
37. Hegerle N, Guiso N: *Bordetella pertussis* and pertactin-deficient clinical isolates: lessons for pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2014, 13(9):1135-1146.
38. Zeddeman A, van Gent M, Heuvelman CJ, van der Heide HG, Bart MJ, Advani A, Hallander HO, Wirsing von König CH, Riffelman M, Storsaeter J *et al*: Investigations into the emergence of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in six European countries, 1996 to 2012. *Euro Surveill* 2014, 19(33).

39. de Gouw D, Hermans PW, Bootsma HJ, Zomer A, Heuvelman K, Diavatopoulos DA, Mooi FR: Differentially expressed genes in *Bordetella pertussis* strains belonging to a lineage which recently spread globally. *PLoS One* 2014, 9(1):e84523.
40. Cherry JD, Grimprel E, Guiso N, Heininger U, Mertsola J: Defining pertussis epidemiology: clinical, microbiologic and serologic perspectives. *Pediatr Infect Dis J* 2005, 24(5 Suppl):S25-34.
41. de Melker HE, Schellekens JF, Neppelenbroek SE, Mooi FR, Rumke HC, Conyn-van Spaendonck MA: Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of the Netherlands: observations on surveillance data. *Emerg Infect Dis* 2000, 6(4):348-357.
42. Galanis E, King AS, Varughese P, Halperin SA: Changing epidemiology and emerging risk groups for pertussis. *CMAJ* 2006, 174(4):451-452.
43. Hellenbrand W, Beier D, Jensen E, Littmann M, Meyer C, Oppermann H, Wirsing von König CH, Reiter S: The epidemiology of pertussis in Germany: past and present. *BMC Infect Dis* 2009, 9:22.
44. Hozbor D, Mooi F, Flores D, Weltman G, Bottero D, Fossati S, Lara C, Gaillard ME, Pianciola L, Zurita E *et al*: Pertussis epidemiology in Argentina: trends over 2004-2007. *J Infect* 2009, 59(4):225-231.
45. Zepp F, Heininger U, Mertsola J, Bernatowska E, Guiso N, Roord J, Tozzi AE, Van Damme P: Rationale for pertussis booster vaccination throughout life in Europe. *Lancet Infect Dis* 2011, 11(7):557-570.
46. Hodak H, Clantin B, Willery E, Villeret V, Loch C, Jacob-Dubuisson F: Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate. *Mol Microbiol* 2006, 61(2):368-382.
47. Ishibashi Y, Relman DA, Nishikawa A: Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and alpha5beta1 integrin. *Microb Pathog* 2001, 30(5):279-288.
48. Menozzi FD, Gantiez C, Loch C: Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin. *FEMS Microbiol Lett* 1991, 62(1):59-64.
49. Prasad SM, Yin Y, Rodzinski E, Tuomanen EI, Masure HR: Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1993, 61(7):2780-2785.
50. Zackrisson G, Arminjon F, Krantz I, Lagergard T, Sigurs N, Taranger J, Trollfors B: Serum antibody response to filamentous hemagglutinin in patients with clinical pertussis measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988, 7(6):764-770.
51. Geuijen CA, Willems RJ, Bongaerts M, Top J, Gielen H, Mooi FR: Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. *Infect Immun* 1997, 65(10):4222-4228.
52. Geuijen CA, Willems RJ, Mooi FR: The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars. *Infect Immun* 1996, 64(7):2657-2665.
53. Mooi FR, van der Heide HG, ter Avest AR, Welinder KG, Livey I, van der Zeijst BA, Gaastra W: Characterization of fimbrial subunits from *Bordetella* species. *Microb Pathog* 1987, 2(6):473-484.
54. Charles IG, Dougan G, Pickard D, Chatfield S, Smith M, Novotny P, Morrissey P, Fairweather NF: Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, 86(10):3554-3558.

55. Henderson IR, Nataro JP: Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* 2001, 69(3):1231-1243.
56. Barnes MG, Weiss AA: BrkA protein of *Bordetella pertussis* inhibits the classical pathway of complement after C1 deposition. *Infect Immun* 2001, 69(5):3067-3072.
57. Bokhari H, Bilal I, Zafar S: BapC autotransporter protein of *Bordetella pertussis* is an adhesion factor. *J Basic Microbiol* 2012, 52(4):390-396.
58. Finn TM, Amsbaugh DF: Vag8, a *Bordetella pertussis* bvg-regulated protein. *Infect Immun* 1998, 66(8):3985-3989.
59. Finn TM, Stevens LA: Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol Microbiol* 1995, 16(4):625-634.
60. Marr N, Shah NR, Lee R, Kim EJ, Fernandez RC: *Bordetella pertussis* autotransporter Vag8 binds human C1 esterase inhibitor and confers serum resistance. *PLoS One* 2011, 6(6):e20585.
61. Middendorf B, Stubs D, Guiso N, Deppisch H, Gross R, Fuchs TM: Phg, a novel member of the autotransporter family present in *Bordetella* species. *Microbiol Res* 2005, 160(3):329-336.
62. Williams CL, Haines R, Cotter PA: Serendipitous discovery of an immunoglobulin-binding autotransporter in *Bordetella* species. *Infect Immun* 2008, 76(7):2966-2977.
63. Stockbauer KE, Fuchslocher B, Miller JF, Cotter PA: Identification and characterization of BipA, a *Bordetella* Bvg-intermediate phase protein. *Mol Microbiol* 2001, 39(1):65-78.
64. Sukumar N, Mishra M, Sloan GP, Ogi T, Deora R: Differential Bvg phase-dependent regulation and combinatorial role in pathogenesis of two *Bordetella* paralogs, BipA and BcfA. *J Bacteriol* 2007, 189(10):3695-3704.
65. Sukumar N, Love CF, Conover MS, Kock ND, Dubey P, Deora R: Active and passive immunizations with *Bordetella* colonization factor A protect mice against respiratory challenge with *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* 2009, 77(2):885-895.
66. Carbonetti NH, Artamonova GV, Van Rooijen N, Ayala VI: Pertussis toxin targets airway macrophages to promote *Bordetella pertussis* infection of the respiratory tract. *Infect Immun* 2007, 75(4):1713-1720.
67. Kaslow HR, Burns DL: Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *FASEB J* 1992, 6(9):2684-2690.
68. Katada T, Tamura M, Ui M: The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein. *Arch Biochem Biophys* 1983, 224(1):290-298.
69. Nicosia A, Perugini M, Franzini C, Casagli MC, Borri MG, Antoni G, Almoni M, Neri P, Ratti G, Rappuoli R: Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: operon structure and gene duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, 83(13):4631-4635.
70. Glaser P, Sakamoto H, Bellalou J, Ullmann A, Danchin A: Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO J* 1988, 7(12):3997-4004.
71. Welch RA: Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* 1991, 5(3):521-528.
72. Cowell JL, Hewlett EL, Manclark CR: Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1979, 25(3):896-901.
73. Fukui A, Horiguchi Y: *Bordetella* dermonecrotic toxin exerting toxicity through activation of the small GTPase Rho. *J Biochem* 2004, 136(4):415-419.

74. Bassinet L, Gueirard P, Maitre B, Housset B, Gounon P, Guiso N: Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 2000, 68(4):1934-1941.
75. Cookson BT, Tyler AN, Goldman WE: Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Biochemistry* 1989, 28(4):1744-1749.
76. Flak TA, Goldman WE: Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell Microbiol* 1999, 1(1):51-60.
77. Preston A, Thomas R, Maskell DJ: Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* wlb LPS biosynthesis locus. *Microb Pathog* 2002, 33(3):91-95.
78. Schaeffer LM, McCormack FX, Wu H, Weiss AA: *Bordetella pertussis* lipopolysaccharide resists the bactericidal effects of pulmonary surfactant protein A. *J Immunol* 2004, 173(3):1959-1965.
79. Watanabe M, Takimoto H, Kumazawa Y, Amano K: Biological properties of lipopolysaccharides from *Bordetella* species. *J Gen Microbiol* 1990, 136(3):489-493.
80. French CT, Panina EM, Yeh SH, Griffith N, Arambula DG, Miller JF: The *Bordetella* type III secretion system effector BteA contains a conserved N-terminal motif that guides bacterial virulence factors to lipid rafts. *Cell Microbiol* 2009, 11(12):1735-1749.
81. Gaillard ME, Bottero D, Castuma CE, Basile LA, Hozbor D: Laboratory adaptation of *Bordetella pertussis* is associated with the loss of type three secretion system functionality. *Infect Immun* 2011, 79(9):3677-3682.
82. Kuwae A, Matsuzawa T, Ishikawa N, Abe H, Nonaka T, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Abe A: BopC is a novel type III effector secreted by *Bordetella bronchiseptica* and has a critical role in type III-dependent necrotic cell death. *J Biol Chem* 2006, 281(10):6589-6600.
83. Mattoo S, Yuk MH, Huang LL, Miller JF: Regulation of type III secretion in *Bordetella*. *Mol Microbiol* 2004, 52(4):1201-1214.
84. Yuk MH, Harvill ET, Cotter PA, Miller JF: Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation by the *Bordetella* type III secretion system. *Mol Microbiol* 2000, 35(5):991-1004.
85. Ratledge C, Dover LG: Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2000, 54:881-941.
86. Brickman TJ, Armstrong SK: Temporal signaling and differential expression of *Bordetella* iron transport systems: the role of ferrimones and positive regulators. *Biometals* 2009, 22(1):33-41.
87. Beall B, Sanden GN: A *Bordetella pertussis* *fepA* homologue required for utilization of exogenous ferric enterobactin. *Microbiology* 1995, 141 ( Pt 12):3193-3205.
88. Moore CH, Foster LA, Gerbig DG, Jr., Dyer DW, Gibson BW: Identification of alcaligin as the siderophore produced by *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *J Bacteriol* 1995, 177(4):1116-1118.
89. Vanderpool CK, Armstrong SK: The *Bordetella* *bhu* locus is required for heme iron utilization. *J Bacteriol* 2001, 183(14):4278-4287.
90. Beall BW, Sanden GN: Cloning and initial characterization of the *Bordetella pertussis* *fur* gene. *Curr Microbiol* 1995, 30(4):223-226.
91. Brickman TJ, Hanawa T, Anderson MT, Suhadolc RJ, Armstrong SK: Differential expression of *Bordetella pertussis* iron transport system genes during infection. *Mol Microbiol* 2008, 70(1):3-14.
92. Agranoff D, Krishna S: Metal ion transport and regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Biosci* 2004, 9:2996-3006.

93. Papp-Wallace KM, Maguire ME: Manganese transport and the role of manganese in virulence. *Annu Rev Microbiol* 2006, 60:187-209.
94. Lacey BW: Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. *J Hyg (Lond)* 1960, 58:57-93.
95. Leslie PH, Gardner AD: The Phases of *Haemophilus pertussis*. *J Hyg (Lond)* 1931, 31(3):423-434.
96. Boucher PE, Stibitz S: Synergistic binding of RNA polymerase and BvgA phosphate to the pertussis toxin promoter of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 1995, 177(22):6486-6491.
97. Stibitz S, Yang MS: Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the vir locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 1991, 173(14):4288-4296.
98. Uhl MA, Miller JF: Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J* 1996, 15(5):1028-1036.
99. Uhl MA, Miller JF: Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91(3):1163-1167.
100. Cummings CA, Bootsma HJ, Relman DA, Miller JF: Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by *Bordetella* BvgAS. *J Bacteriol* 2006, 188(5):1775-1785.
101. Scarlato V, Arico B, Prugnola A, Rappuoli R: Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J* 1991, 10(12):3971-3975.
102. Veal-Carr WL, Stibitz S: Demonstration of differential virulence gene promoter activation in vivo in *Bordetella pertussis* using RIVET. *Mol Microbiol* 2005, 55(3):788-798.
103. Kinnear SM, Boucher PE, Stibitz S, Carbonetti NH: Analysis of BvgA activation of the pertactin gene promoter in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 1999, 181(17):5234-5241.
104. Roy CR, Miller JF, Falkow S: Autogenous regulation of the *Bordetella pertussis* *bvgABC* operon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, 87(10):3763-3767.
105. Zu T, Manetti R, Rappuoli R, Scarlato V: Differential binding of BvgA to two classes of virulence genes of *Bordetella pertussis* directs promoter selectivity by RNA polymerase. *Mol Microbiol* 1996, 21(3):557-565.
106. Melton AR, Weiss AA: Characterization of environmental regulators of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1993, 61(3):807-815.
107. Cotter PA, Miller JF: BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect Immun* 1994, 62(8):3381-3390.
108. Cotter PA, Miller JF: A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* *bvgS* gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens. *Mol Microbiol* 1997, 24(4):671-685.
109. Porter JF, Parton R, Wardlaw AC: Growth and survival of *Bordetella bronchiseptica* in natural waters and in buffered saline without added nutrients. *Appl Environ Microbiol* 1991, 57(4):1202-1206.
110. Vergara-Irigaray N, Chavarri-Martinez A, Rodriguez-Cuesta J, Miller JF, Cotter PA, Martinez de Tejada G: Evaluation of the role of the Bvg intermediate phase in *Bordetella pertussis* during experimental respiratory infection. *Infect Immun* 2005, 73(2):748-760.
111. Relman DA, Domenighini M, Tuomanen E, Rappuoli R, Falkow S: Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, 86(8):2637-2641.



112. van den Akker WM: The filamentous hemagglutinin of *Bordetella parapertussis* is the major adhesin in the phase-dependent interaction with NCI-H292 human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 252(1):128-133.
113. Luker KE, Tyler AN, Marshall GR, Goldman WE: Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in pertussis. *Mol Microbiol* 1995, 16(4):733-743.
114. Hewlett EL, Kim KJ, Lee SJ, Gray MC: Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: current concepts and problems in the study of toxin functions. *Int J Med Microbiol* 2000, 290(4-5):333-335.
115. Munoz JJ, Peacock MG: Action of pertussigen (pertussis toxin) on serum IgE and on Fc epsilon receptors on lymphocytes. *Cell Immunol* 1990, 127(2):327-336.
116. de Jong MF, Nielsen JP: Definition of progressive atrophic rhinitis. *Vet Rec* 1990, 126(4):93.
117. Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Mishra M, Deora R: The *Bordetella* Bps polysaccharide is critical for biofilm development in the mouse respiratory tract. *J Bacteriol* 2007, 189(22):8270-8276.
118. Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovics ML, Harvill ET, Rodriguez ME: Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun* 2010, 78(3):907-913.
119. Lamberti Y, Perez Vidakovics ML, van der Pol LW, Rodriguez ME: Cholesterol-rich domains are involved in *Bordetella pertussis* phagocytosis and intracellular survival in neutrophils. *Microb Pathog* 2008, 44(6):501-511.
120. Lamberti Y, Alvarez Hayes J, Perez Vidakovics ML, Rodriguez ME: Cholesterol-dependent attachment of human respiratory cells by *Bordetella pertussis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009, 56(2):143-150.
121. Mishra M, Parise G, Jackson KD, Wozniak DJ, Deora R: The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*. *J Bacteriol* 2005, 187(4):1474-1484.
122. Parise G, Mishra M, Itoh Y, Romeo T, Deora R: Role of a putative polysaccharide locus in *Bordetella* biofilm development. *J Bacteriol* 2007, 189(3):750-760.
123. Serra D, Bosch A, Russo DM, Rodriguez ME, Zorreguieta A, Schmitt J, Naumann D, Yantorno O: Continuous nondestructive monitoring of *Bordetella pertussis* biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy and other corroborative techniques. *Anal Bioanal Chem* 2007, 387(5):1759-1767.
124. Irie Y, Mattoo S, Yuk MH: The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol* 2004, 186(17):5692-5698.
125. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ: Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987, 41:435-464.
126. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999, 284(5418):1318-1322.
127. Donlan RM, Costerton JW: Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002, 15(2):167-193.
128. Donlan RM: Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002, 8(9):881-890.
129. Lenz AP, Williamson KS, Pitts B, Stewart PS, Franklin MJ: Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74(14):4463-4471.
130. Monds RD, O'Toole GA: The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol* 2009, 17(2):73-87.

131. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R: Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000, 54:49-79.
132. Parsek MR, Singh PK: Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 2003, 57:677-701.
133. Pratt LA, Kolter R: Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 1998, 30(2):285-293.
134. Prigent-Combaret C, Brombacher E, Vidal O, Ambert A, Lejeune P, Landini P, Dorel C: Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J Bacteriol* 2001, 183(24):7213-7223.
135. Flemming HC, Wingender J: The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010, 8(9):623-633.
136. Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R: A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol* 2006, 59(4):1229-1238.
137. Diggle SP, Stacey RE, Dodd C, Camara M, Williams P, Winzer K: The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 2006, 8(6):1095-1104.
138. Tielker D, Hacker S, Loris R, Strathmann M, Wingender J, Wilhelm S, Rosenau F, Jaeger KE: *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* 2005, 151(Pt 5):1313-1323.
139. Cegelski L, Pinkner JS, Hammer ND, Cusumano CK, Hung CS, Chorell E, Aberg V, Walker JN, Seed PC, Almqvist F *et al*: Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nat Chem Biol* 2009, 5(12):913-919.
140. Zogaj X, Nitz M, Rohde M, Bokranz W, Romling U: The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* 2001, 39(6):1452-1463.
141. Guiton PS, Hung CS, Kline KA, Roth R, Kau AL, Hayes E, Heuser J, Dodson KW, Caparon MG, Hultgren SJ: Contribution of autolysin and Sortase a during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development. *Infect Immun* 2009, 77(9):3626-3638.
142. Qin Z, Ou Y, Yang L, Zhu Y, Tolker-Nielsen T, Molin S, Qu D: Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 2007, 153(Pt 7):2083-2092.
143. Thomas VC, Thurlow LR, Boyle D, Hancock LE: Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. *J Bacteriol* 2008, 190(16):5690-5698.
144. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS: Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 2002, 295(5559):1487.
145. Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG: Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol* 2010, 192(12):3024-3032.
146. Jefferson KK, Goldmann DA, Pier GB: Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49(6):2467-2473.
147. Walters MC, 3rd, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS: Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47(1):317-323.
148. Domka J, Lee J, Bansal T, Wood TK: Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ Microbiol* 2007, 9(2):332-346.

149. Lewis K: Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)* 2005, 70(2):267-274.
150. Lewis K: Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008, 322:107-131.
151. Cerca N, Oliveira R, Azeredo J: Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* planktonic cells and biofilms to the lytic action of staphylococcus bacteriophage K. *Lett Appl Microbiol* 2007, 45(3):313-317.
152. Cerca N, Jefferson KK, Oliveira R, Pier GB, Azeredo J: Comparative antibody-mediated phagocytosis of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a biofilm or in the planktonic state. *Infect Immun* 2006, 74(8):4849-4855.
153. Jesaitis AJ, Franklin MJ, Berglund D, Sasaki M, Lord CI, Bleazard JB, Duffy JE, Beyenal H, Lewandowski Z: Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J Immunol* 2003, 171(8):4329-4339.
154. Leid JG, Willson CJ, Shirtliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK: The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J Immunol* 2005, 175(11):7512-7518.
155. Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR, Otto M: A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* 2004, 279(52):54881-54886.
156. Govan JR, Deretic V: Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996, 60(3):539-574.
157. Koch C, Hoiby N: Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* 1993, 341(8852):1065-1069.
158. Foxman B: The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol* 2010, 7(12):653-660.
159. Kuramitsu HK, Wang BY: The whole is greater than the sum of its parts: dental plaque bacterial interactions can affect the virulence properties of cariogenic *Streptococcus mutans*. *Am J Dent* 2011, 24(3):153-154.
160. Ferrieres L, Hancock V, Klemm P: Specific selection for virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains during catheter-associated biofilm formation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007, 51(1):212-219.
161. Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HL, Shirtliff ME: Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev* 2008, 21(1):26-59.
162. Beloin C, Houry A, Froment M, Ghigo JM, Henry N: A short-time scale colloidal system reveals early bacterial adhesion dynamics. *PLoS Biol* 2008, 6(7):e167.
163. Klausen M, Aaes-Jorgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T: Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* 2003, 50(1):61-68.
164. Lemon KP, Higgins DE, Kolter R: Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J Bacteriol* 2007, 189(12):4418-4424.
165. O'Toole GA, Kolter R: Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 1998, 30(2):295-304.
166. Toutain CM, Caizza NC, Zegans ME, O'Toole GA: Roles for flagellar stators in biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol* 2007, 158(5):471-477.
167. Watnick PI, Kolter R: Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol* 1999, 34(3):586-595.

168. Banin E, Vasil ML, Greenberg EP: Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(31):11076-11081.
169. Dunne WM, Jr.: Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 2002, 15(2):155-166.
170. Wu Y, Outten FW: IscR controls iron-dependent biofilm formation in *Escherichia coli* by regulating type I fimbria expression. *J Bacteriol* 2009, 191(4):1248-1257.
171. Davey ME, O'Toole G A: Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000, 64(4):847-867.
172. Sutherland I: Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 2001, 147(Pt 1):3-9.
173. Hall-Stoodley L, Stoodley P: Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr Opin Biotechnol* 2002, 13(3):228-233.
174. Davies DG, Chakrabarty AM, Geesey GG: Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 1993, 59(4):1181-1186.
175. Solano C, Garcia B, Valle J, Berasain C, Ghigo JM, Gamazo C, Lasa I: Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol* 2002, 43(3):793-808.
176. Maira-Litran T, Kropec A, Abeygunawardana C, Joyce J, Mark G, 3rd, Goldmann DA, Pier GB: Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun* 2002, 70(8):4433-4440.
177. Stewart PS: Diffusion in biofilms. *J Bacteriol* 2003, 185(5):1485-1491.
178. Stewart PS, Costerton JW: Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001, 358(9276):135-138.
179. Hong SH, Lee J, Wood TK: Engineering global regulator Hha of *Escherichia coli* to control biofilm dispersal. *Microb Biotechnol* 2010, 3(6):717-728.
180. Karatan E, Watnick P: Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009, 73(2):310-347.
181. Rowe MC, Withers HL, Swift S: Uropathogenic *Escherichia coli* forms biofilm aggregates under iron restriction that disperse upon the supply of iron. *FEMS Microbiol Lett* 2010, 307(1):102-109.
182. Sauer K, Cullen MC, Rickard AH, Zeef LA, Davies DG, Gilbert P: Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol* 2004, 186(21):7312-7326.
183. Kirilenko NI: Survival of *Bordetella pertussis* in the air and on some objects. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1965, 42(5):39-42.
184. Kramer A, Schwebke I, Kampf G: How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 2006, 6:130.
185. Cotter PA, Stibitz S: c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr Opin Microbiol* 2007, 10(1):17-23.
186. Hengge R: Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2009, 7(4):263-273.
187. Sisti F, Ha DG, O'Toole GA, Hozbor D, Fernandez J: Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology* 2013, 159(Pt 5):869-879.
188. Sugisaki K, Hanawa T, Yonezawa H, Osaki T, Fukutomi T, Kawakami H, Yamamoto T, Kamiya S: Role of (p)ppGpp in biofilm formation and expression of filamentous structures in *Bordetella pertussis*. *Microbiology* 2013, 159(Pt 7):1379-1389.

- 
189. Serra DO, Conover MS, Arnal L, Sloan GP, Rodriguez ME, Yantorno OM, Deora R: FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One* 2011, 6(12):e28811.
  190. Zaretzky FR, Gray MC, Hewlett EL: Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of *Bordetella pertussis*: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction. *Mol Microbiol* 2002, 45(6):1589-1598.
  191. Conover MS, Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Deora R: The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Mol Microbiol* 2010, 77(6):1439-1455.
  192. Conover MS, Mishra M, Deora R: Extracellular DNA is essential for maintaining *Bordetella* biofilm integrity on abiotic surfaces and in the upper respiratory tract of mice. *PLoS One* 2011, 6(2):e16861.
  193. Mooi FR: *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol* 2010, 10(1):36-49.
  194. Litt DJ, Neal SE, Fry NK: Changes in genetic diversity of the *Bordetella pertussis* population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type. *J Clin Microbiol* 2009, 47(3):680-688.
  195. Serra DO, Lucking G, Weiland F, Schulz S, Gorg A, Yantorno OM, Ehling-Schulz M: Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. *Proteomics* 2008, 8(23-24):4995-5010.



## **Capítulo 2**

**Estudio de la diversidad fenotípica entre aislados clínicos de *B. pertussis* y caracterización del crecimiento planctónico**





---

## 2.1. Introducción

Las condiciones de cultivo bacteriano *in vitro* son marcadamente diferentes de aquellas que ocurren en los ecosistemas naturales donde se desarrollan los microorganismos. Así, el crecimiento que se observaría dentro de comunidades microbianas multiespecies en los ambientes complejos y cambiantes del "mundo real" se contrasta con las condiciones estandarizadas e idealizadas de los monocultivos realizados en el laboratorio. A pesar de estas diferencias, las investigaciones en microbiología se han basado principalmente en el estudio de cepas de referencia adaptadas al laboratorio, como lo han sido *E. coli* K12 o *P. aeruginosa* PAO1, las cuales han sido sub-cultivadas durante décadas desde su primer aislamiento. La plasticidad de los genomas bacterianos, es decir, la diversidad en el tamaño de los genomas dentro de una misma especie, ha mostrado un nuevo aspecto en el estudio de la patogénesis bacteriana utilizando cepas de referencia adaptadas al laboratorio [1]. A lo largo de pasajes secuenciales *in vitro*, las cepas de referencia se pueden diferenciar significativamente de las muestras clínicas. Así, por ejemplo, pasajes secuenciales en cultivos planctónicos podrían ser particularmente perjudiciales para las poblaciones formadoras de *biofilm*. Como resultado, genes que controlan las interacciones espaciales y metabólicas dentro de los *biofilms* podrían perderse. Es así como se han observado que cepas de referencia de laboratorio muestran un nivel de formación de *biofilm* menor cuando se lo compara con el correspondiente a cepas clínicas de la misma especie [1].

Sumado al uso intensivo de la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I para el estudio de la patogénesis de *B. pertussis* y producción de vacunas, esta bacteria ha sido blanco de una presión de selección inducida por vacunación desde los años 40 y 50, con el primer uso de las vacunas celulares y luego por el uso de vacunas acelulares introducidas en los años 90. Ha sido demostrado que *B. pertussis* es un patógeno altamente monomórfico en su genoma, pero que ha sido capaz de crear diversidad genética dentro de su repertorio fijo de genes. Por medio del uso de la electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE), se ha hallado que la población de *B. pertussis* ha cambiado globalmente desde una población compuesta por aislados del tipo vacunal a una población dominada por aislados del tipo no-vacunal [2-5]. Estudios genotípicos en regiones de interés del genoma de *B. pertussis* mostraron variantes en la región promotora *ptx*, en la subunidad PTxA, en *Prn*, en *fim2* y *fim3*, y que ciertas regiones genómicas, comprometiendo principalmente genes codificantes de rutas metabólicas

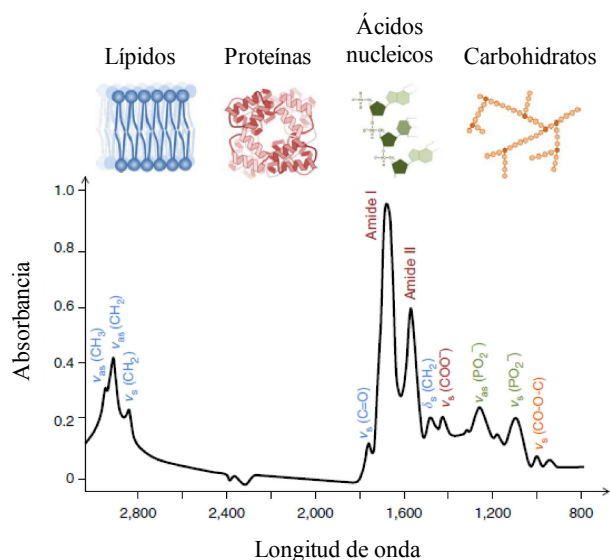
secundarias, habían desaparecido en aislamientos del tipo post-vacunal [6]. Estos hallazgos han sido confirmados en un reciente artículo, en el cual 343 cepas clínicas aisladas en distintas regiones del mundo fueron genéticamente analizadas, incluyendo cepas pre y post vacunación [7]. Asimismo, se ha considerado que el uso de vacunas acelulares podría llevar a un incremento en el número de aislados que carezcan de la producción de los antígenos presentes en estas vacunas. Esto ya ha ocurrido en el caso de Prn, presente en las formulaciones tri y pentavalentes de las vacunas acelulares. En los últimos años, aislamientos defectivos en Prn han sido reportados de manera creciente, alcanzando por ejemplo, en algunas regiones de Estados Unidos, el 80% de los aislamientos colectados entre 2012 y 2013 [8]. En consecuencia, se ha demostrado que la cepa de referencia Bp Tohama I ya no es más representativa de los aislamientos circulantes luego de la introducción masiva de las vacunas contra pertussis [7].

En este Capítulo, en primera instancia, se presentan los resultados del análisis de un conjunto de 16 aislados clínicos mediante la técnica de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR). Todas las cepas fueron estudiadas con el objetivo de establecer si existía diversidad fenotípica dentro de los aislamientos en comparación con la cepa de referencia Bp Tohama I, tanto en condición de cultivo en medio sólido, como en condición de crecimiento en *biofilm*. A su vez, en este capítulo analizamos las características del crecimiento planctónico de 5 aislamientos clínicos, en comparación a la cepa de referencia Bp Tohama I. Se estudió la cinética de crecimiento de dichos aislados, la producción total de biomasa, el consumo de glutamato y el rendimiento resultante en biomasa para cada una de las cepas.

La región infrarroja (IR) del espectro electromagnético ( $10\text{-}14000\text{ cm}^{-1}$ ) se divide en tres regiones: la región infrarroja cercana, la intermedia y la lejana. La región IR intermedia ( $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ) es la más utilizada para análisis químicos, debido a que todas las moléculas poseen frecuencias de absorción características y vibraciones moleculares en este rango. Los métodos espectroscópicos que utilizan la región IR intermedia se basan en el estudio de la interacción de la radiación infrarroja con las muestras en análisis. Cuando la radiación IR atraviesa una muestra, longitudes de onda específicas son absorbidas, causando que los enlaces químicos en el material sufran vibraciones como estrechamientos, contracciones y balanceos. Los grupos funcionales presentes en una molécula tienden a absorber radiación IR en el mismo rango de longitud de onda a pesar de otras estructuras en la molécula, y los picos espectrales son

derivados de la absorción de energía vibracional en los enlaces atómicos. De este modo, existe una relación entre las posiciones de los picos en un espectro IR y la estructura química de las moléculas. Además de información cualitativa, un espectro IR puede proveer información cuantitativa de componentes presentes en una muestra [9, 10].

La espectroscopía infrarroja es un excelente método de análisis de muestras biológicas, ya que permite obtener información bioquímica de las muestras de una forma que no perturba a las mismas y no requiere marcación de ningún tipo. Cuando se analiza una muestra biológica, como células bacterianas, por medio de la técnica FT-IR, se obtiene un espectro complejo, con amplios picos debido a la superposición de las contribuciones de todas las biomoléculas presentes en una bacteria (**Figura 1**). En un espectro derivado de una muestra biológica observamos cinco regiones principales de absorción: la región espectral de  $3000-2800\text{ cm}^{-1}$  es la región de los lípidos; la región de  $1700-1500\text{ cm}^{-1}$  contiene las bandas amida I y amida II de proteínas y péptidos;  $1500-1200\text{ cm}^{-1}$  es una región mixta de ácidos grasos, proteínas y compuestos con grupos fosfatos;  $1200-900\text{ cm}^{-1}$  contiene las bandas de absorción de carbohidratos; y  $900-700\text{ cm}^{-1}$  es la región denominada *fingerprint* que contienen picos de absorción débiles pero únicos que son característicos de cada bacteria, y que permite la identificación de microorganismos a nivel de cepas [11].



**Figura 1.** Espectro característico de una muestra biológica mostrando la asignación molecular de los picos de absorción en la región espectral  $3000-800\text{ cm}^{-1}$ , donde  $\nu$ =vibraciones de estiramiento,  $\delta$ = vibraciones de balanceo,  $s$ =vibraciones simétricas y  $as$ =vibraciones asimétricas.

Una vez obtenido el espectro IR de una muestra, se pueden realizar varias modificaciones para mejorar la apariencia y las características espectrales a modo de facilitar la interpretación y análisis de los mismos. Una de las modificaciones más útiles son las transformaciones derivadas. Las derivadas primera y segunda de los espectros reducen la variabilidad, corrigen desviaciones de la línea de base, resuelven picos superpuestos y amplifican las variaciones espectrales [9]. La transformación derivada primera de un espectro IR se utiliza generalmente para la clasificación taxonómica de las bacterias [12, 13]. Las derivadas segundas incrementan el número de características discriminativas incrementando la resolución espectral [9]. Otra de las herramientas que se pueden aplicar a los espectros IR es el Análisis Jerárquico de Clústers (HCA). Este análisis permite identificar similitudes entre los espectros de distintas muestras, de distintos microorganismos por ejemplo, utilizando las distancias entre espectros y algoritmos de agregación. A partir del análisis de clústers se obtiene un dendrograma, un diagrama de árbol utilizado para ilustrar la organización de los clústers producidos por el análisis. El eje vertical izquierdo de un dendrograma muestra la varianza o heterogeneidad creciente. La magnitud de esta heterogeneidad depende del número de espectros en un clúster y de las similitudes entre ellos. El HCA y los dendrogramas son usados para mostrar las similitudes entre los espectros de bacterias que representan la misma especie, género, serotipos o haplotipos [12, 13].

En nuestro grupo de trabajo se tenía una interesante experiencia en el empleo de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) para la discriminación, mediante el estudio de la composición bioquímica, entre organismos pertenecientes a una misma especie. Por lo tanto en base a este antecedente decidimos aplicar esta metodología fisicoquímica como una primera herramienta para el estudio de la diferenciación entre una cepa de referencia y aislados clínicos de *B. pertussis*.

## 2.2. Objetivos

Los objetivos específicos planteados para esta etapa del trabajo fueron:

- 1 - Analizar empleando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) si existen diferencias fenotípicas globales entre la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I y aislados clínicos recuperados de pacientes con tos convulsa tratados en el Hospital de Niños de La Plata “Sor María Ludovica”.
- 2 - Estudiar mediante FT-IR las características bioquímicas de los *biofilms* formados por la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I y 16 aislados clínicos.
- 3 - Estudiar comparativamente con la cepa de referencia el comportamiento de los aislados clínicos bajo crecimiento planctónico, y en cuanto a su adhesión y formación de *biofilm* sobre superficies abióticas.



## 2.3. Materiales y métodos

### 2.3.1. Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas en este Capítulo se detallan en la **Tabla 1**. Las cepas de *B. pertussis* fueron cultivadas en placas de ágar Bordet-Gengou (ABG) suplementadas con 10% v v<sup>-1</sup> de sangre desfibrinada de carnero. Los cultivos líquidos planctónicos y en *biofilm* de *B. pertussis* fueron realizados en el medio sintético Stainer-Scholte (SS) con o sin el agregado de (2,6-bi-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrina (Heptakis) en una concentración final de 0,1 mg mL<sup>-1</sup> y de 10 g L<sup>-1</sup> de casaminoácidos. El medio de cultivo SS está compuesto por los siguientes componentes (en g L<sup>-1</sup>) esterilizables por calor: Glutamato monosódico 10,70; L-Prolina 0,24; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5; KCl 0,20; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,20; CaCl<sub>2</sub> 0,2; Tris-HCl 1,52; NaCl 2,50; y por otros componentes que son esterilizables por filtración, SO<sub>4</sub>Fe.4.H<sub>2</sub>O 10 mg L<sup>-1</sup>; L-cistina 40 mg L<sup>-1</sup>; HCl concentrado 0,1 mL L<sup>-1</sup>; ácido ascórbico 20 mg L<sup>-1</sup>; ácido nicotínico 4 mg L<sup>-1</sup> y L-glutatió n reducido 100 mg L<sup>-1</sup>. En todos los casos los cultivos de las cepas se realizaron a 37°C. En el caso particular de los cultivos en medio líquido, los mismos fueron incubados en agitación (160 rpm).

### 2.3.2. Ensayo de formación de *biofilm* en placas multipocillo

Para el caso de las cepas de *B. pertussis*, el procedimiento incluyó la preparación en medio SS base de una suspensión bacteriana, a partir de un cultivo de 24 h, de una densidad óptica (DO<sub>650</sub>) igual a 1. Placas de 96 pocillos de fondo plano (NUNC, EE.UU.) fueron inoculadas con 100  $\mu$ L de la suspensión e incubadas durante 4 h a 37°C sin agitación. Luego de esta etapa de adhesión, se retiró cuidadosamente la suspensión de bacterias y se agregó medio fresco, comenzando inmediatamente la incubación en agitación moderada (100 rpm), durante diferentes períodos de tiempo. En los casos en que las placas fueron incubadas por periodos mayores a 24 h, el medio de cultivo fue removido y reemplazado por medio fresco periódicamente cada 24 h. Al finalizar cada etapa de cultivo, la suspensión de bacterias presente en cada pocillo fue cuidadosamente removida y transferida a otro pocillo en una nueva placa a fin de realizar una lectura de la DO<sub>650</sub>. La biomasa adherida en los pocillos fue evaluada utilizando el método de cristal violeta (CV). Para cada cepa el ensayo fue repetido de manera independiente al menos en 3 oportunidades incluyendo 6 replicados por ensayo.

### 2.3.3. Cuantificación de la formación de *biofilm* por tinción con cristal violeta

La cuantificación de la biomasa adherida a la superficie de los pocillos de las placas multipocillo se realizó utilizando el método de tinción con cristal violeta (CV), previamente descrito por O'Toole y Kolter [14] con ciertas modificaciones. Brevemente, la biomasa adherida en el fondo y a la pared de cada pocillo fue cuidadosamente lavada dos veces con PBS. Las bacterias fueron teñidas agregando a cada pocillo 200  $\mu$ L de una solución de CV 0,1% (p v<sup>-1</sup>). Luego de 15 min de incubación con el colorante, el mismo fue removido de cada pocillo. El excedente de colorante fue eliminado mediante dos lavados con agua destilada. Posteriormente, se agregó a cada pocillo 200  $\mu$ L de etanol 96%. Esta solución remueve el colorante retenido por la biomasa. La solución resultante de cada pocillo fue transferida a una nueva placa. Finalmente, se realizó la lectura de la absorbancia a 590 nm (A590) de cada solución.

**Tabla 1.** Cepas utilizadas en este estudio.

Cepa*	Año de aislamiento	Tipo de factor de virulencia		
		Prn	PTxA	Fim
Bp Tohama I	1954	1	2	2
Bp953	2001	2	1	3
Bp955	2001	2	1	3
Bp2723	2001	1	1	3
Bp2770	2001	1	1	3
Bp1938	2003	2	1	3
Bp2930	2004	2	1	3
Bp3495	2004	2	1	3
Bp2751	2004	2	1	3
Bp2524	2004	2	1	3
Bp7470	2005	2	1	3
Bp162	2006	2	1	3
Bp462	2006	2	1	3
Bp849	2007	2	1	3
Bp892	2007	2	1	3
Bp479	2007	2	1	3
Bp612	2008	2	1	3

\* Los aislados clínicos de Argentina fueron provistos por la Sala de Microbiología del Hospital de Niños "Sor María Ludovica" de la ciudad de La Plata



### 2.3.4. Preparación de muestras para el análisis por FT-IR

Se prepararon dos tipos de muestras, a partir de bacterias colectadas de medio sólido ABG y de cultivos en *biofilms*. En el primer caso, los 16 aislados clínicos en estudio junto con la cepa *B. pertussis* Tohama I fueron crecidos en ABG durante 72 h a 37°C a partir de stocks conservados a -20°C, y luego repicadas nuevamente en medio ABG y cultivadas por 48 h a 37°C. A dicho tiempo, se tomaron colonias individuales que fueron resuspendidas en H<sub>2</sub>O bidestilada obteniendo una suspensión de una DO<sub>650</sub> de un valor aproximado a 10. Para las muestras de cultivo en *biofilm*, cada cepa fue cultivada en placas de 6 pocillos, de modo análogo al descrito previamente para placas de 96 pocillos. *Biofilms* de 72 h fueron lavados tres veces con H<sub>2</sub>O bidestilada y la biomasa adherida a los pocillos fue resuspendida en H<sub>2</sub>O bidestilada, ajustando nuevamente la DO<sub>650</sub> a un valor de 10. En todos los casos las muestras fueron preparadas a partir de tres ensayos independientes por triplicado en cada caso. Cien µL de cada suspensión de bacterias fueron transferidos a una celda óptica de seleniuro de cinc (ZnSe) y secados por vacío (3-6 kPa) hasta obtener películas transparentes sobre cada celda.

### 2.3.5. Medidas por FT-IR y análisis de espectros

El análisis por espectroscopía infrarroja se llevó a cabo utilizando un espectrómetro *Spectrum One* (Perkin Elmer Instruments, USA). Las lecturas se hicieron bajo una purga continua de aire seco a fin de evitar interferencias debido al vapor de agua. Se adquirieron espectros de absorción/transmitancia (A/T) mediante el promedio de 64 escaneos, con una resolución de 6 cm<sup>-1</sup>, en el intervalo de absorción de 4000 a 650 cm<sup>-1</sup>. Todos los espectros adquiridos fueron sometidos a una prueba de calidad espectral, en la que se analizó que los siguientes parámetros fueran adecuados: intensidad de señal, ruido, relación señal/ruido, vapor de agua, relación señal/vapor de agua. Aquellos espectros que pasaron el test de calidad fueron utilizados en estudios posteriores. Se realizó como pretratamiento la corrección de la línea de base y la normalización vectorial en todo el rango de número de onda indicado tanto de los espectros como de las derivadas primeras y segundas. El análisis de los espectros se realizó mediante los software Spectrum 3.0 (Perkin-Elmer, USA) y OPUS 4.1 (Bruker Optics, USA).

Para cada conjunto de espectros replicados provenientes de muestras obtenidas de la misma cepa se realizó un análisis de la reproducibilidad espectral. Para ello, se

llevó a cabo un HCA utilizando las derivadas primeras vectorialmente normalizadas de los espectros IR replicados. Se utilizó como correlación la función *Normal to replevel* y se aplicó el algoritmo de promedios ponderados (*Average Linkage*), utilizando las ventanas espectrales correspondientes a lípidos, zona mixta, y carbohidratos. Dicho análisis permitió obtener un dendrograma mostrando cada replicado, que permitió hallar la reproducibilidad o varianza de cada muestra. El nivel de reproducibilidad se obtuvo con el valor de la Distancia espectral (D), donde a menor valor de D, mayor reproducibilidad entre replicados.

Los análisis de diversidad fenotípica entre aislados clínicos y la cepa de referencia Tohama I, en sus diferentes condiciones de cultivo, fueron realizados mediante HCA utilizando los algoritmos *Average linkage* y *Scaling to first range*. En todos los casos se emplearon tres ventanas espectrales correspondientes a la absorción de grupos químicos de lípidos, carbohidratos y la llamada zona mixta.

### **2.3.6. Caracterización del crecimiento planctónico**

Cultivos líquidos en medio SS de las diferentes cepas de *B. pertussis* fueron llevados a cabo en frascos Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 100 mL de medio SS, ajustando la DO<sub>650</sub> a 0,2. Los cultivos fueron incubados a 37°C y 160 rpm. Alícuotas del cultivo fueron tomadas a diferentes intervalos de tiempo y cuantificada su DO<sub>650</sub>. A partir de dichos valores, se construyeron las respectivas curvas de crecimiento para cada cepa.

### **2.3.7. Determinación del consumo de glutamato, biomasa total producida y rendimiento de biomasa con respecto al sustrato**

Se determinó la cantidad total de glutamato consumido y de biomasa total producida en cultivos líquidos de las cepas Bp Tohama I, Bp462, Bp892, Bp955, Bp2723 y Bp2751. Para ello, frascos Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 60 mL de medio SS fueron inoculados con la cepa correspondiente, de modo de obtener una DO<sub>650</sub> inicial de 0,2 e incubados durante 24 h en agitación y a 37°C. A tiempo inicial, 0 h, y tiempo final, 24 h, se tomaron alícuotas de 10 mL con pipeta de doble aforo. Las muestras fueron centrifugadas a 8.000 rpm durante 20 min. El sobrenadante fue conservado para la determinación de glutamato mediante el kit enzimático correspondiente (*GLN-1 Glutamine and glutamate determination kit*, Sigma Aldrich, USA). Por otro lado, el pellet obtenido de los 10 mL de muestra fue lavado dos veces

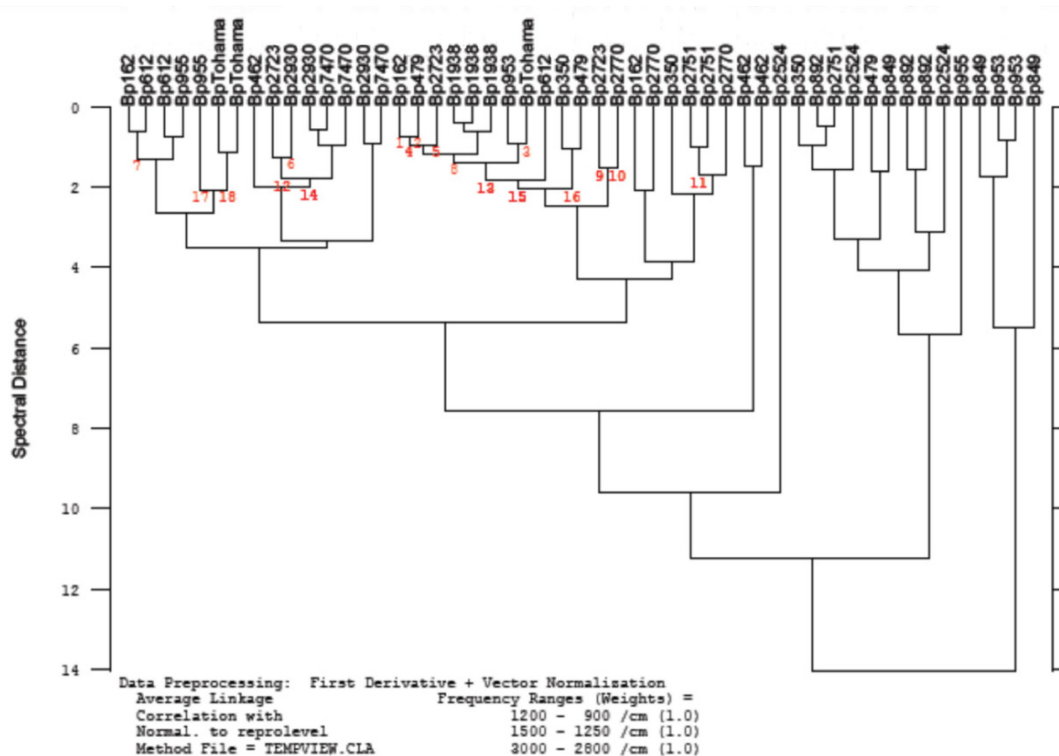
mediante su resuspensión en agua destilada y centrifugación a 8.000 rpm por 20 min. Finalmente, el pellet fue suspendido en un pequeño volumen de agua destilada y la suspensión fue colocada en pesafiltros previamente pesados para determinar su peso seco, luego de ser secados en estufa a 100°C. La determinación del rendimiento en biomasa se realiza por medio de la relación entre la biomasa total producida y el sustrato total consumido ambos expresados en g L<sup>-1</sup>.



## 2.4. Resultados

### 2.4.1. Caracterización fenotípica de aislamientos clínicos de *B. pertussis* mediante espectroscopía infrarroja

Con el fin de determinar si existen diferencias fenotípicas globales dentro de una población de 16 cepas de *B. pertussis* (correspondientes a aislamientos clínicos recuperados en el período 2001-2008 en Argentina, y la cepa de referencia Bp Tohama I), se recurrió a la técnica FT-IR. Esta técnica permite obtener un espectro que representa la composición química macromolecular de la muestra en estudio al momento de ser analizada. En primera instancia recurrimos a la obtención de espectros resultantes de bacterias cultivadas en medio sólido. Este tipo de análisis se encuentra estandarizado, siendo incluso utilizado para la diferenciación de géneros bacterianos. De este modo, se estudiaron los espectros obtenidos de bacterias crecidas por 48 h en placas ABG. Los espectros fueron luego procesados para obtener sus derivadas primeras mediante el empleo del software Opus de Bruker. Se buscó posteriormente llevar a cabo un Análisis jerárquico de clústers el cual nos permite obtener rápidamente información sobre la similitud de los espectros en estudio. Se realizó en primer lugar un HCA para los espectros replicados de cada una de las cepas. La distancia espectral obtenida entre espectros de distintos aislados debe ser mayor a la varianza correspondiente dentro de muestras de un mismo aislado para poder afirmar que las muestras difieren en alguna de las regiones analizadas. En nuestros estudios utilizamos tres ventanas de análisis correspondientes a las regiones de absorbancia de lípidos, región mixta y polisacáridos. No se observaron diferencias entre las características generales pertenecientes a los aislados clínicos y la cepa de referencia. La varianza espectral máxima hallada dentro de tres replicados independientes obtenidos (cada uno por triplicado, es decir, nueve espectros en total) dentro del mismo aislado ( $D_{max} = 19,2 \pm 4,4$ ) fue similar a la distancia espectral entre los distintos aislados (**Figura 2**). Este resultado nos indicaría que todos los aislados clínicos estudiados y la cepa de referencia Bp Tohama I parecen ser indistinguibles fenotípicamente por medio de la técnica FT-IR, al menos al ser cultivadas en medio sólido.

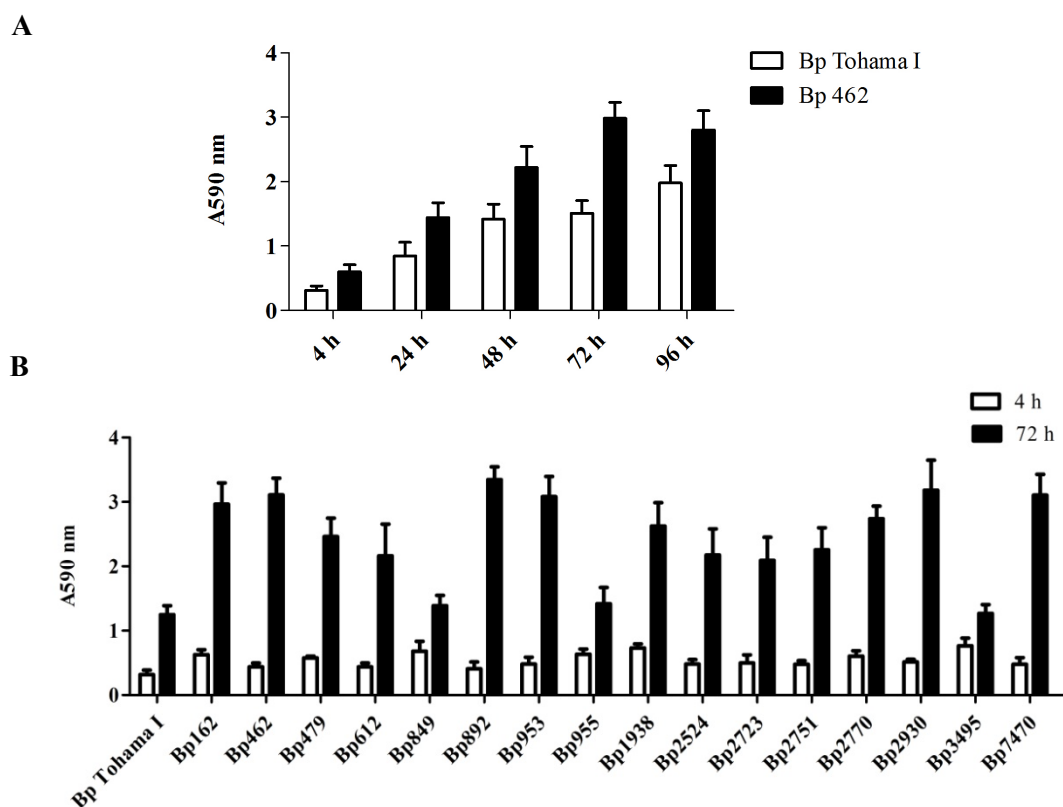


**Figura 2.** Análisis Jerárquico de Clústers obtenido para cepas clínicas de *B. pertussis* y la cepa de referencia Bp Tohama I. Derivadas primeras normalizadas correspondientes a espectros de las cepas en estudio fueron procesadas mediante HCA incluyendo las regiones espectrales correspondientes a la zona de polisacáridos (1200-900  $\text{cm}^{-1}$ ), zona mixta (1500-1250  $\text{cm}^{-1}$ ) y zona de lípidos (3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ ). El método utilizado para la construcción del dendograma fue *Average linkage* (o similitud media).

#### 2.4.2. Caracterización rápida de la capacidad de formación de *biofilm* de aislamientos clínicos de *B. pertussis*

Con el objetivo de realizar un testeo rápido de la capacidad de adhesión y de formación de *biofilm* de las cepas clínicas, se recurrió a la técnica de placas de 96 pocillos combinada con tinción con cristal violeta de la biomasa adherida a los pocillos. Esta técnica presenta como ventaja que es fácil de implementar y permite analizar muchas cepas en paralelo. Para ello, el sistema fue puesto a punto en primera instancia, incorporando modificaciones a la técnica. Normalmente, los cultivos realizados en esta placa parten de un inóculo que es una suspensión bacteriana ajustada a una  $\text{DO}_{650}$  relativamente baja y las placas son incubadas en condiciones estáticas. Debido a que *B. pertussis* no se desarrolla a partir del empleo de inóculos con densidades bajas, se utilizó una  $\text{DO}_{650}$  igual a 1, incubando las placas a 37°C en condiciones estáticas, a modo de favorecer la adhesión de las bacterias a la superficie. Luego de este tiempo de incubación, se removió la suspensión bacteriana, se agregó medio SS fresco y las placas

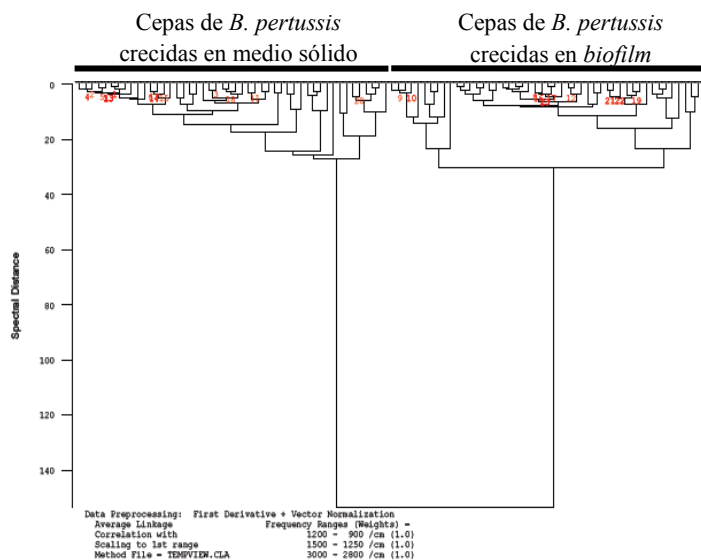
se cultivaron bajo agitación moderada, con el fin de favorecer la incorporación de oxígeno al medio. En una primera etapa, se utilizó la cepa de referencia Bp Tohama I y un aislado clínico seleccionado al azar. La formación de *biofilm* se monitoreó a las 24, 48, 72 y 96 h (**Figura 3.A**). Debido a que a las 72 h se alcanzó la máxima biomasa sénil para la cepa clínica, se utilizó este tiempo final para estudiar la formación de *biofilm* en las cepas restantes. Al analizar la capacidad de adhesión y de formación de *biofilm* (luego de 4 y 72 h de incubación respectivamente) se observó una mayor capacidad de adhesión y crecimiento en superficie para la mayoría de los aislados clínicos. Este resultado resultó sumamente interesante ya que demostró una mayor adaptación al crecimiento en *biofilm* sobre la superficie abiótica empleada (poliestireno) en los aislados clínicos frente a la cepa de referencia (**Figura 3.B**).



**Figura 3.** Análisis de la capacidad de formación de *biofilm* sobre placas de 96 pocillos. **A.** Las cepas Bp462 y Bp Tohama I fueron utilizadas para estudiar su capacidad de formar *biofilm* sobre pocillos a diferentes tiempos de incubación. **B.** *Screening* de la capacidad de adhesión (evaluada a las 4 h) y de formación de *biofilm* (evaluada a las 72 h de crecimiento). En todos los casos los cultivos fueron iniciados con un inóculo de 100  $\mu$ L de una suspensión bacteriana con una  $DO_{650}$  de 1,0. Luego de 4 h de una incubación estática a 37°C, la suspensión bacteriana fue removida y se agregó al sistema medio de cultivo. El medio de cultivo fue reemplazado cada 24 h. A cada tiempo final, se realizó la tinción con CV de los *biofilms* y el colorante retenido fue disuelto con etanol. Finalmente, se midió la absorbancia a 590 nm (A590) del colorante solubilizado. Se presentan los valores promedio de las A590 y sus respectivas desviaciones estándar.

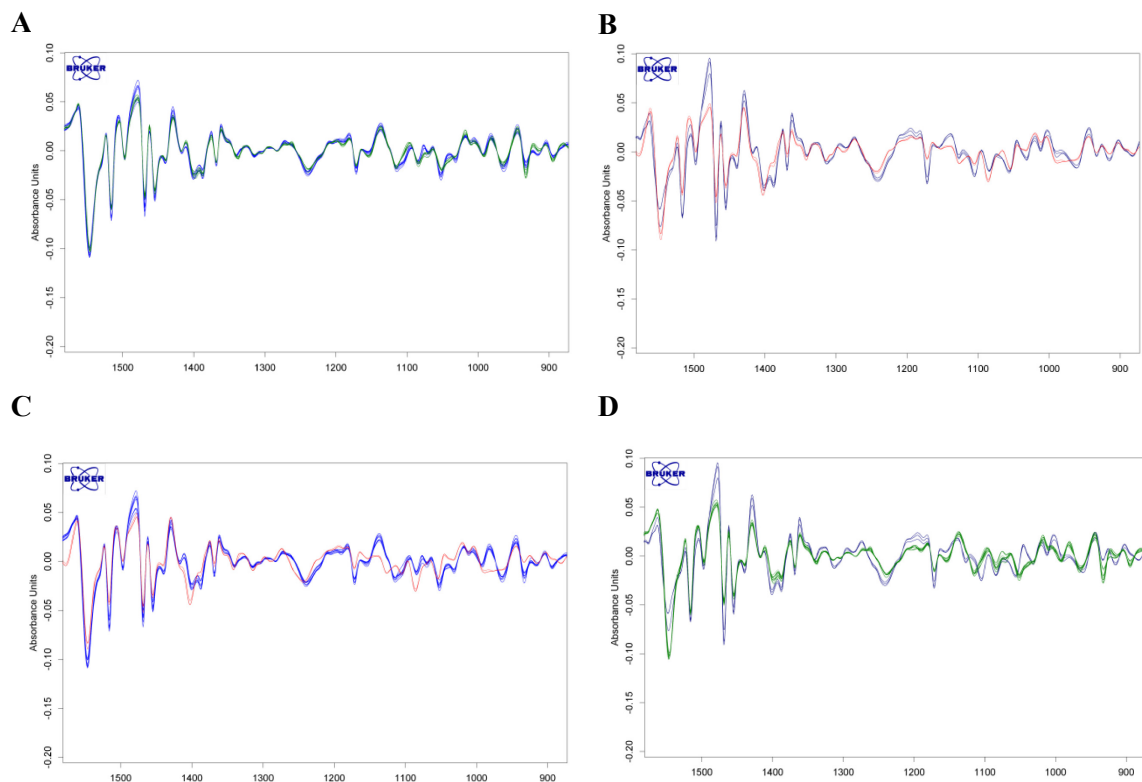
### 2.4.3. Estudio de las características fenotípicas de los *biofilms* formados por cepas clínicas de *B. pertussis*

A continuación, se comparó por FT-IR la composición macromolecular tanto del crecimiento en medio sólido como adherido a una superficie de poliestireno de las cepas clínicas. En este caso, se utilizaron placas de 6 pocillos como superficie para el desarrollo de los *biofilms*, los cuales luego de 72 h de incubación fueron resuspendidos en H<sub>2</sub>O destilada y analizadas por FTIR, obteniendo sus respectivos espectros. A cada espectro se le calcularon las derivadas primeras y segundas. Nuevamente, utilizando las derivadas primeras se realizó un Análisis jerárquico de clústers en las regiones de absorción de lípidos (3000-2800 cm<sup>-1</sup>), de polisacáridos (1200-900 cm<sup>-1</sup>) y mixta (1500-1250 cm<sup>-1</sup>). En primer lugar, se incluyeron derivadas primeras correspondientes a espectros tomados desde cultivos en placa y desde cultivos en *biofilm*. Como se observa en la **Figura 4**, se encontró una marcada distinción entre los espectros pertenecientes a cada una de las condiciones de cultivo. En la **Figura 5A-D**, se muestra a modo ilustrativo, la comparación entre las derivadas segundas de las cepas Bp Tohama I y Bp892 en las dos condiciones de cultivo ensayadas, en las distintas regiones de absorción, observándose mayores diferencias asociadas a las regiones mixtas y de polisacáridos.



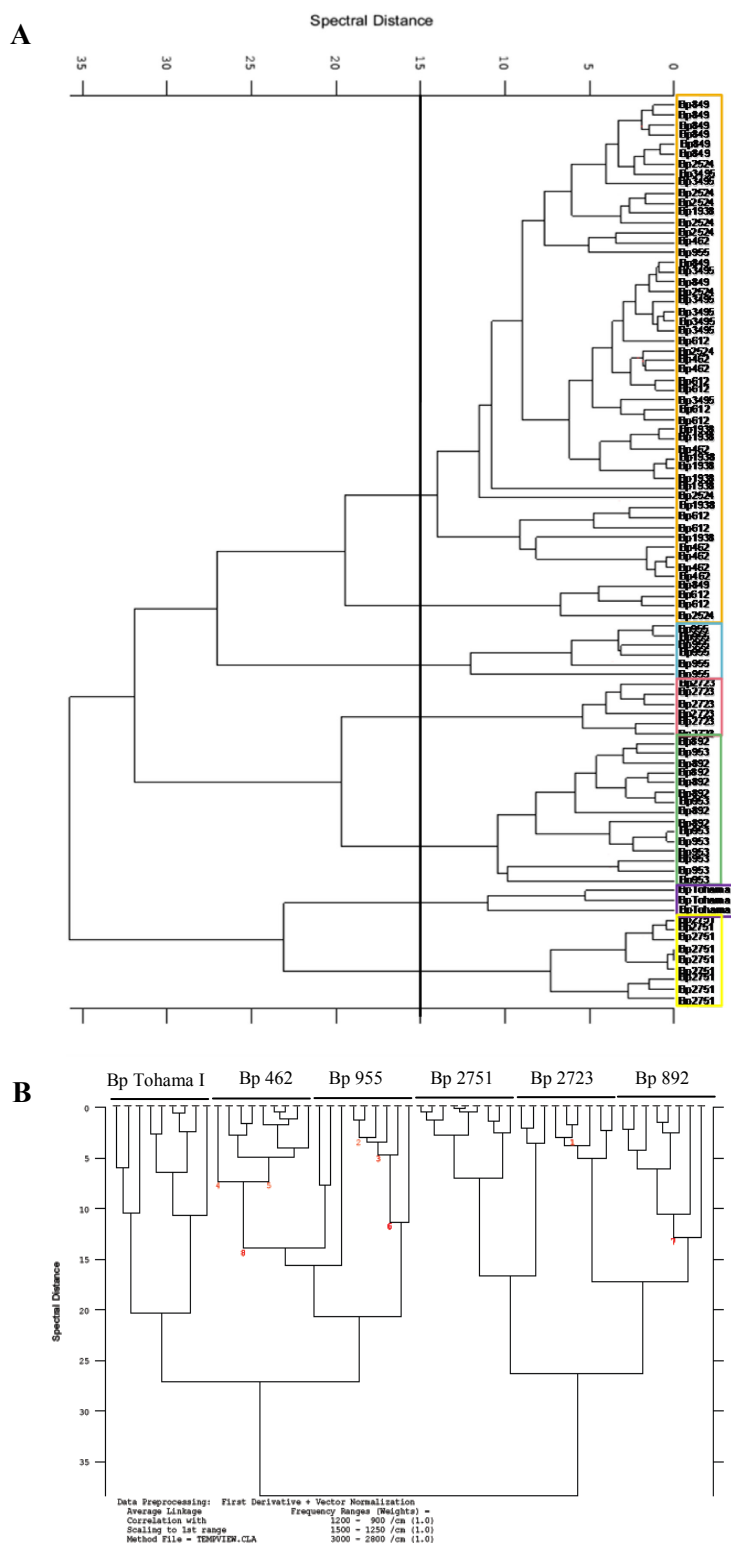
**Figura 4.** Comparación de los espectros obtenidos para las cepas de *B. pertussis* crecidas en medio sólido y en condición de *biofilm*. Análisis jerárquico de clústers obtenido a partir de derivadas primeras normalizadas correspondientes a los espectros de cepas de *B. pertussis* crecidas condición de en *biofilm*. Las muestras fueron analizadas en tres regiones IR: lípidos, zona mixta y polisacáridos.





**Figura 5.** Derivadas segundas de espectros obtenidos bajo condiciones de cultivo en medio sólido y en *biofilm* para la cepa de referencia Bp Tohama I y la cepa clínica Bp892, se muestra la región mixta y de polisacárido. **A.** Comparación del cultivo en placa de Bp Tohama I (celeste), y de la cepa 892 (verde). **B.** Comparación del cultivo en *biofilm* de Bp Tohama I (rojo) y de la cepa 892 (azul). **C.** Comparación del cultivo en placa y de *biofilm* de Bp Tohama I. **D.** Comparación del cultivo en placa y *biofilm* de la cepa 892.

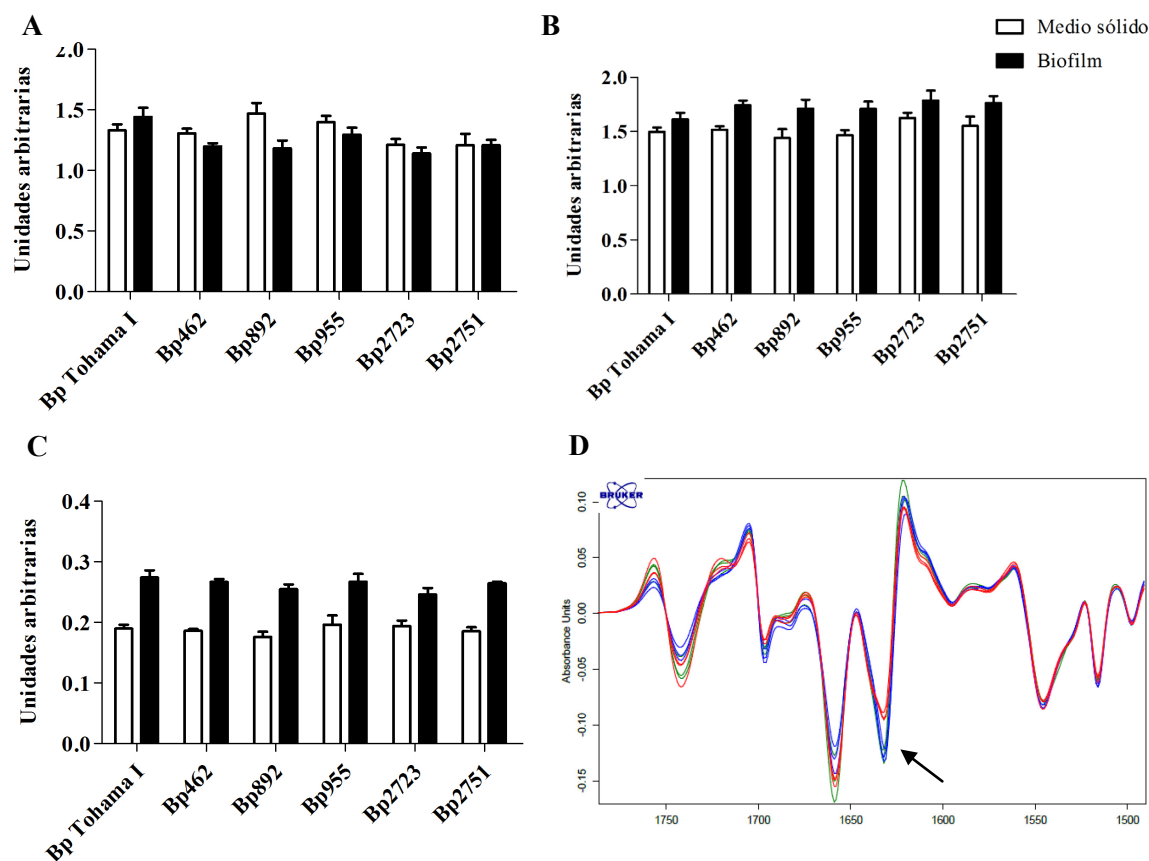
Adicionalmente, al analizar solamente la condición de cultivo en *biofilm* formado sobre una superficie abiótica, encontramos una diferenciación más marcada entre distintas cepas clínicas y la cepa de referencia Bp Tohama I, observándose diferentes clústers (**Figura 6.A**). De este modo, si construimos un dendrograma utilizando las 3 ventanas espectrales que habíamos empleado previamente para 5 aislamientos clínicos previamente agrupados de forma diferencial y la cepa de referencia, observamos de forma más clara cómo cada cepa forma un grupo separado de la cepa de referencia Bp Tohama I (**Figura 6.B**). Estas diferencias fueron más marcadas en la zona mixta y de polisacáridos, como bien puede observarse en las derivadas segundas en la **Figuras 5.B**, a modo de ejemplo.



**Figura 6.** Comparación de los espectros obtenidos para las cepas de *B. pertussis* crecidas en condición de *biofilm*. **A.** Análisis jerárquico de clústers obtenido a partir de derivadas primeras normalizadas correspondientes a los espectros obtenidos de cepas de *B. pertussis* crecidas en condición de *biofilm*. Las muestras fueron analizadas en tres regiones IR, lípidos, zona mixta y polisacáridos. En distintos colores se marcan los distintos grupos diferenciados por la técnica. La línea indica el valor de distancia espectral máximo hallado dentro de los replicados de una misma cepa. **B.** Análisis jerárquico de clústers obtenido a partir de derivadas primeras normalizadas correspondientes a los espectros obtenidos de 5 cepas clínicas de *B. pertussis* y la cepa Bp Tohama I, crecidas en condición de *biofilm*, empleando las ventanas correspondientes a lípidos, polisacárido y zona mixta.

---

A continuación, se realizó una semicuantificación del contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos, a partir de la integración de los respectivos picos en espectros normalizados correspondientes a cultivos en medio sólido y en *biofilm* sobre superficie abiótica (**Figura 7**). Al comparar ambas condiciones de cultivo, encontramos una mayor producción de lípidos y de proteínas en la condición de *biofilm* adherido a superficie abiótica. Aunque el nivel de producción de polisacáridos mostró ser menor en esta última condición de crecimiento, su composición fue diferente, indicando posiblemente una influencia de la forma de cultivo en la composición de la matriz del *biofilm*. A su vez, todas las cepas clínicas mostraron un mayor contenido proteico en comparación a la cepa de referencia Bp Tohama I en la condición de crecimiento en *biofilm*. Esta observación se correspondió directamente con la presencia de un pico a  $1637\text{ cm}^{-1}$  con una intensidad aumentada en todas las derivadas segundas de las cepas clínicas en dicha condición de cultivo (**Figura 7.D**). Este pico se corresponde a la conformación proteica hoja plegada  $\beta$ , asociada particularmente a proteínas de membrana. En resultados previos de nuestro laboratorio hemos observado una mayor expresión de proteínas asociadas a la virulencia al comparar el proteoma de la cepa clínica Bp2723 y de Bp Tohama I en condición de crecimiento en *biofilm*. La mayoría de las proteínas sobreexpresadas se corresponden a proteínas de membrana de la familia de los autotransportadores, porinas y toxinas, las cuales todas tienen en común una conformación de hoja plegada  $\beta$ . Estos resultados sugerirían una mayor expresión de proteínas que como FHA, promueven el desarrollo del *biofilm* de *B. pertussis*.



**Figura 7.** Semicuantificación del contenido de carbohidratos (A), de proteínas (B) y lípidos (C) a partir de la integración de las áreas de los picos correspondientes a cada macromolécula de espectros obtenidos a partir de muestras crecidas en medio sólido y en *biofilm* sobre superficie abiótica. **D.** Derivadas segundas de espectros obtenidos bajo condiciones de cultivo en *biofilm* para las cepas de referencia Bp Tohama I (rojo), Bp955 (azul) y Bp892 (verde). Se muestra la región de proteínas, indicando el incremento de intensidad del pico correspondiente a  $1637 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 2.4.4. Caracterización del crecimiento en cultivo planctónico de cepas clínicas de *B. pertussis*

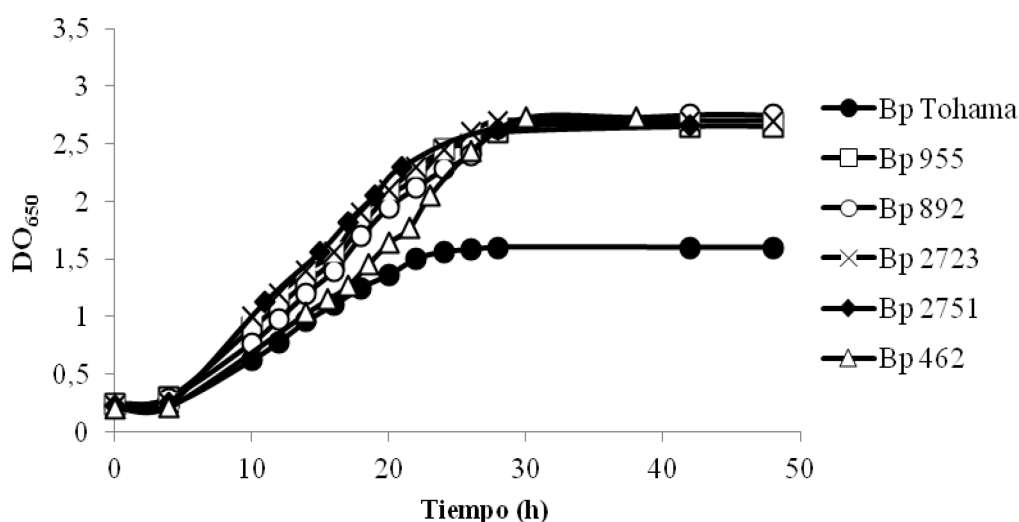
Al comenzar a utilizar cepas clínicas de *B. pertussis*, la primera característica aparente y distintiva de estas cepas con respecto a la cepa de referencia es su capacidad de crecer a una mayor velocidad y alcanzar niveles de biomasa mayor al de la cepa de referencia, como resulta evidente en la **Figura 8**. Esta característica también se ve reflejada al determinar el peso seco de la biomasa alcanzada hacia el final del cultivo planctónico a las 24 h de incubación (**Figura 9.A**). Las cepas clínicas muestran una biomasa final de entre dos y tres veces superior al de la cepa de referencia cuando son cultivadas en medio SS.

A continuación, analizamos el consumo de glutamato en estos mismos cultivos, observando un patrón similar al de biomasa final producida por parte de las cepas

clínicas, **Figura 9.B**. El medio de cultivo SS contiene una concentración de  $10 \text{ g L}^{-1}$  de glutamato, que soporta el crecimiento de *B. pertussis* como fuente de carbono y nitrógeno. Interesantemente, observamos que las cepas clínicas son capaces de consumir entre el 70 y el 89 % de sustrato presente en el medio, mientras que Bp Tohama I sólo consume el 35% del mismo cuando es cultivada en medio SS.

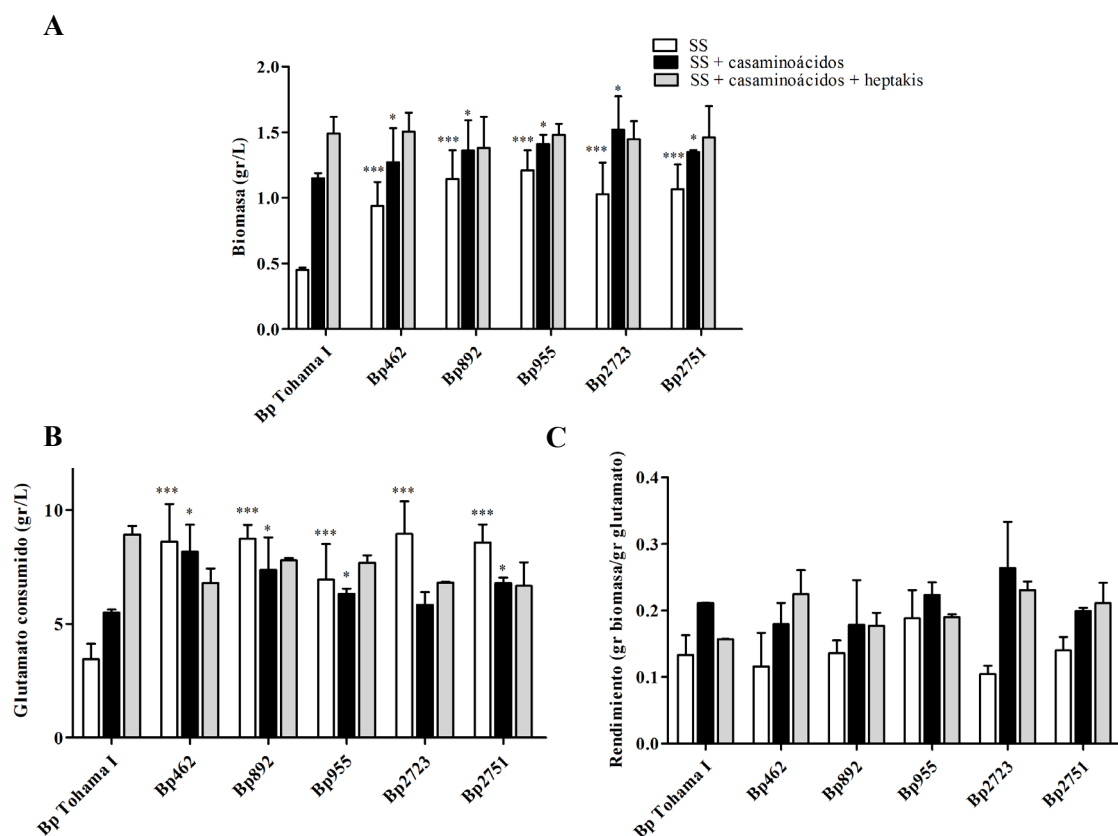
Si se analiza la relación entre la biomasa producida y la cantidad de sustrato consumido (**Figura 9.C**), encontramos que esta relación es similar para todas las cepas. Esta observación resulta lógica desde el punto de vista de los requerimientos energéticos para el crecimiento de los distintos aislamientos. En todos los casos la cantidad de energía requerida para generar nueva biomasa debe ser similar a modo de que el rendimiento en biomasa sea similar entre las cepas.

La poca eficiencia del crecimiento de Bp Tohama I en medio SS es posible que se deba a una inhibición del crecimiento por parte de metabolitos liberados al medio. Es conocido que *B. pertussis* libera al medio de cultivo ácidos grasos como palmitato y palmitoleato [25, 26, 27]. Esta inhibición del crecimiento ha sido compensada por la adición de 2,6-bi-O-metil- $\beta$ -ciclodextrina (Heptakis). El Heptakis actúa como un secuestrante de ácidos grasos inhibitorios para el crecimiento de la bacteria, produciendo un efecto similar a la albúmina presente en el medio sólido ABG [25].



**Figura 8.** Curvas de crecimiento de cepas clínicas y de la cepa de referencia Bp Tohama I. Se realizaron cultivos de 100 mL de medio SS y se siguió el crecimiento bacteriano midiendo la  $DO_{650}$  a distintos tiempos de incubación.

A continuación, estudiamos el efecto de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento de las cepas clínicas en comparación al de Bp Tohama I. Para ello, se compararon cultivos líquidos en medio SS, medio SS con casaminoácidos y medio SS con casaminoácidos y Heptakis. Para cada cepa se determinó la cantidad de biomasa producida, la cantidad de glutamato consumido y el rendimiento en biomasa. Al utilizar medio SS suplementado con casaminoácidos, la biomasa final alcanzada y el glutamato consumido fue mayor tanto para Bp Tohama I, como para las cepas clínicas, observándose una diferencia menor en los valores obtenidos entre las cepas. De manera interesante, al cultivar las cepas en presencia de Heptakis, observamos que tanto el crecimiento como el consumo de glutamato se emparejan en todas las cepas. Es de esperar que, en el caso de las cepas clínicas, al ir suplementando el medio SS, el consumo de glutamato vaya disminuyendo, ya que el medio se enriquece, con lo cual el requerimiento de la fuente de energía disminuye.



**Figura 9.** A. Determinación de la biomasa producida luego de 24 h de crecimiento en cultivos líquidos. B. Determinación de la cantidad de glutamato consumido en los mismos cultivos. La determinación del sustrato se realizó por kit enzimático. C. Rendimiento en biomasa, obtenido de la relación entre biomasa total producida y cantidad de sustrato consumido. Los ensayos fueron realizados por triplicado, la significancia se analizó con el test de Student, \*\*\* representa un valor  $p < 0,001$ , \* representa un valor  $p < 0,05$ .

Así, observamos que la composición del medio no es trivial al momento de estudiar el comportamiento de cepas clínicas de *B. pertussis*. El medio que contiene casaminoácidos y heptakis proporciona un entorno que les permite a todas las cepas desarrollarse de modo similar.





## 2.5. Discusión

En la actualidad es ampliamente aceptado y reconocido el hecho de que las cepas circulantes de *B. pertussis* difieren tanto en su contenido genómico como en el perfil de expresión de diversos factores de virulencia respecto de la cepa de referencia. Es así que año a año se incrementan los estudios reportados globalmente sobre la diversificación observada en aislados clínicos de *B. pertussis* [5-7, 15]. Los diferentes linajes epidémicos de *B. pertussis* que circulan emergen y se dispersan debido a adaptaciones de los aislamientos circulantes a la inmunidad presente en la población [2]. Estas adaptaciones ocurren a nivel genético pero conllevan cambios fenotípicos en las poblaciones bacterianas [6, 16-20]. Dentro de las estrategias utilizadas por estos organismos para adaptarse en poblaciones vacunadas podemos mencionar la divergencia antigénica con respecto a las cepas vacunales y la sobre producción de ciertos factores de virulencia, como PTx [3, 21]. La divergencia antigénica se ha observado particularmente en Prn y PTx, mientras que por otro lado, la producción aumentada de PTx le confiere una ventaja de adaptación y transmisión a la bacteria dentro de poblaciones vacunadas que poseen anticuerpos contra esta toxina [20, 22-24]. No sólo estas dos adaptaciones hacia la vacunación han sido reportadas, sino también posiblemente lo sea la prevalencia de aislamientos deficientes en Prn.

Las diferencias reportadas entre cepas circulantes y cepas de referencia de *B. pertussis* nos llevó a analizar la diversidad fenotípica presente en una población de aislados clínicos de Argentina, entre el período 2001-2008. Para ello se recurrió a la técnica FT-IR, la cual permite de forma sencilla y rápida, obtener una imagen de la composición bioquímica de la muestra bacteriana. Esta técnica ha sido aplicada en numerosos trabajos en microbiología, con el fin de discriminar con éxito diferentes géneros bacterianos e incluso especies, basándose en la composición bioquímica característica de cada una de las muestras en análisis. Para facilitar la diferenciación espectral se recurre al uso de derivadas primeras de los espectros obtenidos, y luego la aplicación de algoritmos, lo que permite visualizar estas diferencias. En nuestro caso, se utilizó un software de Análisis Jerárquico de Clústers, que devuelve en forma gráfica utilizando un dendrograma la relación de heterogeneidad de las muestras analizadas.

El análisis por FTIR de la diversidad espectral de las cepas clínicas y de referencia luego de crecer en medio sólido no mostró diferencias significativas en todo

el rango espectral analizado. Sin embargo, estas cepas clínicas mostraron una capacidad de formación de *biofilm* sobre una superficie abiótica mayor con respecto al de la cepa de referencia Bp Tohama I. Este resultado demuestra una adaptación de las cepas clínicas hacia este tipo particular de crecimiento, con lo cual posiblemente conlleve a una diferenciación fenotípica de las mismas con respecto a la cepa de referencia. Por este motivo, analizamos la diversidad fenotípica de los aislados clínicos y la cepa de referencia cuando crecen en condición de *biofilm*. Por un lado, encontramos que bajo las condiciones de cultivo en medio sólido y en *biofilm*, el conjunto de cepas se diversifica según cada una de las variables de crecimiento. Este resultado es esperado, ya que el desarrollo en *biofilm* representa una forma de crecimiento bacteriano con un fenotipo distintivo. Una de las principales características que contribuye a esta diversificación es la presencia de la matriz extracelular que contiene a las bacterias del *biofilm*. Dicha matriz está compuesta por macromoléculas como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos.

Al analizar los espectros obtenidos de células sésiles por medio de un Análisis Jerárquico de Clústers, observamos que las cepas clínicas y la cepa de referencia luego de crecer como *biofilm* se agrupan de forma diferencial a la cepa de referencia. La mayor variabilidad se encontró en las regiones mixtas y de polisacáridos. Más aún, en todos los espectros obtenidos para las cepas clínicas se encontró una mayor intensidad en el pico  $1637\text{ cm}^{-1}$ , que se corresponde con una mayor expresión de proteínas con una conformación de hoja plegada  $\beta$ . Estas proteínas podrían encontrarse sobre la superficie celular o bien formando parte de la matriz extracelular. En resultados previos de nuestro laboratorio, observamos en un aislamiento clínico, Bp2723, una sobreexpresión de factores de virulencia (determinado mediante qPCR) que contienen esta conformación, entre ellos FHA, la principal adhesina que participa en el proceso de formación de *biofilm* de *Bordetella*. Al integrar áreas correspondientes a los picos de lípidos, proteínas y carbohidratos observamos que las cepas clínicas al crecer en *biofilm* presentan un mayor contenido proteico con respecto a la cepa de referencia, en concordancia con el incremento de la intensidad del pico a  $1637\text{ cm}^{-1}$ .

El efecto inhibitorio de los ácidos grasos sobre el crecimiento bacteriano fue observado empíricamente durante el desarrollo de medios de cultivo en ágar para *B. pertussis*, donde posiblemente la albúmina presente en el suero agregado al medio actuaba como neutralizador de ácidos grasos [25]. *B. pertussis* produce durante su

---

crecimiento ácidos grasos como palmítico, palmitoleico y esteárico, los cuales son esterificados para producir palmitato y palmitoleato [26, 27]. Estos ácidos grasos de cadena larga actúan como inhibidores del crecimiento de *B. pertussis*. La producción de ácidos grasos libres autoinhibitorios no es una característica única de *B. pertussis*. *Neisseria gonorrhoeae*, otro patógeno Gram-negativo que coloniza el tejido epitelial humano, también produce ácidos grasos libres de cadena larga [28], y como en el caso de *B. pertussis*, su crecimiento es inhibido por la presencia de estas moléculas en el medio de cultivo [29]. Al estudiar el crecimiento en condiciones planctónicas en medio SS de las cepas clínicas, con respecto al de Bp Tohama I, observamos que esta última alcanza valores de biomasa menores al de las cepas clínicas, y presenta una velocidad de crecimiento menor. Al analizar la cantidad de biomasa producida y el consumo de glutamato, observamos que en la cepa de referencia el crecimiento se reduce, observándose una curva de crecimiento similar a las observadas bajo la presencia de un inhibidor. Esta inhibición es compensada al agregar Heptakis en el medio de cultivo. La acción del Heptakis ocurre en términos de adsorción de ácidos grasos. Como resultado, acorta la fase lag de crecimiento, disminuye la cantidad de inóculo inicial requerido para que los cultivos líquidos inicien su crecimiento, y extiende la etapa de crecimiento a su máxima velocidad [30]. El hecho de que las cepas clínicas tengan la capacidad de crecer a altas densidades en ausencia de Heptakis sugeriría una liberación diferencial de ácidos grasos al medio de cultivo, o bien algún mecanismo que les permita superar el efecto inhibitorio de la presencia de los mismos.

Si bien el uso de ciclodextrina en el medio de cultivo compensa completamente las diferencias en el cultivo planctónico entre las cepas, la inclusión de la misma representa una situación de compromiso que debe ser considerada, debido a que este compuesto es capaz de insertarse en la membrana bacteriana, y afectar la producción de factores de virulencia. Así, por ejemplo, se ha observado que la liberación de FHA al medio de cultivo se incrementa con el agregado de ciclodextrina. Al encontrarnos ante la decisión en la que un crecimiento diferencial entre las cepas podría llevarnos a conclusiones equivocadas sobre el crecimiento en *biofilm* de cepas clínicas, y que el hecho de agregar Heptakis al medio de cultivo afecta la liberación de la principal adhesina para el mantenimiento de la estructura del *biofilm*, decidimos continuar nuestros experimentos utilizando el medio SS suplementado únicamente con

## Capítulo 2

---

casaminoácidos, el cual, como se demostró en este Capítulo, compensa parcialmente las diferencias de crecimiento planctónico.

---

## 2.6. Conclusiones

Los resultados presentados en este Capítulo demuestran que los aislados clínicos de *B. pertussis* estudiados poseen un potencial incrementado en la formación de *biofilm*. Esta característica se ve asociada a un fenotipo que se diversifica del que muestra la cepa de referencia Bp Tohama I.

Los aislados clínicos muestran una mayor producción de proteínas, en particular con conformación de hoja plegada  $\beta$ .

Asimismo, los aislados clínicos difieren en su crecimiento planctónico cuando son cultivados en medio SS, mostrando una reducida inhibición de crecimiento, en comparación a la cepa de referencia Bp Tohama I. En consecuencia, los aislados clínicos presentan una mayor producción de biomasa y de consumo de glutamato, mientras que la relación entre ambas variables permanece similar al de Bp Tohama I. Esta limitación en el crecimiento mostrada por la cepa de referencia es superada parcialmente si al medio de cultivo se lo suplementa con casaminoácidos, y completamente tras el agregado de Heptakis.



---

## 2.7. Referencias

1. Head NE, Yu H: Cross-sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, virulence, and genome diversity. *Infect Immun* 2004, 72(1):133-144.
2. Hegerle N, Guiso N: Epidemiology of whooping cough & typing of *Bordetella pertussis*. *Future Microbiol* 2013, 8(11):1391-1403.
3. Mooi FR: *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol* 2010, 10(1):36-49.
4. Mooi FR, Van Der Maas NA, De Melker HE: Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin. *Epidemiol Infect* 2014, 142(4):685-694.
5. Advani A, Hallander HO, Dalby T, Krogfelt KA, Guiso N, Njamkepo E, von Konning CH, Riffelmann M, Mooi FR, Sandven P *et al*: Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Bordetella pertussis* isolates circulating in Europe from 1998 to 2009. *J Clin Microbiol* 2013, 51(2):422-428.
6. Bouchez V, Caro V, Levillain E, Guigon G, Guiso N: Genomic content of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in areas of intensive children vaccination. *PLoS One* 2008, 3(6):e2437.
7. Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, Cassiday PK, Chiang CS, Dalby T, Fry NK *et al*: Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *MBio* 2014, 5(2):e01074.
8. Pawloski LC, Queenan AM, Cassiday PK, Lynch AS, Harrison MJ, Shang W, Williams MM, Bowden KE, Burgos-Rivera B, Qin X *et al*: Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clin Vaccine Immunol* 2014, 21(2):119-125.
9. Smith B: Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Whasington; 2011.
10. Davies RaM, L.J.: Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. In: *Current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Edited by A. M-V, vol. II: Formatex Research Center; 2010: 1582-1595.
11. Naumann D, Helm D, Labischinski H: Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* 1991, 351(6321):81-82.
12. Helm D, Labischinski H, Schallehn G, Naumann D: Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Gen Microbiol* 1991, 137(1):69-79.
13. Rebuffo CA, Schmitt J, Wenning M, von Stetten F, Scherer S: Reliable and rapid identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* 2006, 72(2):994-1000.
14. O'Toole GA, Kolter R: Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 1998, 30(2):295-304.
15. de Melker HE, Schellekens JF, Neppelenbroek SE, Mooi FR, Rumke HC, Conyn-van Spaendonck MA: Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of the Netherlands: observations on surveillance data. *Emerg Infect Dis* 2000, 6(4):348-357.

16. Hegerle N, Guiso N: Antibody-mediated inhibition of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-haemolysin-induced macrophage cytotoxicity is influenced by variations in the bacterial population. *Microbiology* 2014, 160(Pt 5):962-969.
17. Hegerle N, Paris AS, Brun D, Dore G, Njamkepo E, Guillot S, Guiso N: Evolution of French *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* isolates: increase of Bordetellae not expressing pertactin. *Clin Microbiol Infect* 2012, 18(9):E340-346.
18. Kallonen T, He Q: *Bordetella pertussis* strain variation and evolution postvaccination. *Expert Rev Vaccines* 2009, 8(7):863-875.
19. Bosch A, Serra D, Prieto C, Schmitt J, Naumann D, Yantorno O: Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, 71(5):736-747.
20. de Gouw D, Hermans PW, Bootsma HJ, Zomer A, Heuvelman K, Diavatopoulos DA, Mooi FR: Differentially expressed genes in *Bordetella pertussis* strains belonging to a lineage which recently spread globally. *PLoS One* 2014, 9(1):e84523.
21. He Q, Mertsola J: Factors contributing to pertussis resurgence. *Future Microbiol* 2008, 3(3):329-339.
22. Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, He Q, Bart MJ, Heuvelman KJ, de Greeff SC, Diavatopoulos D, Teunis P, Nagelkerke N *et al*: *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis* 2009, 15(8):1206-1213.
23. Litt DJ, Neal SE, Fry NK: Changes in genetic diversity of the *Bordetella pertussis* population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type. *J Clin Microbiol* 2009, 47(3):680-688.
24. Mastrantonio P, Spigaglia P, van Oirschot H, van der Heide HG, Heuvelman K, Stefanelli P, Mooi FR: Antigenic variants in *Bordetella pertussis* strains isolated from vaccinated and unvaccinated children. *Microbiology* 1999, 145 ( Pt 8):2069-2075.
25. Pollock MR: The growth of *H. pertussis* on media without blood. *Br J Exp Pathol* 1947, 28(4):295-307.
26. Thiele OW, Schwinn G: The free lipids of *Brucella melitensis* and *Bordetella pertussis*. *Eur J Biochem* 1973, 34(2):333-344.
27. Kawai Y, Moribayashi A: Characteristic lipids of *Bordetella pertussis*: simple fatty acid composition, hydroxy fatty acids, and an ornithine-containing lipid. *J Bacteriol* 1982, 151(2):996-1005.
28. Walstad DL, Reitz RC, Sparling PF: Growth inhibition among strains of *Neisseria gonorrhoeae* due to production of inhibitory free fatty acids and lysophosphatidylethanolamine: absence of bacteriocins. *Infect Immun* 1974, 10(3):481-488.
29. Miller RD, Brown KE, Morse SA: Inhibitory action of fatty acids on the growth of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 1977, 17(2):303-312.
30. Imaizumi A, Suzuki Y, Ono S, Sato H, Sato Y: Heptakis(2,6-O-dimethyl)beta-cyclodextrin: a novel growth stimulant for *Bordetella pertussis* phase I. *J Clin Microbiol* 1983, 17(5):781-786.



## **Capítulo 3**

**Caracterización de la capacidad de formación de  
*biofilm* de aislados clínicos de *B. pertussis***



### 3.1. Introducción

Las bacterias han desarrollado la habilidad de crecer en forma de *biofilms* en sus ambientes naturales como parte de una estrategia exitosa de colonización. La observación de microorganismos adheridos a superficies o localizados en tejidos o secreciones y rodeados por una matriz data desde los inicios de la microbiología. Van Leeuwenhoek, utilizando sus simples microscopios de luz, fue el primero en describir, en el siglo XVII, la presencia de microorganismos adheridos a superficies dentales, a raíz de lo cual se le reconoce como el descubridor de los biofilms bacterianos. Si bien la adhesión bacteriana a superficies ha sido conocida desde hace varias décadas, recién en los años 70 los microbiólogos plantearon que, probablemente, la mayor parte de las bacterias en la naturaleza vivían en estado de *biofilm*. A pesar de todos los antecedentes, el concepto de infecciones mediadas por *biofilms* y su importancia en la medicina, particularmente con respecto a infecciones crónicas, se empieza a estudiar en los últimos 40 años [1, 2]. Desde ese entonces, se comenzó a aceptar que las infecciones mediadas por *biofilms* son frecuentes e importantes. Es así que se han estudiado una amplia variedad de patógenos en este tipo de crecimiento, permitiendo avances en el desarrollo de estrategias de tratamiento y de prevención de los mismos [3-8].

La capacidad de formación de *biofilm* es una característica esencial para muchos patógenos que infectan la mucosa respiratoria, debido a que facilita una colonización exitosa y su persistencia dentro del hospedador [9], al proveer un ambiente de crecimiento que les permite resistir a antibióticos y a las defensas del sistema inmune [10]. En el caso de *B. pertussis*, varios estudios han demostrado esta capacidad de producir *biofilm* tanto in vitro como in vivo [11, 12]. Como en muchos otros patógenos, se ha observado que este proceso es altamente regulado por diferentes mecanismos, incluyendo el sistema de dos componentes BvgAS, la halarmona (p)pGppp y la molécula GMP-di-c [11, 13-16]. Más aún, se han identificado componentes clave de su matriz extracelular, como el polisacárido Bps, el ADN extracelular, y la participación de FHA como proteína estabilizadora de las estructuras sésiles de *B. pertussis* [17-20]. Sin embargo, a pesar de todas estas evidencias, la formación de *biofilm* sigue siendo poco estudiada en pertussis y poco reconocida como forma de colonización y/o persistencia. Como consecuencia, para alcanzar una mejor comprensión de la significancia del desarrollo de *biofilm* en la patogénesis de *B. pertussis*, es clave para los grupos que sostienen esta hipótesis la identificación de los factores moleculares involucrados en

este proceso, junto con sus posibles implicancias en la colonización y la transmisión de la bacteria.

El estudio de la patogénesis de *B. pertussis* viene planteando una disyuntiva con respecto al surgimiento de cepas circulantes que difieren genéticamente de la cepa de referencia Bp Tohama I [21]. En este sentido, es posible que los estudios realizados con esta cepa de laboratorio no sean del todo representativos del comportamiento de las cepas circulantes en la actualidad. Pérdida de la expresión de Prn, alelos predominantes de ciertos genes o regiones promotoras, elevada expresión de factores de virulencia, entre otras, son características que en la actualidad son comúnmente reportadas en estudios científicos de aislados clínicos [22-25]. Ha sido observado en diferentes patógenos, que cepas clínicas poseen una mayor capacidad de formación de *biofilm*, teniendo implicancias en su patogénesis [3-8]. En el caso de *B. pertussis*, se conoce muy poco sobre la capacidad de formación de *biofilm* en cepas recientemente aisladas. En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, hemos observado que las cepas clínicas presentan una mayor capacidad de adhesión y de crecimiento en *biofilm* en condiciones in vitro. Asociado a este fenotipo, también se observó una mayor expresión de factores de virulencia en una cepa clínica aislada en nuestro país. Como consecuencia, el estudio de la formación de *biofilm* en cepas clínicas de *B. pertussis* supone dos desafíos, por un lado evaluar si esta forma de crecimiento ha evolucionado como para contribuir a la noción de que este fenotipo representa una estrategia alternativa de colonización y/o persistencia; y por otro lado, aportar nuevas evidencias de las diferencias en el comportamiento de estas cepas con respecto a las cepas de laboratorio.

En este Capítulo se presentan los resultados obtenidos de un intensivo análisis comparativo entre los *biofilms* formados por cepas aisladas en nuestro país en conjunto con cepas aisladas en los Estados Unidos y en relación a cepas de referencia. Se muestran evidencias de las diferencias en las cepas clínicas que evidentemente favorecen su mayor desarrollo como *biofilm*: desde el proceso de autoagregación, cuantificación del *biofilm* formado en distintas superficies, análisis de la resistencia a antibióticos, análisis estructural de los *biofilms* por medio de microscopía, cuantificación de ciertos determinantes claves durante el proceso, y componentes claves de la matriz extracelular como estabilizadores de la estructura sénil. Con respecto a la patogénesis mostrada por estos aislados, se presentan resultados de su adhesión a

células epiteliales A549 y el rendimiento de la infección de estas cepas en un modelo de infección murino.



### 3.2. Objetivos

Los objetivos específicos planteados para esta etapa del trabajo fueron:

- 1 - Estudiar la capacidad de formación de *biofilm* sobre superficies abióticas de cepas clínicas de *B. pertussis* aisladas en Argentina y en Estados Unidos.
- 2 - Establecer diferencias estructurales entre *biofilms* formados in vitro por una cepa de referencia y aislados clínicos.
- 3 - Definir si la distinta capacidad de formación de *biofilm* mostrada por aislados circulantes de *B. pertussis* respecto de la cepa de referencia está asociada a un cambio en la expresión de factores de virulencia.
- 4 - Evaluar para los organismos en estudio la capacidad de adherir a células epiteliales y de desarrollar *biofilms* en órganos del tracto respiratorio en un modelo murino.





### 3.3. Materiales y métodos

#### 3.3.1. Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas en este Capítulo se detallan en la **Tabla 1**. Las condiciones de cultivo utilizadas fueron las mismas a las descriptas en la Sección 2.2.1. Todas las cepas se cultivaron en las condiciones de restricción adecuadas en cada caso, para lo cual los medios de cultivo fueron suplementados con el antibiótico apropiado en las siguientes concentraciones: estreptomicina (Sm) 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , kanamicina (Km) 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y cefalexina (Cef) 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Tabla 1.** Cepas utilizadas en este estudio.

Cepa*	Año de aislamiento	Lugar de aislamiento
Bp Tohama I	1954	Japón
Bp369 (avirulenta)	-	-
Bp536	-	-
GMT1	1996	Estados Unidos
Bp955	2001	Argentina
Bp2723	2001	Argentina
Bp2751	2004	Argentina
Bp462	2006	Argentina
Bp892	2007	Argentina
H918	2012	Estados Unidos
H921	2012	Estados Unidos
H973	2012	Estados Unidos
STO1-SEAT0004	2012	Estados Unidos
STO1-CHOC-0008	2012	Estados Unidos
I002	2012	Estados Unidos
9340	S/i	Estados Unidos
M3984	S/i	Estados Unidos
S84647	S/i	Estados Unidos
12742	S/i	Estados Unidos

\* Los aislados clínicos de Argentina fueron provistos por la Sala de Microbiología del Hospital de Niños "Sor María Ludovica" de la ciudad de La Plata, en tanto que los aislados de Estados Unidos fueron provistos por *BEI Resources (Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository)*, administrado por el ATCC (*American Type Culture Collection*).  
S/i: sin información.

### 3.3.2. Determinación de la capacidad de formación de *biofilm* sobre tubos de vidrio y sobre placas multipocillo

Tubos de vidrio con 2 mL de medio SS fueron inoculados a partir de cultivos líquidos crecidos por 16 h, a modo de obtener una  $DO_{650}$  inicial igual a 0,2. Los tubos fueron incubados en una rolera durante 24 h. Se tomaron 100  $\mu$ L de muestra correspondiente a la fracción planctónica de cada tubo y se midió su  $DO_{650}$ . La biomasa adherida a las paredes del tubo fue lavada dos veces con 2 mL de  $H_2O$  bidestilada y teñida durante 20 min con 8 mL de una solución de CV al 0,1%. Luego, se descartó el CV, se lavó dos veces con 2 mL de  $H_2O$  y se removió el colorante retenido con 8 mL de etanol. Finalmente, se midió la absorbancia del colorante solubilizado a 540 nm.

El ensayo de formación de *biofilm* sobre placas de 96 pocillos se realizó de forma similar al descrito en la Sección 2.2.2, con la única modificación que las placas fueron incubadas durante 96 h.

### 3.3.3. Ensayo de autoagregación

Para el estudio de la capacidad de autoagregación, las cepas fueron cultivadas en medio SS por 24 h. Las células bacterianas fueron colectadas y homogeneizadas en medio base SS a una  $DO_{650}$  de 1. Las células homogeneizadas fueron incubadas a temperatura ambiente de manera estática. A distintos tiempos (2, 5 y 24 h), fueron tomados 100  $\mu$ L de medio de la parte superior de la suspensión, y se midió la  $DO_{650}$ . El porcentaje de autoagregación fue calculado utilizando la fórmula  $(DO_0 - DO_t)/DO_0$ , donde  $DO_0$  corresponde a la absorbancia inicial y  $DO_t$ , a la absorbancia en el tiempo analizado. Tres experimentos independientes fueron realizados por duplicado.

### 3.3.4. Ensayo de hemaglutinación

Suspensiones bacterianas fueron preparadas a partir de cultivos en medio SS de 24h de crecimiento. Las células fueron colectadas por centrifugación y se prepararon suspensiones de una  $DO_{650}$  de 1. A su vez, se preparó una suspensión de hematocitos al 2% utilizando sangre desfibrinada de carnero. Se prepararon diluciones seriadas al medio en placas de 96 pocillos con fondo redondo, utilizando cada suspensión bacteriana de  $DO_{650}$  1 como punto de partida para las mismas. Cada dilución fue incubada con 100  $\mu$ L de hematocitos al 2%. Las placas fueron incubadas a 4°C hasta observar el punto final del control negativo realizado con PBS, en el que la suspensión

de hematocritos se encuentra completamente decantada en el fondo del pocillo. El resultado se leyó como la máxima dilución que produce hemaglutinación.

### 3.3.5. Detección de FHA por técnica de ELISA

Para la evaluación de la expresión de FHA se realizaron ensayos de ELISA. Tiras de 6 pocillos (Corning, Sigma) se sensibilizaron con 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión bacteriana correspondiente a aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de cada cepa, inactivada por calor a  $65^\circ\text{C}$  por 30 minutos o bien, diluciones del sobrenadante de cultivo. La sensibilización se realizó durante 12 h a  $4^\circ\text{C}$ . Cada pocillo fue lavado tres veces con PBS-0,05% ( $v v^{-1}$ ) Tween 20 (PBST) y se procedió a realizar el bloqueo con PBS-5% leche descremada (PBSL) durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Luego del bloqueo se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de suero anti-FHA (1:20.000) preparado en PBST-5% leche descremada (PBSTL) y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados con PBST, se agregó una dilución 1:2000 en PBSTL del anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa anti-ratón y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Luego de 5 lavados con PBST, se agregó 100  $\mu\text{L}$  del reactivo TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) y se incubó durante 15 min en oscuridad; para terminar la reacción se agregó 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. Se determinó la absorbancia a 450 nm.

### 3.3.6. Transformación de cepas de *B. pertussis* con plásmidos con proteínas GFP

Cepas clínicas de *B. pertussis* fueron marcadas con GFP, transformando las mismas con el plásmido pGBSp1-GFP, siguiendo el protocolo detallado por Zealey *et al.* (2000) [26]. Brevemente, se aisló el plásmido pGBSp1-GFP de la cepa Bp536 utilizando el kit comercial de *miniprep* (QIAGEN). A continuación se prepararon células electrocompetentes de las cepas Bp462, Bp892, Bp2751, H973, H921 y STO1-SEAT004. Se inocularon 100 mL de medio SS con un cultivo de 24 h previo de la respectiva cepa, obteniendo una  $\text{DO}_{650}$  inicial de 0,2. Los cultivos fueron crecidos durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$  y 160 rpm, hasta alcanzar una  $\text{DO}_{650}$  de entre 1 y 3. A continuación todo el procedimiento se realizó a  $4^\circ\text{C}$ . Las células fueron cosechadas por centrifugación a 8000 g 20 min. El pellet fue lavado dos veces con un volumen de  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada, seguido por centrifugación a 8000 g 20 min. Luego de los lavados, el pellet fue resuspendido en 10 mL de glicerol al 10%, seguido por una centrifugación a 8000 g 20 min. Finalmente, el pellet se resuspendió en 1 mL de glicerol al 10%, y se prepararon

alícuotas de 100  $\mu\text{L}$ , las cuales fueron inmediatamente congeladas con nitrógeno líquido y conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Para la electroporación, 20 ng del plásmido pGBSp1-GFP fueron agregados a 100  $\mu\text{L}$  de células competentes e incubados durante 10 min en hielo. Luego, las células fueron transferidas a una cuba de electroporación de una amplitud de 0,2 mm, previamente enfriada. Se incubó 10 min en hielo y se procedió a aplicar un pulso eléctrico de 2,5 Kv y 25 F. Inmediatamente, se agregó 1 mL de medio SS y las células fueron incubadas 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$  y en agitación. Finalmente, las células fueron plaqueadas en medio BGA complementado con  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Km. Las colonias obtenidas fueron cultivadas en medio líquido y se corroboró la expresión de la proteína GFP en microscopio de fluorescencia.

### 3.3.7. Evaluación de la adhesión a cubreobjetos por microscopía de fluorescencia

La adhesión de las cepas de *B. pertussis* sobre cubreobjetos de borosilicato fue analizada mediante microscopía de fluorescencia. Se utilizaron las cepas Bp Tohama I, Bp536, Bp462, Bp892, Bp2751, H921, H973 y STO1-SEAT0004 transformadas con el plásmido pGBSp1-GFP. Cubreobjetos de borosilicato fueron utilizados como superficie. Cada cubreobjeto fue colocado dentro de un pocillo de una placa de 6 pocillos. Cada pocillo fue inoculado con un 1,5 mL de una suspensión bacteriana de la cepa correspondiente ajustada a una  $\text{DO}_{650}$  de 0,2. Luego de incubar por 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ , la suspensión bacteriana fue removida y cada pocillo fue lavado dos veces con PBS. Las bacterias que permanecieron adheridas al cubreobjeto fueron visualizadas a una utilizando un microscopio de epifluorescencia. Al menos tres experimentos independientes fueron realizados por duplicado para cada cepa. La cuantificación de las células adheridas se llevó a cabo utilizando el programa Image J [27] y el *plug-in* ITCN [28].

### 3.3.8. Formación de *biofilm* sobre cubreobjetos

La caracterización estructural de los *biofilms* formados por las cepas clínicas fue realizada utilizando un sistema de cultivo similar al de las placas multipocillo [29]. Se utilizaron placas de 6 pocillos, sobre los cuales se colocó un cubreobjetos de 22 mm x 22 mm. Los pocillos fueron inoculados de modo análogo al detallado en la Sección 2.2.2. Las placas fueron incubadas de manera inclinada, de modo tal de generar una interfase aire-líquido en la superficie del cubreobjeto. A diferentes tiempos, 24, 48, 72 y

96 h, se lavaron los cubreobjetos dos veces con PBS, y los mismos fueron montados en portaobjetos utilizando el líquido de montaje *ProLong antifade* (Invitrogen, Estados Unidos). Las muestras se mantuvieron a 4°C durante 24 h, y luego fueron visualizadas con un microscopio confocal Nikon Ti-E, adquiriendo imágenes en los planos xyz. Datos cuantitativos de la estructura de los *biofilms* fueron adquiridos utilizando el software COMSTAT2 [30].

### 3.3.9. Prueba de resistencia a antibióticos en placa y en *biofilm*

Se estudió la resistencia de las cepas clínicas a los antibióticos ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina y gentamicina. Para ello se utilizó el sistema Etest (Biomérieux), que se basa en el método de difusión en ágar. El test consiste en el empleo de una tira impregnada con un gradiente de concentración del antibiótico a estudiar. En primer lugar, se plaqueó sobre ágar BG 100  $\mu\text{L}$  de una dilución de 0,5 McFarland de cada cepa y una vez que se absorbió en el ágar, se colocó en el centro la tira correspondiente. Luego de 5 días de incubación a 37°C, se genera un halo de inhibición elíptico, el punto donde el halo intercepta la tira se lee como la mínima concentración inhibitoria del antibiótico, marcado dentro de una escala impresa en la tira.

Para el estudio de la resistencia de los *biofilms* a antibióticos se utilizó el sistema de placas de 96 pocillos. Luego de 24 h de crecimiento en *biofilm*, el medio usado fue cambiado por medio fresco conteniendo concentraciones crecientes de ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina y gentamicina, luego de lo cual las placas fueron incubadas durante 24 h adicionales. El medio conteniendo los antibióticos fue cambiado por medio fresco sin antibióticos, y las placas fueron incubadas durante otras 24 h. durante este tiempo, aquellas células que permanecieron viables del *biofilm* crecerán y actuarán como inóculo del medio agregado. Alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  tomadas del medio líquido de cada pocillo fueron colocadas sobre placas ABG, que fueron incubadas durante 4 días a 37°C. La concentración mínima bactericida sobre el *biofilm* es definida como la mínima concentración de antibiótico en la cual no se observa crecimiento en las placas de ágar.

### 3.3.10. Disrupción enzimática de *biofilms* preformados

Con el fin de observar la influencia de determinadas enzimas sobre la formación de *biofilm* de las cepas en estudio, se crecieron las mismas durante 96 h sobre placas multipocillo. Luego de que el medio fuera removido se agregó 100  $\mu\text{L}$  de DNasaI (40U  $\text{mL}^{-1}$ , Sigma), pronasa E (1 mg  $\text{mL}^{-1}$ , Sigma), o metaperiodato de sodio (40 mM, pH 5). Los pocillos correspondientes a los controles fueron llenados con los respectivos buffer de reacción, buffer de reacción de DNasaI (Tris-HCl 10mM,  $\text{MgCl}_2$  2,5mM,  $\text{CaCl}_2$  0,5mM pH7,6), buffer de reacción de pronasa E (Tris-HCl 10 mM pH 7.5), o bien  $\text{H}_2\text{O}$  en el caso de metaperiodato. Luego de incubar las placas durante 2 h a  $37^\circ\text{C}$ , los *biofilms* fueron lavados y teñidos con CV, y se determinó la A540.

### 3.3.11. Preparación de muestras de ARN

Se extrajo ARN siguiendo el protocolo detallado por Nicholson y colaboradores (2012) [31]. Brevemente, se inocularon colonias aisladas en medio SS y se dejaron crecer los cultivos en agitación a  $37^\circ\text{C}$ . Luego, los cultivos fueron subcultivados en frascos erlenmeyer a una  $\text{DO}_{650}$  inicial de 0,2. Se cosecharon muestras para ARN una vez que los cultivos alcanzaron una  $\text{DO}_{650}$  de un valor de 1. Por otro lado, se obtuvieron muestras de *biofilm* cultivados en placas de Petri de vidrio, extrapolando el sistema de cultivo en placas multipocillo. Las muestras de *biofilm* se cosecharon a las 72 h de cultivo. En todos los casos, el ARN fue purificado utilizando el kit comercial *Qiagen RNeasy* (Qiagen)

### 3.3.12. Preparación de ADNc y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

El ARN purificado fue tratado con la enzima DNasaI (Promega, Madison, USA) por 45 min a  $37^\circ\text{C}$  para remover el ADN contaminante y luego se sintetizó el ADNc (ADN complementario) utilizando *random hexamers* (Promega, Madison, USA) como cebadores y la enzima retrotranscriptasa reversa M-MLV (Life Technology, Invitrogen). Para controlar la eficacia del tratamiento de remoción de ADN contaminante así como también de la obtención de ADNc se realizaron reacciones de PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) control utilizando cebadores específicos para genes expresados por *B. pertussis* en ambas condiciones de crecimiento. El ADNc fue almacenado a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Se analizó la expresión diferencial de ARNm (ARN mensajero) entre la cepa de referencia Bp Tohama I y la cepa Bp462. Se estudiaron los siguientes genes: *fim2* (en el caso de Bp Tohama I), *fim3* (en el caso de las cepas clínicas) y *bpsA*. Para la cuantificación de los fragmentos de amplificación se utilizó el fluoróforo SYBR Green (Thermo Scientific, USA). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95°C por 3 min para la activación de la enzima, seguido de cuarenta ciclos de: 95°C por 30 seg, 58°C 15 seg y 72° 30 seg. Como gen *house keeping* se utilizó *rpoD* [31]. De cada condición de cultivo se analizaron triplicados y en cada corrida se incluyeron duplicados técnicos. Una vez finalizada la amplificación se obtuvieron los valores de ciclo umbral (Ct) que fueron analizados según el modelo de  $\Delta\Delta Ct$  siguiendo lo descrito por Conover y col. [18]. La lista de los cebadores diseñados se detalla en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Lista de cebadores utilizados en ensayos de qPCR.

Nombre	Secuencia
<i>fim2</i> -F	TGGCCTCCTACGTAAAAAG
<i>fim2</i> -R	ACCACGGAAAAAACCATA
<i>fim3</i> -F	GAGCTACACCCTGCGTATC
<i>fim3</i> -R	CTTCCTTGGGTTTCTTCACG
<i>bpsA</i> -F	CGCTGCTGACCATGGATT
<i>bpsA</i> -R	CTGGTGACAGCATGGTGTTGA
<i>rpoD</i> -F	ATGGGCATCCGCTTCACG
<i>rpoD</i> -R	CTTCGTCCAACACCCAC

### 3.3.13. Adhesión a células epiteliales A549

Células epiteliales alveolares humanas (A549) fueron mantenidas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's *medium*) con 10% de suero fetal bovino y 4mM de l-glutamina a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células fueron cosechadas al alcanzar un 90% de confluencia y repicadas con aproximadamente 2 10<sup>5</sup> células por pocillo, en placas de 24 pocillos, e incubadas durante 12 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las placas fueron inoculadas con suspensiones bacterianas de las distintas cepas a una concentración de 2 10<sup>6</sup> UFC/mL, preparadas en medio DMEM sin antibióticos, alcanzando una multiplicidad de infección (MOI) de 10. Los inóculos utilizados fueron plaqueados en placas ABG para determinar

las UFC y verificar la MOI. Los ensayos de adhesión se llevaron a cabo por triplicado. Se procedió a remover el medio de cultivo de las células, se lavó tres veces con PBS y se agregó o bien medio sólo o 1 mL de inóculo bacteriano. Las placas fueron centrifugadas por 5 min a 900 rpm e incubadas a 37°C durante 15 min, con el objetivo de facilitar el contacto entre las bacterias y las células epiteliales. Las células eucariotas fueron luego lisadas con saponina al 0,05% y el número de bacterias adheridas fue enumerado por plaqueo en placas ABG [32].

### 3.3.14. Ensayos con animales

Ensayos de infección en ratones B57BL/6 fueron llevados cabo con las cepas Bp Tohama I, Bp462 y STO1-SEAT0004. Grupos de 5 ratones de entre 5 y 8 semanas de edad fueron anestesiados en cámara con 2,5% de isoflurano e inoculados intranasalmente con 50 µL de una suspensión bacteriana, conteniendo aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC. Luego de 4, 10 y 25 días post infección, los ratones fueron sacrificados en cámara con 5% de isoflurano, seguido de dislocación cervical. Se colectaron los pulmones, la tráquea y el septo nasal. En el caso de los pulmones, los lóbulos izquierdos fueron utilizados para recuperar las bacterias, mientras que los lóbulos derechos fueron conservados en formalina al 10% para su posterior análisis patológico. Los órganos fueron homogeneizados o disgregados en PBS-caseína al 1%, para recuperar las bacterias de cada tejido. Finalmente, se realizaron recuentos en placas ABG suplementadas con  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cefalexina.

### 3.3.15. Bioética

Todos los procedimientos analíticos descriptos involucrando aislados clínicos no requirieron aprobación de un Comité de Ética. Los aislados clínicos de Argentina fueron obtenidos del Hospital de Niños de La Plata y en ningún caso los pacientes fueron identificados. Por otro lado, los aislados clínicos de Estados Unidos fueron obtenidos de un repositorio que permite el acceso a investigadores para el uso de microorganismos publicados en trabajos científicos, en este caso particular, *BEI Resources* administrado por el ATCC (*American Type Culture Collection*).

La cría de animales y procedimientos experimentales con los mismos se realizaron de acuerdo a políticas vigentes en Estados Unidos, del *Public Health Service*, y recomendaciones de la *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory*



*Animal Care (AAALAC) y bajo aprobación del Wake Forest University Health Sciences Institutional Animal Care and Use Committee.*

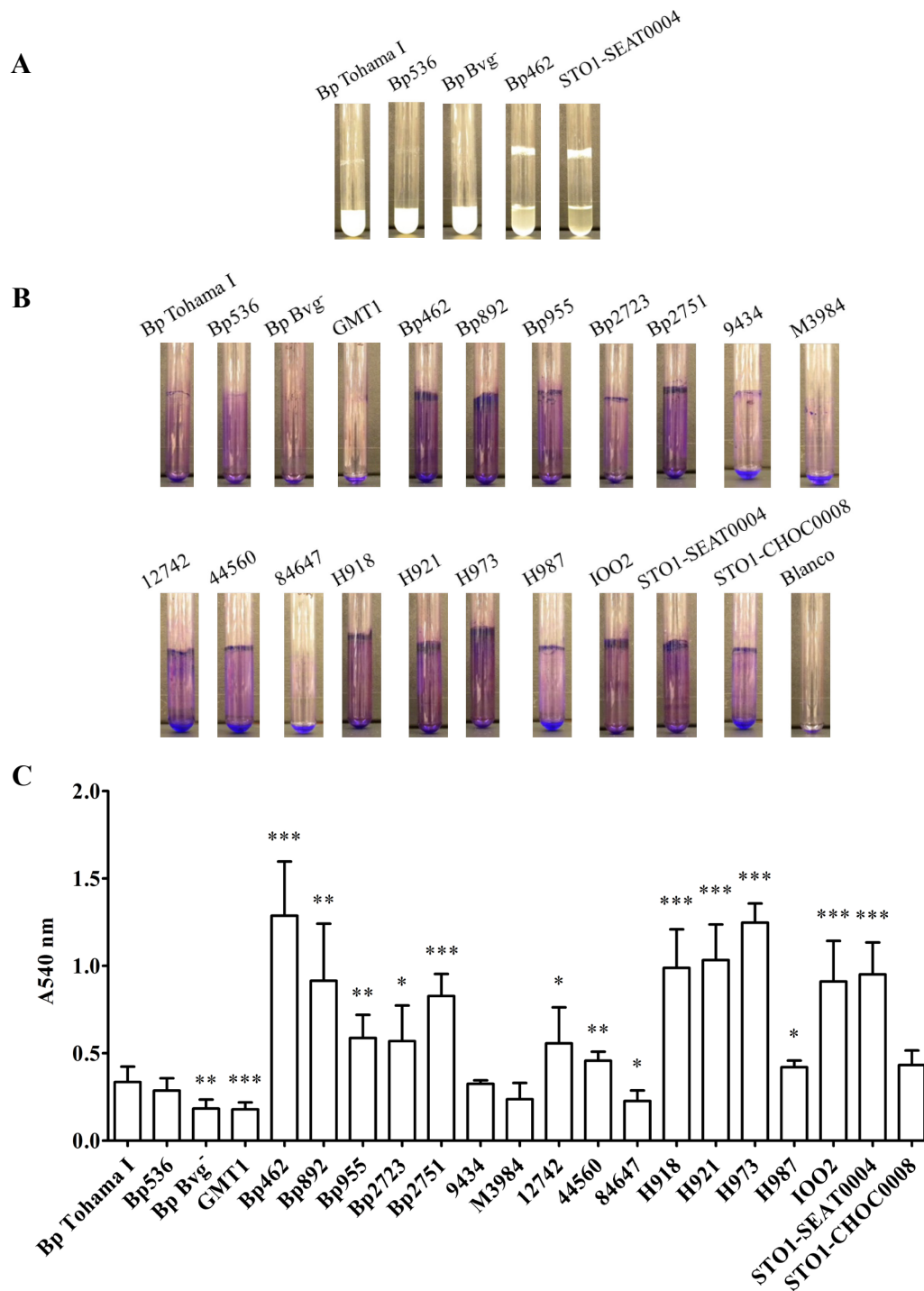


### 3.4. Resultados

#### 3.4.1. Cuantificación por Cristal Violeta de *biofilms* formados por cepas clínicas provenientes de Argentina y de Estados Unidos

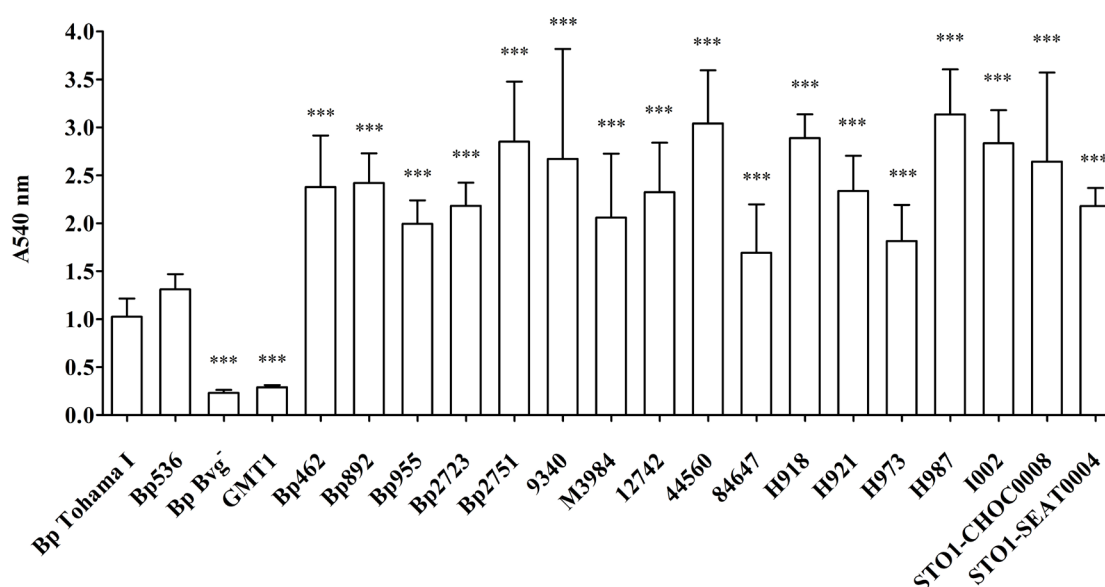
Los aislados clínicos utilizados en los siguientes estudios corresponden a bacterias de las cuales 5 fueron recuperadas en Argentina y que fueron descriptas y utilizadas en el Capítulo 2, y a una colección de cepas aisladas en Estados Unidos, algunas de ellas pertenecientes al brote epidémico registrado en ese país durante el año 2012. Previamente describimos que los aislamientos clínicos provenientes de Argentina poseen una mayor capacidad de formación de *biofilm*, en este Capítulo pretendemos profundizar la caracterización de dichos *biofilms* y ampliar el espectro de cepas clínicas utilizando aislados de otro país.

En primera instancia observamos que al cultivar por 24 h ciertas cepas en estudio en tubos de ensayo, las mismas formaban un anillo en la interfase aire-líquido que posee un espesor mayor al de la cepa de referencia Bp Tohama I. A su vez, resultó evidente en ciertos casos que, la mayor parte del crecimiento bacteriano se veía asociado al *biofilm* formado en las paredes del tubo y que el crecimiento en el medio de cultivo mostraba grumos, los cuales luego de permanecer en suspensión bajo agitación, en condiciones estáticas decantaban, como puede observarse a modo de ejemplo en la **Figura 1.A**. Esta fue la primera evidencia que tanto las cepas clínicas provenientes de Argentina como de Estados Unidos tendrían potencialmente la misma capacidad de sobre-producir *biofilms*. Los *biofilms* formados en tubos de ensayos fueron teñidos con CV y cuantificados (**Figura 1.B y C**). En este tipo de sistema, la mayoría de los aislados clínicos presentaron elevados niveles de *biofilm*, siendo hasta tres veces mayor que el observado para la cepa de referencia Bp Tohama I y también Bp536.



**Figura 1.** Análisis de la capacidad de formación de *biofilm* de cepas clínicas de *B. pertussis*. **A.** Visualización de cultivos de cepas de *B. pertussis* en tubos de ensayo, siendo evidente la formación de un anillo de mayor espesor en las cepas clínicas con respecto a las cepas de referencia. **B.** Visualización de los *biofilms* formados por cepas clínicas y de referencia luego de la tinción con CV. **C.** Cuantificación del cristal violeta retenido en las paredes de los tubos de ensayo. En todos los casos se muestran cultivos de 24 h incubados a 37°C e inoculados con una DO<sub>650</sub> inicial de 0,2. Se incluyeron las cepas de referencia Bp Tohama I y Bp536, y una cepa avirulenta (Bvg<sup>-</sup>). Se presentan las absorbancias promedio de dos ensayos independientes realizados por triplicado, con sus respectivas desviaciones estándar. La significancia fue analizada por medio del Test de Student, donde \* P<0,05; \*\* P<0,01 y \*\*\* P<0,001.

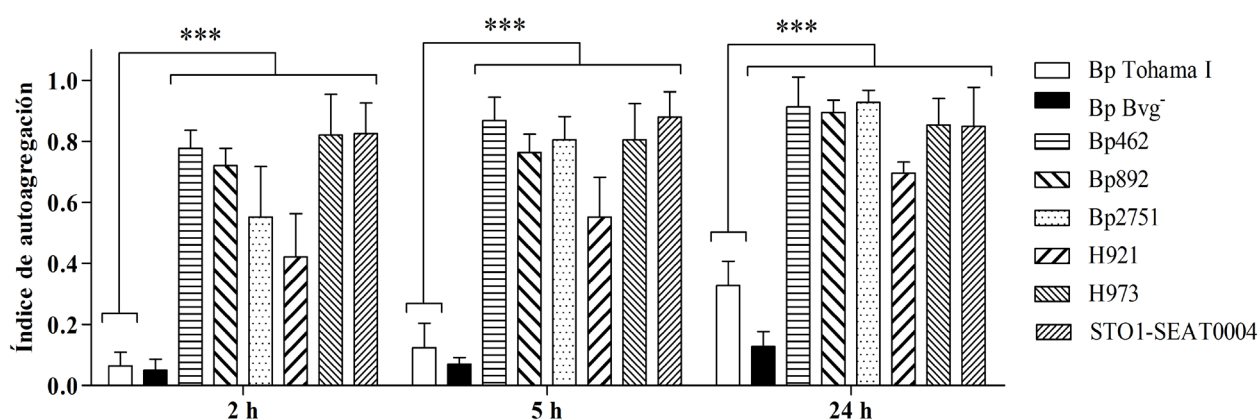
A partir de estos resultados se decidió utilizar a continuación el sistema de cultivo en placas de 96 pocillos, a modo de cuantificar el nivel de *biofilm* producido por las nuevas cepas, utilizando este sistema estandarizado. Para ello, se evaluó la biomasa adherida a los pocillos luego de 96 h de cultivo. Como se observa en la **Figura 2**, tanto las cepas clínicas argentinas, como las cepas americanas presentan una capacidad de formación de *biofilm* superior al mostrado por las cepas de referencia Bp Tohama I y Bp536, con excepción de la cepa GMT1, aislada en el año 1996, que presentó niveles similares al de la cepa avirulenta Bp369 (Bp Bvg<sup>-</sup>). Cabe señalar que la cepa GMT1 presentó una morfología de colonia indicativa de fase virulenta, es decir colonias pequeñas, de aproximadamente 1 mm de diámetro y hemolíticas en placas ABG.



**Figura 2.** Análisis de la capacidad de formación de *biofilm* de cepas clínicas de *B. pertussis* sobre superficies abióticas. Las cepas fueron cultivadas en placas de 96 pocillos durante 96 h. Las células adheridas a la superficie de las paredes de los pocillos fueron lavadas y teñidas con CV, seguida por la cuantificación de la A540 nm del cristal violeta retenido. Se incluyeron las cepas de referencia Bp Tohama I y Bp 536, y una cepa avirulenta (Bp Bvg<sup>-</sup>). Se presentan las absorbancias promedio de al menos tres replicados independientes, con sus respectivas desviaciones estándar. La significancia fue analizada por medio del Test de Student, donde \* P<0,05; \*\* P<0,01 y \*\*\* P<0,001.

### 3.4.2. Ensayos de autoagregación

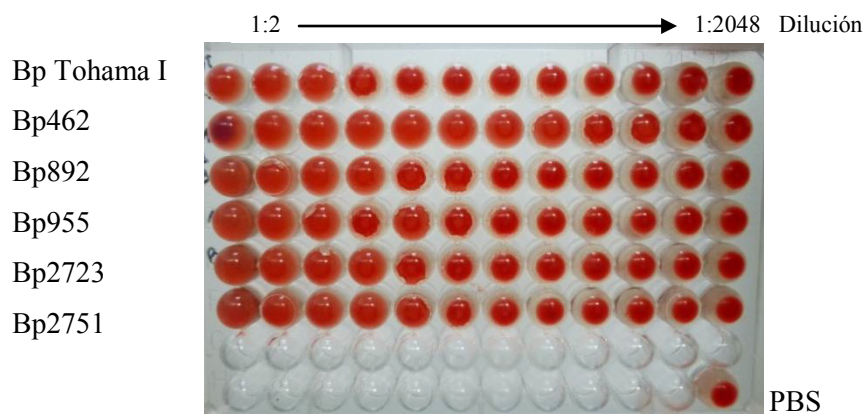
Como se mencionó previamente, una de las características evidentes observadas en los cultivos líquidos de las cepas clínicas es la formación de agregados. La capacidad de las bacterias de autoagregar ha sido directamente relacionada con la capacidad de formación de *biofilm*. El proceso de autoagregación se produce por la interacción directa entre células presentes en el medio líquido mediado por factores presentes en la superficie celular de las mismas. Por este motivo, se estudió la capacidad de autoagregación de 6 aislados clínicos (Bp462, Bp892, Bp2751, H921, H973 y STO1-SEAT0004), con respecto a la cepa de referencia Bp Tohama y la respectiva mutante avirulenta Bp369 (Bp Bvg<sup>-</sup>). Para ello, se prepararon suspensiones bacterianas en medio base SS a una DO<sub>650</sub> igual a 1, y se incubaron de forma estática, sin perturbaciones, a temperatura ambiente. A distintos tiempos del ensayo se tomaron 100 μL de la parte superior de la suspensión y se midió su correspondiente DO<sub>650</sub>. En todas las cepas clínicas se observó una exacerbada capacidad de autoagregación, siendo evidente a las 2 h de incubación (**Figura 3**).



**Figura 3.** Cuantificación de la agregación celular de las cepas Bp Tohama I, Bp Bvg<sup>-</sup>, Bp462, Bp892, Bp2751, H921, H973 y STO1-SEAT0004. El índice de autoagregación fue calculado como  $(DO_0 - DO_t)/DO_0$ , donde  $DO_0$  corresponde a la absorbancia inicial y  $DO_t$ , a la absorbancia en el tiempo analizado. Se muestran los valores promedios de seis replicados con sus respectivos valores de desviación estándar. \*\*\*,  $P < 0,001$  (Test de Student).

### 3.4.4. Ensayo de hemaglutinación

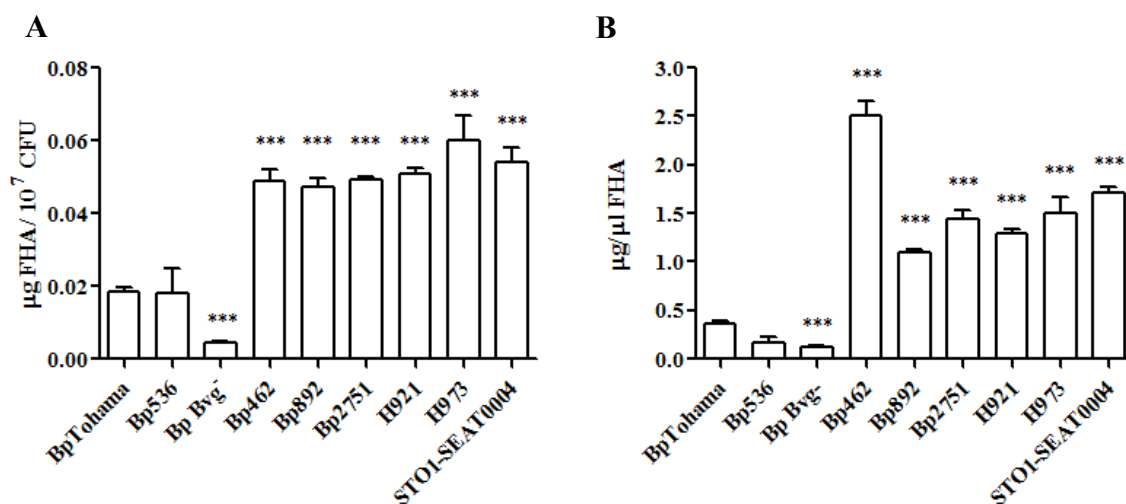
La capacidad de producir hemaglutinación fue estudiada en las cepas clínicas obtenidas en Argentina. Brevemente, diluciones seriadas a partir de suspensiones bacterianas de  $DO_{650}$  igual a 1 fueron puestas en contacto con una suspensión de eritrocitos al 2% obtenidos de sangre desfibrinada de carnero. Como se observa en la **Figura 5**, las cepas clínicas argentinas estudiadas también mostraron una mayor actividad de hemaglutinación con respecto a la cepa de referencia, siendo necesarias entre 1 y 5 diluciones seriadas más para observar la ausencia de hemaglutinación en las cepas clínicas. La capacidad de hemaglutinación ha sido asociada con la presencia de FHA [34,35]. Una vez más estos resultados sugieren una posible mayor expresión de esta adhesina en la superficie bacteriana de los aislados clínicos estudiados.



**Figura 5.** Determinación cualitativa de la capacidad de hemaglutinación de cepas clínicas de *B. pertussis*. Diluciones seriadas al medio de suspensiones bacterianas de cada cepa con una  $DO_{650}$  igual a 1 fueron incubadas con una solución de eritrocitos al 2% a 4°C hasta alcanzar el punto final. El punto final se considera cuando los eritrocitos incubados con PBS decantan completamente en el fondo del pocillo.

### 3.4.3. Cuantificación de FHA por ELISA

La proteína responsable de la autoagregación en *B. pertussis* es FHA [33]. Asimismo, FHA es la adhesina más importante que promueve la producción de *biofilm* en esta bacteria [20]. Debido al hecho de que los aislamientos clínicos muestran un índice de autoagregación y una capacidad de formación de *biofilm* mayores al de la cepa de referencia, nos planteamos si estas cepas clínicas expresan una mayor cantidad de FHA. Para ello, se realizaron ensayos de ELISA a fin de determinar el nivel de expresión de dicha proteína. Todas las cepas fueron cultivadas en medio líquido hasta una  $DO_{650}$  igual a un valor de 1. Luego, 1 mL de cada cultivo fue centrifugado y resuspendido en 1 mL de PBS y dichas suspensiones se utilizaron para preparar una dilución con aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC  $mL^{-1}$ , de modo tal que cada pocillo utilizado para la determinación de FHA contenía aproximadamente  $1 \times 10^7$  UFC. Dichos valores fueron corroborados mediante recuento en placas ABG. Como se observa en la **Figura 4.A**, todas las cepas clínicas estudiadas presentan una mayor concentración de FHA asociada a su superficie celular. Debido a que FHA también es liberada al medio extracelular, se determinó, a su vez, la concentración de FHA en los sobrenadantes de cultivo de las cepas en estudio, observando nuevamente un incremento en los niveles de esta proteína, **Figura 4.B**.

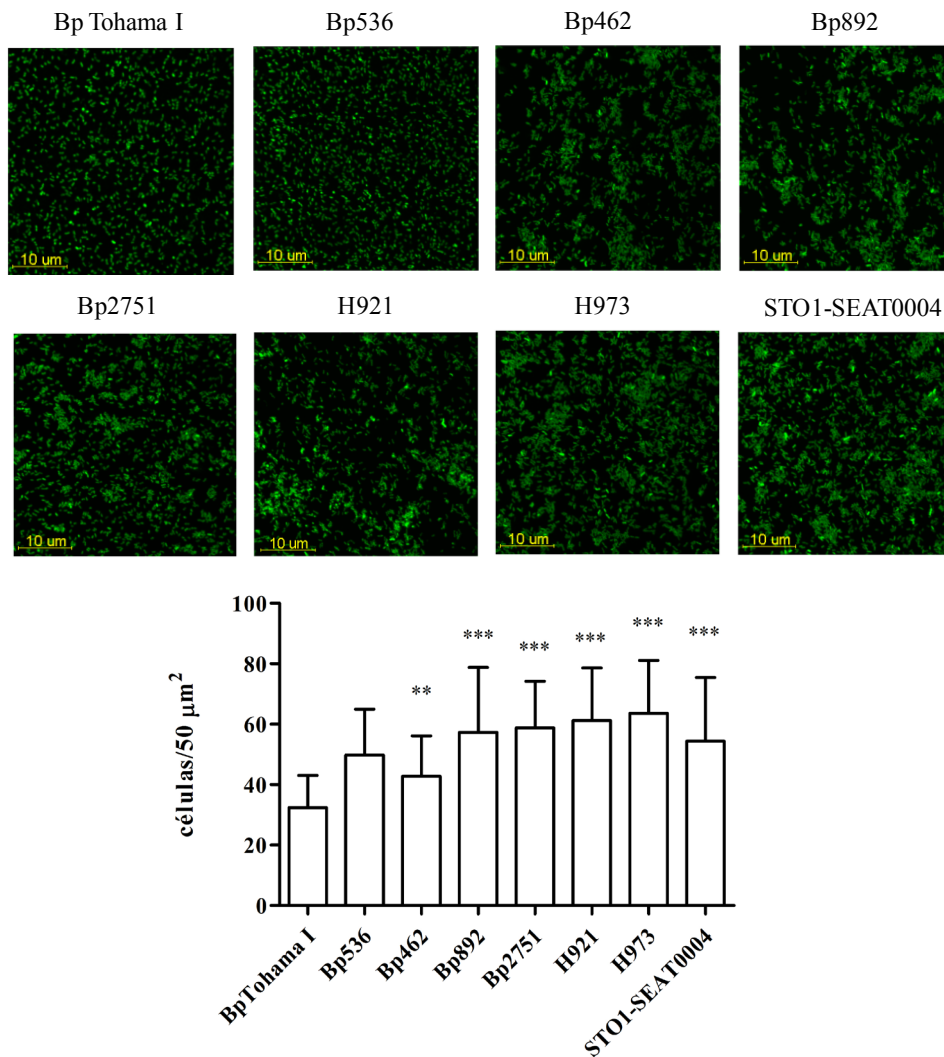


**Figura 4.** Cuantificación de FHA asociada a superficie y secretada. Se utilizaron  $10^7$  UFC (A) y sobrenadantes de cultivo (B) de las cepas *B. pertussis* Tohama I, Bp536, Bp Bvg<sup>-</sup>, Bp462, Bp892, Bp2751, H921, H973 y STO1-SEAT0004, para cuantificar la producción de FHA mediante un ensayo de ELISA. Se utilizó un suero policlonal anti-FHA obtenido en ratón, seguido por la detección con un suero de cabra anti-ratón conjugado a peroxidasa. Las barras de error indican la desviación estándar. Los asteriscos indican un valor  $P < 0,001$  (Test de Student).



### 3.4.5. Análisis de la adhesión temprana a cubreobjetos

A continuación se procedió a analizar la adhesión de las cepas clínicas a cubreobjetos de borosilicato. Para ello, se prepararon suspensiones bacterianas a una  $DO_{650}$  de 0,2 que fueron puestas en contacto con cubreobjetos durante 1 h a 37°C. Previamente, cada cepa seleccionada fue transformada por electroporación con el plásmido pGBSp1-GFP. Luego del período de incubación, se procedió a lavar dos veces con PBS y los cubreobjetos fueron montados para su posterior visualización microscópica. Como se observa en la **Figura 6**, las cepas de referencia Bp Tohama I y Bp536 mostraron una cobertura homogénea de la superficie, mientras que las cepas clínicas presentaron pequeños agregados donde las células se encontraban en contacto entre ellas. Al cuantificar el número de células presentes en una superficie de  $50 \mu\text{m}^2$  al cabo de 1 h de contacto, las cepas clínicas mostraron un mayor número de células que la cepa Bp Tohama I. La mayor expresión de adhesinas como FHA y Fim en la superficie de las células no necesariamente explicaría el incremento de la adhesión, siendo que la superficie en estudio es abiótica, otros factores podrían verse involucrados en el proceso, como la variación de cargas presente en la membrana celular.



**Figura 6.** Cuantificación de la adhesión a cubreobjetos de borosilicato. Bacterias adheridas a cubreobjetos durante 1 h a 37°C de Bp Tohama I, Bp536, Bp462, Bp892, Bp2751, H921, H973 y STO1-SEAT0004 fueron visualizadas bajo microscopio confocal y luego contadas con el software ImageJ. Los resultados se muestran como los valores promedio de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado, donde se eligieron al azar cuatro regiones para la determinación del número de bacterias. Las barras de error indican la desviación estándar. Las diferencias estadísticas fueron determinadas contra Tohama I, mediante el Test de Student, donde \*\*,  $P < 0,01$  y \*\*\*,  $P < 0,001$ .

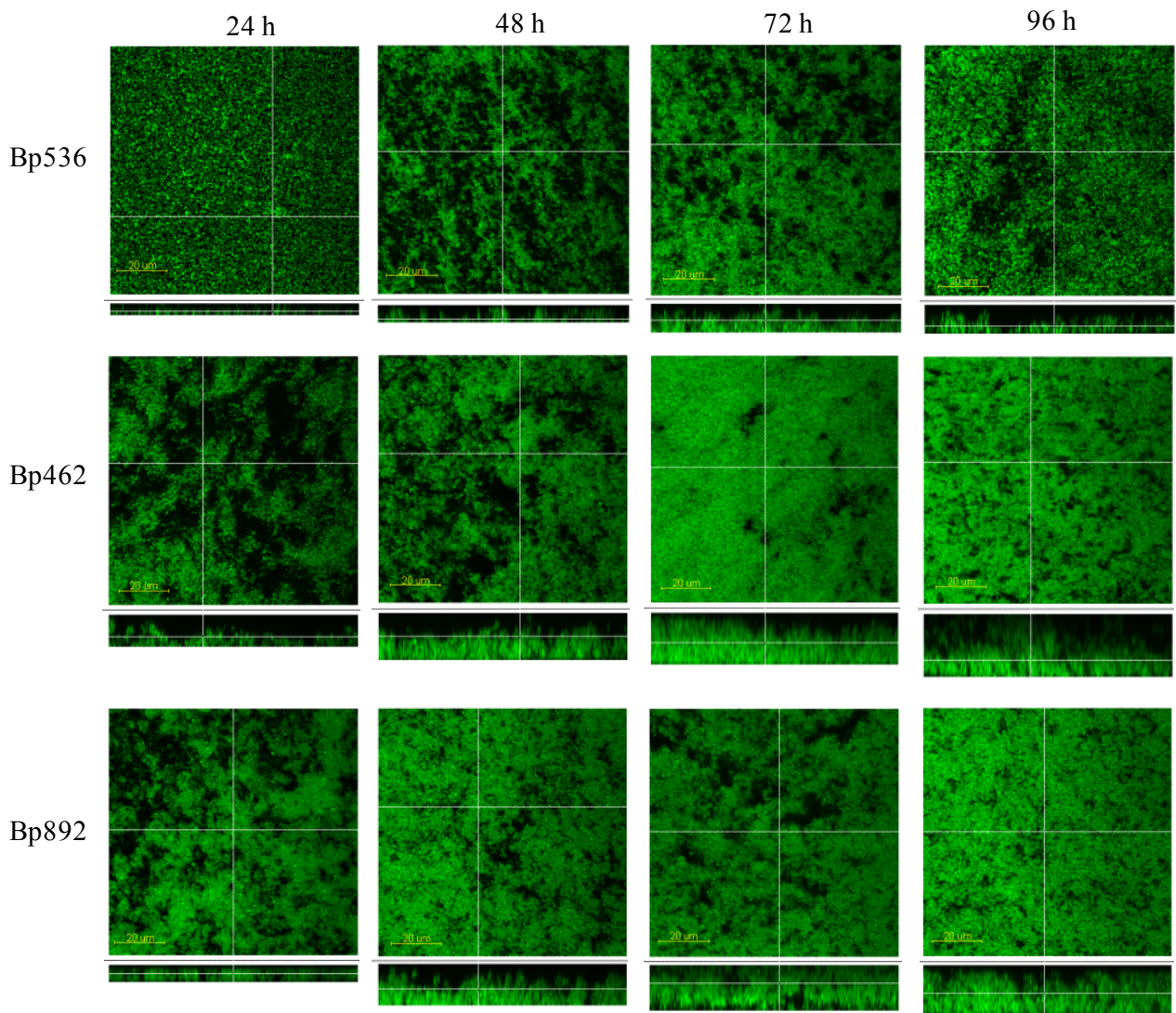
### 3.4.6. Análisis estructural de los *biofilms* por Microscopía confocal

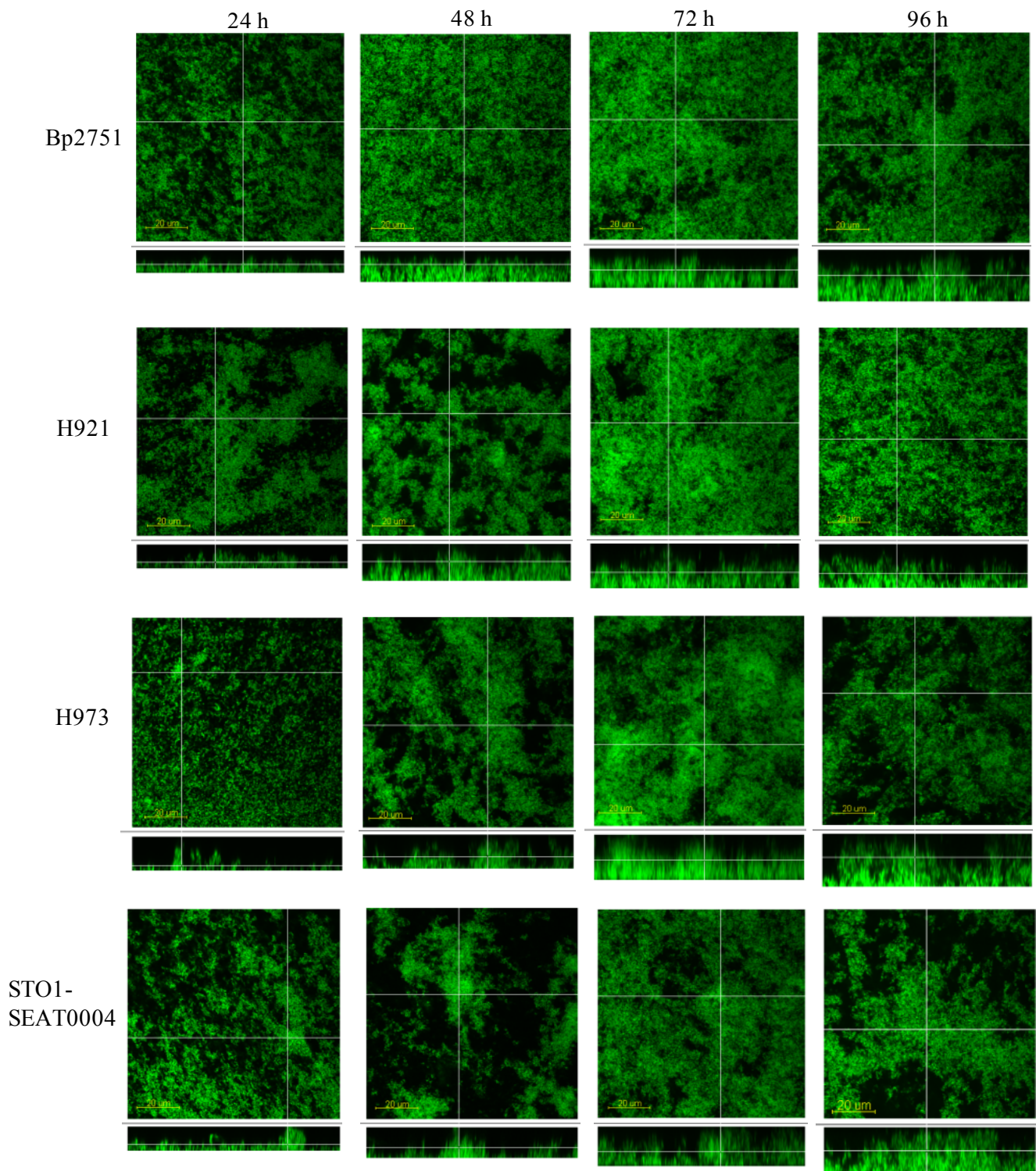
Con el fin de analizar estructuralmente los *biofilms* formados por la cepas clínicas, se utilizó un sistema de cultivo derivado de las placas multipocillos, en el cual se colocó un cubreobjetos en la base del pocillo de una placa de 6 pocillos, y se incubó la misma de forma inclinada, a modo de obtener una interfase aire-líquido en el cubreobjeto. Las cepas fueron incubadas durante diferentes períodos de tiempo y se adquirieron imágenes utilizando un microscopio confocal Nikon Ti-E. Estos estudios se llevaron a cabo comparando el crecimiento con la cepa Bp536, debido a que el desarrollo de Bp Tohama I en este sistema de cultivo resultó mínimo. En este contexto cabe señalar que las cepas clínicas forman significativamente más *biofilm* que la cepa Bp536, aunque ésta presente una mayor producción de *biofilm* que Bp Tohama I, como se observa en las **Figuras 1 y 2**.

En la **Figura 7** se muestran imágenes representativas de los *biofilms* producidos por las cepas investigadas desde las 24 a las 96 h de cultivo. Desde etapas tempranas, 24 h de incubación, las cepas clínicas mostraron una mayor estructuración, observándose microcolonias, o una organización más compleja en comparación a la cepa Bp536, que mostró una cobertura homogénea de la superficie, con poca estructuración. En etapas tardías, 72 y 96 h, las cepas clínicas presentaron un desarrollo marcadamente superior al de la cepa de referencia. A efectos de analizar cuantitativamente los cambios en la arquitectura de los distintos *biofilms* a lo largo de su formación, utilizamos el software COMSTAT2. Las imágenes fueron entonces procesadas a modo de obtener parámetros cuantitativos de los *biofilms*, los cuales se presentan en la **Tabla 2**. Fueron analizadas la biomasa (como medida del volumen de biomasa dividido por el área de sustrato), la altura máxima del *biofilm*, la altura promedio del *biofilm* y la rugosidad (como representación de la variabilidad en la altura del *biofilm*). Como conclusiones de este análisis podemos destacar que desde las 24 h de cultivo, las cepas clínicas muestran diferencias significativas en los parámetros de las principales características de los *biofilms*. En particular, a las 24 h se observan valores de biomasa entre 2-8 veces mayores que en la cepa de referencia Bp536, lo mismo se puede decir de los parámetros de altura máxima y de altura promedio, siendo entre 1,1-2,4 y 1,6-1,9 veces superiores respectivamente. A las 96 h de cultivo en *biofilm*, se encontraron valores de biomasa, altura máxima y altura promedio entre 1,1-5,4, 1,9-2,1 y 1,4-3,9 veces mayores a los hallados en la cepa Bp536.

### Capítulo 3

En el caso particular del parámetro de rugosidad, se encontró que las cepas argentinas mostraron valores significativamente menores al de la cepa Bp536, no así para el de las cepas americanas. Una apreciación que se pudo hacer al tomar las imágenes microscópicas es que las cepas aisladas en Argentina presentan *biofilms* más compactos, con canales dispuestos de una forma casi regular y de similar tamaño, mientras que las cepas americanas presentaron una disposición más heterogénea en su distribución de la superficie cubierta.





**Figura 7.** Análisis por microscopía confocal de los *biofilms* de cepas de *B. pertussis*. Las cepas marcadas con GFP fueron crecidas sobre cubreobjetos colocados dentro de placas de 96 pocillos durante 24, 48, 72 y 96 h. Se representan imágenes en planos xy y xz.

### Capítulo 3

**Tabla 2.** Análisis cuantitativo de las características estructurales de *biofilms* de *Bordetella*.

	Bp536	Bp 462	Bp892	Bp2751	H921	H973	STO1- SEAT0004
24h							
Biomasa <sup>a</sup> ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ )	0,829 (0,259)	2,443 (0,636)	2,522 (0,509)	5,789 (1,055)	1,397 (0,594)	1,489 (1,017)	1,686 (0,599)
Valor <i>P</i>		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,01	<0,0001
Altura máxima ( $\mu\text{m}$ )	6,064 (1,731)	11,417 (3,554)	6,727 (2,611)	11,545 (2,945)	15 (3,488)	13,9 (3,725)	14,417 (2,678)
Valor <i>P</i>		<0,0001	ns	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Altura promedio <sup>b</sup> ( $\mu\text{m}$ )	1,575 (0,311)	4,237 (0,528)	3,857 (0,555)	3,815 (1,992)	4,033 (0,801)	4,181 (2,719)	4,313 (1,201)
Valor <i>P</i>		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Coefficiente de rugosidad <sup>c</sup>	1,263 (0,272)	0,899 (0,191)	0,812 (0,337)	0,952 (0,354)	1,245 (0,244)	1,275 (0,263)	1,208 (0,213)
Valor <i>P</i>		<0,001	<0,0001	<0,01	ns	Ns	ns
48 h							
Biomasa ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ )	1,211 (0,525)	6,004 (2,278)	5,349 (1,629)	5,658 (3,126)	2,581 (0,959)	2,807 (1,128)	2,038 (0,574)
Valor <i>P</i>		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Altura máxima ( $\mu\text{m}$ )	7,545 (2,807)	19 (5,961)	17,467 (2,295)	17,154 (3,760)	17,545 (5,279)	18,133 (5,718)	17,364 (4,154)
Valor <i>P</i>		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Altura promedio ( $\mu\text{m}$ )	2,468 (0,913)	8,384 (2,795)	7,582 (1,792)	8,754 (3,883)	5,395 (1,978)	6,360 (2,912)	4,912 (1,374)
Valor <i>P</i>		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Coefficiente de rugosidad	1,314 (0,376)	0,554 (0,208)	0,574 (0,232)	0,527 (0,365)	1,971 (1,042)	0,979 (0,213)	1,253 (0,285)
Valor <i>P</i>		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,05	<0,01	ns
72 h							
Biomasa ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ )	1,678 (0,869)	7,796 (4,917)	7,609 (3,328)	5,230 (4,865)	4,665 (1,663)	4,368 (2,603)	3,190 (1,559)
Valor <i>P</i>		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Altura máxima ( $\mu\text{m}$ )	10,357 (3,325)	21,438 (4,131)	20,882 (5,290)	19,643 (5,198)	21,650 (3,870)	21,833 (6,061)	18,429 (3,131)
Valor <i>P</i>		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Altura promedio ( $\mu\text{m}$ )	3,203 (1,061)	10,383 (5,456)	9,926 (3,143)	8,599 (4,535)	7,612 (2,128)	7,730 (4,320)	5,419 (1,361)
Valor <i>P</i>		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Coefficiente de rugosidad	1,272 (0,512)	0,527 (0,253)	0,481 (0,271)	0,657 (0,239)	2,482 (2,573)	1,688 (1,524)	2,241 (1,891)
Valor <i>P</i>		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,05	Ns	<0,05

96h							
Biomasa ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ )	2,036 (1,275)	7,872 (5,192)	11,737 (3,333)	3,336 (1,619)	3,034 (1,545)	2,222 (0,505)	3,129 (0,885)
Valor P		<0,0001	<0,0001	<0,05	ns	Ns	<0,05
Altura máxima ( $\mu\text{m}$ )	9,500 (2,067)	19,923 (5,612)	20,125 (0,991)	20,067 (2,549)	17,813 (4,293)	18,222 (1,856)	20,231 (5,003)
Valor P		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Altura promedio ( $\mu\text{m}$ )	3,586 (1,214)	10,302 (5,036)	14,067 (2,475)	6,584 (1,824)	6,538 (1,909)	5,174 (1,105)	7,751 (2,015)
Valor P		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,01	<0,0001
Coefficiente de rugosidad	1,494 (0,088)	0,550 (0,336)	0,237 (0,104)	0,756 (0,236)	0,870 (0,248)	1,063 (0,105)	0,801 (0,174)
Valor P		<0,05	<0,001	ns	ns	Ns	ns

Las series de imágenes fueron adquiridas con un microscopio Nikon Ti-E, con un intervalo en el eje z de 0,9  $\mu\text{m}$ . Las imágenes fueron analizadas con el *plug-in* COMSTAT2. Se muestran los valores promedios de cada parámetro, de al menos cuatro imágenes obtenidas en cada uno de los cuatro replicados independientes realizados. Se presenta la desviación estándar entre paréntesis. Los valores P fueron determinados por el Test de Student

<sup>a</sup> Este parámetro representa el volumen de biomasa dividido por el área del sustrato.

<sup>b</sup> Este parámetro es calculado sólo sobre la biomasa (no se considera el área descubierta).

<sup>c</sup> Este parámetro representa la variabilidad en la altura del biofilm.

### 3.4.7. Tratamiento enzimático de los *biofilms*

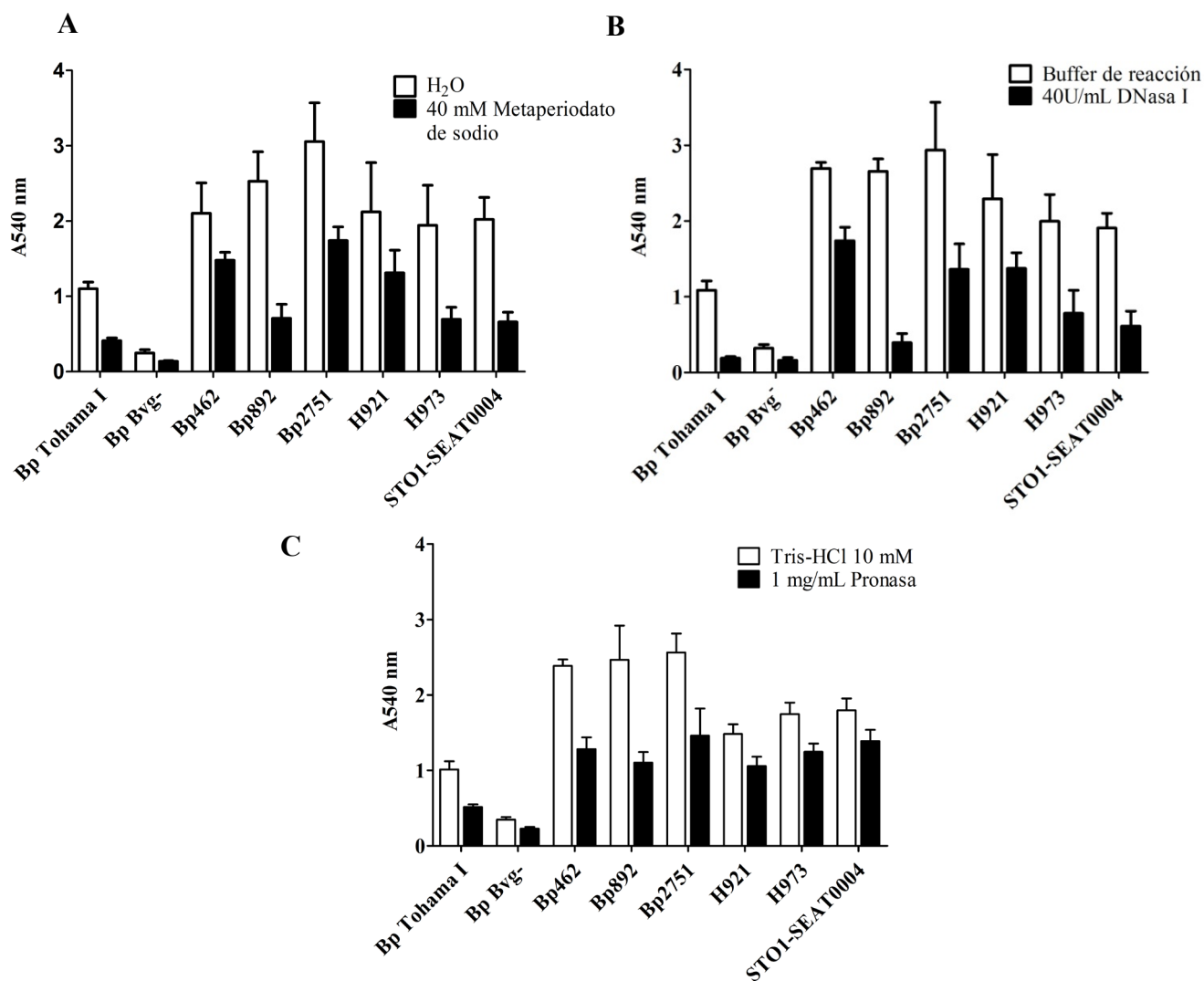
A continuación, buscamos comprender más acerca de la estructura de los *biofilms* formados por las cepas clínicas examinando los componentes presentes en los mismos. Ha sido demostrado que el metaperiodato de sodio ( $\text{NaIO}_4$ ) puede disgregar los *biofilms* que contienen PIA (*polysaccharide intracellular adhesin*) o PNAG (poli-N-acetil glucosamina) como componentes de su matriz extracelular por medio de la oxidación de los mismos [34, 35]. En el caso de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* ha sido descrita la presencia de un polisacárido similar al PNAG en la matriz extracelular de sus *biofilms*. A modo de analizar la contribución de este tipo de exopolisacárido en los *biofilms* producidos por las cepas clínicas, se realizó un tratamiento con metaperiodato de sodio sobre *biofilms* preformados, luego de 96 h de cultivo. Como se muestra en la **Figura 8.A**, el tratamiento lleva a la reducción de la estabilidad del *biofilm*, aunque no completa, y en algunos casos alcanzando niveles restantes de *biofilm* similares al de la cepa de referencia.

Otro de los componentes clave presentes en la matriz extracelular y que contribuye a la estabilidad del *biofilm* es el ADN extracelular (ADNe). Por este motivo,

estudiamos la participación del ADNe en la estabilización de los *biofilms* producidos por las cepas clínicas. Para ello, *biofilms* de 96 h fueron tratados con  $40 \text{ U mL}^{-1}$  de DNasa I. En este caso, el efecto de la enzima también facilitó la disrupción de los mismos, observándose incluso un nivel remanente de *biofilm* inferior al de los otros tratamientos realizados (**Figura 8.B**).

Finalmente, la presencia de proteínas dentro de la matriz extracelular también ha sido caracterizada como estabilizadora en ciertos casos, como por ejemplo las proteínas de tipo Bap [36]. En el caso particular de *B. pertussis*, FHA secretada dentro de la matriz extracelular favorece el contacto entre células, actuando posiblemente como estabilizadora de la estructura de estos *biofilms* [20]. En este caso, los *biofilms* preformados fueron tratados con  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  de pronasa. Nuevamente, se observó una disminución de la biomasa del *biofilm*, aunque no completa, y en algunos casos alcanzándose niveles similares al de la cepa de referencia. Es posible que este tratamiento influya en la acción estabilizadora de proteínas que median la interacción entre las células dentro del *biofilm*, como FHA y Fim.

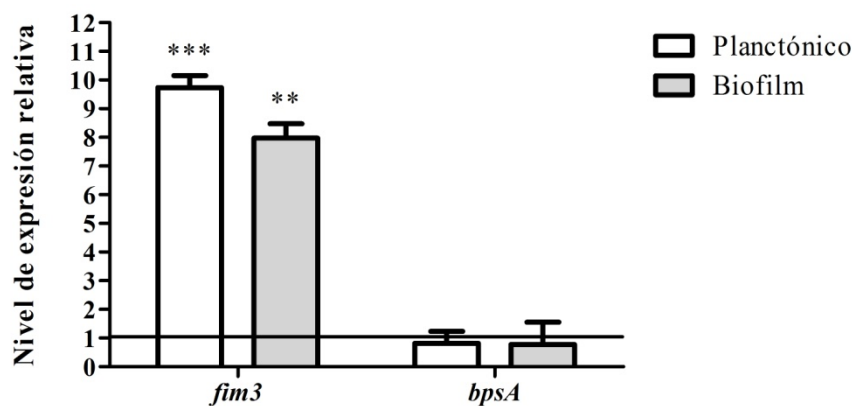




**Figura 8.** Dispersión de *biofilms* de cepas de referencia y cepas clínicas por medio de metaperiodato de sodio, pronasa E y DNasa I. *Biofilms* maduros de 96 h fueron tratados con NaIO<sub>4</sub> en H<sub>2</sub>O (A), pronasa E en buffer Tris (B) y DNasaI en buffer de reacción (C) durante 2 h a 37°C. Como control, los *biofilms* fueron tratados con los respectivos buffer de reacción. Se muestran valores promedios representativos de un ensayo con sus respectivas desviaciones estándar.

### 3.4.9. Análisis de la expresión de *fim* y *bpsA* en cultivos planctónico y en *biofilm*

El hecho de que las cepas clínicas presentan una mayor capacidad de formación de biofilm, nos llevó a analizar la expresión de factores cuya contribución al desarrollo sésil ha sido reportada. Dichos factores, además de FHA, son Fim y el exopolisacárido Bps [13,17]. A modo de evaluar la expresión de dichos factores recurrimos a la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real. Para ello, se obtuvieron muestras de ARN provenientes de cultivos en biofilm de 72 h de las cepas Bp Tohama I y Bp462, las cuales fueron comparadas con las correspondientes muestras obtenidas de cultivos líquidos agitados, en fase de crecimiento exponencial. Para estudiar el nivel de expresión de Fim se evaluaron los niveles de *fim2* en Bp Tohama I y de *fim3* en Bp462. Por otro lado, la contribución a la síntesis de Bps fue evaluada mediante el gen *bpsA*, el primer gen del operón *bpsABCD*. BpsA es una proteína de membrana externa putativa. Como se observa en la **Figura 9**, *fim3* se encuentra sobreexpresado en el aislado clínico Bp462 tanto en cultivo planctónico como en cultivo en biofilm. Sin embargo, *bpsA* no presenta diferencias significativas en su expresión relativa en Bp462 en ninguna de las condiciones ensayadas.



**Figura 9.** Expresión relativa de los genes *fim3* y *bpsA* en Bp462 con respecto a Bp Tohama I. El nivel de expresión relativa se determinó por medio de *PCR* cuantitativa en tiempo real en *biofilms* cultivados durante 72 h y en cultivos planctónicos en fase de crecimiento exponencial (el nivel de expresión de *fim2* y *bpsA* en Bp Tohama I se indica como 1). El gen *rpoD* fue utilizado como control de estandarización. La significancia estadística de los cambios en la expresión fue analizada por el Test de Student, los asteriscos \*\* y \*\*\* indican un valor  $P < 0,01$  y  $0,001$  respectivamente. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM de al menos tres replicados biológicos y dos replicados técnicos. El nivel de cambio fue calculado utilizando el método  $\Delta\Delta Ct$ .

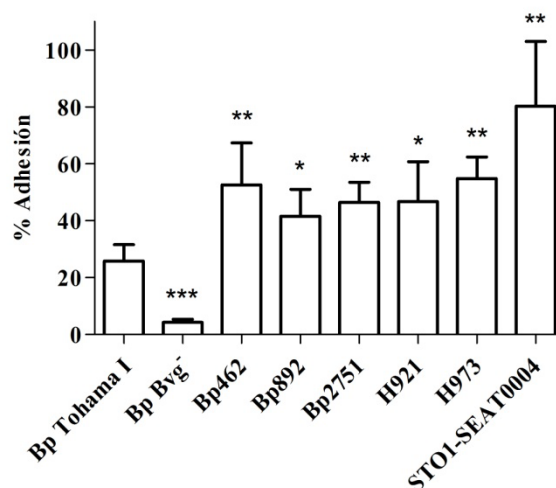
#### 3.4.8. Resistencia a antibióticos

Una característica particular de las células sésiles que forman los *biofilms* es la capacidad de resistir concentraciones más altas de antibióticos que sus contrapartes células planctónicas. Esto puede deberse en parte a la presencia de la matriz extracelular, que podría actuar como una barrera protectora, en la que ciertos antibióticos no pueden penetrar, y en otra parte a la presencia de bacterias dentro del *biofilm* cuyo metabolismo no se encuentra activo, es decir, que permanecen en un estado aletargado. Por lo tanto, comparamos las propiedades de resistencia a antimicrobianos de los *biofilms* producidos por cepas clínicas de *B. pertussis* con respecto a las de cultivos planctónicos (**Tabla 4**). Para ello determinamos la concentración mínima inhibitoria de las cepas aisladas en Argentina, utilizando el test comercial Etest, que se basa en la técnica de difusión en ágar. Paralelamente, determinamos la mínima concentración bactericida en *biofilms*. Para ello, se formaron *biofilms* en placas de 96 pocillos durante 24 h, luego se agregaron diferentes diluciones de cada antibiótico y finalmente se crecieron en medio libre de antibióticos por otras 24 h. La sobrevivencia de las bacterias dentro del *biofilm* se determinó colocando una alícuota de cada pocillo en placas ABG. Si bien las dos técnicas no son directamente comparables debido a que una estudia la concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento, mientras que la otra analiza la concentración que mata a todas las bacterias, aún así podemos concluir que tanto las cepas clínicas como la cepa de referencia presentan en cada condición de cultivo empleada, similar sensibilidad o resistencia a un mismo tipo de antibiótico. Asimismo, que el crecimiento en *biofilm* claramente representa una ventaja para la resistencia a antibióticos en el medio de cultivo.

**Tabla 4.** Determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) y concentraciones bactericidas mínimas de *biofilm* (CBM-B). Los resultados se expresan en  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 3.4.10. Adhesión a células epiteliales

Debido a que los resultados previamente presentados indicarían a que las cepas clínicas podrían mostrar una mayor expresión de factores de virulencia, particularmente adhesinas, en su superficie celular, nos preguntamos si también se vería implicado un efecto en la capacidad de adherencia de las mismas a células epiteliales, como un primer acercamiento hacia la patología de las cepas en estudio. En este sentido, al comparar la adhesión de la cepa de referencia con la de las cepas clínicas a células epiteliales alveolares humanas (A549), observamos un incremento significativo en el número de bacterias adheridas a las mismas, de hasta el doble del valor presentado por la cepa de referencia (**Figura 10**). A modo de control negativo utilizamos una cepa avirulenta, la cual no expresa los factores de virulencia involucrados en la adhesión a células epiteliales (como FHA, Fim y Prn).



**Figura 10.** Adhesión a células epiteliales A549 de las cepas de Bp Tohama I, Bp Bvg<sup>-</sup>, Bp462, Bp892, Bp2751, H921, H973 y STO1-SEAT0004. Cada cepa fue incubada con células A549 con una multiplicidad de infección de 10, durante 15 min a 37°C. Las células fueron lavadas para remover las bacterias no adheridas, y luego lisadas para recuperar las bacterias, las cuales fueron cuantificadas por recuento en placas ABG. El porcentaje de adhesión se calculó en base al inóculo inicial utilizado para cada cepa. Los datos representan los valores promedio con sus respectivas desviaciones estándar. La significancia se analizó con el Test de Student, donde \* P<0,05; \*\* P<0,01 y \*\*\*P<0,001.

### 3.4.11. Ensayos en ratones

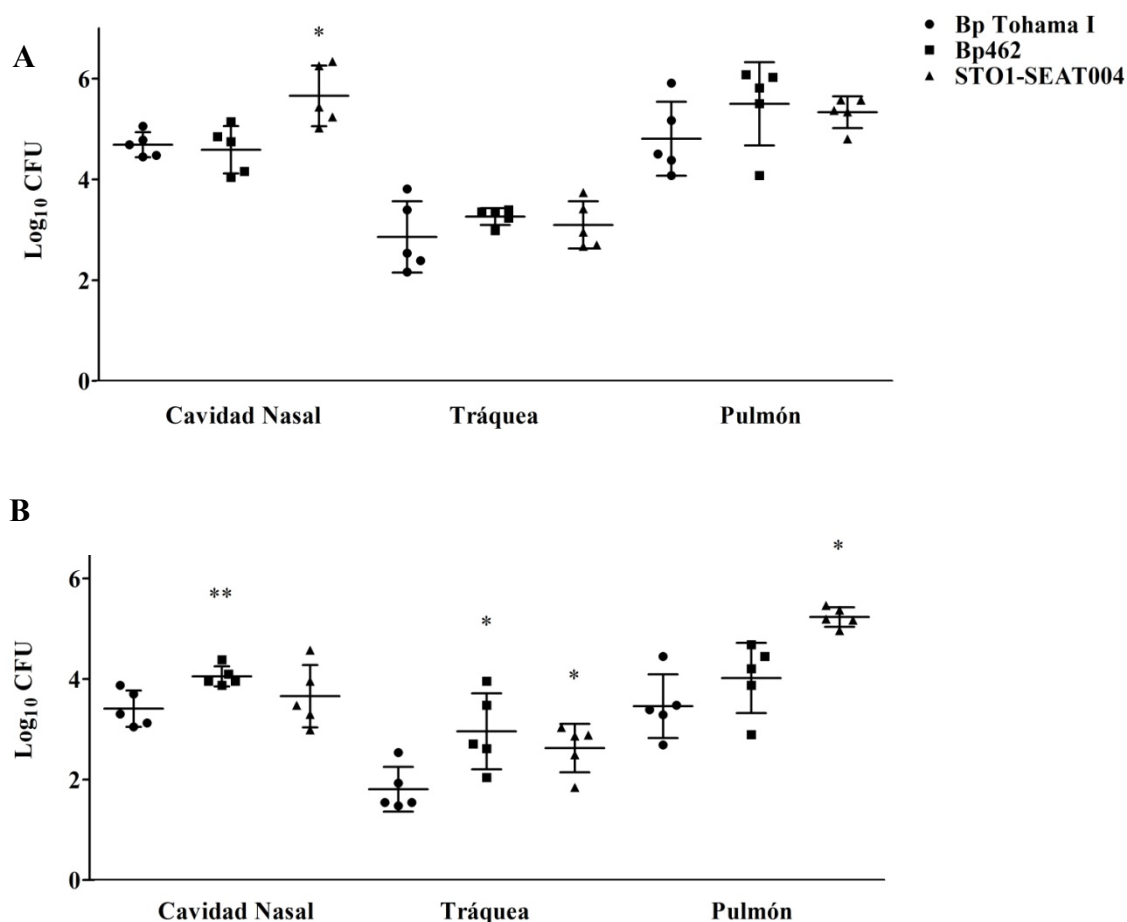
A continuación, se estudió la capacidad de colonización in vivo, empleando un modelo de infección murino. Para ello, dos cepas clínicas fueron seleccionadas, una cepa aislada en Argentina, Bp462, y una cepa aislada en Estados Unidos, STO1-SEAT0004 y se analizó comparativamente contra la cepa de referencia Bp Tohama I. Se utilizó un modelo de infección intranasal, que permite el estudio de la colonización de las bacterias en la cavidad nasal, la tráquea y los pulmones. Grupos de 5 ratones B57BL/6 fueron inoculados intranasalmente, y luego de 4, 10 y 25 días, los animales fueron sacrificados y se colectaron los órganos a partir de los cuales se obtuvieron las cargas bacterianas correspondientes a cada cepa.

Como se observa en la **Figura 11.A**, a tiempos tempranos de colonización (4 días post infección) se encontró una alta carga bacteriana, en especial en la cavidad nasal y en pulmón. En particular, a este tiempo de incubación se observó una colonización significativamente mayor en el septo nasal por parte de la cepa STO1-SEAT0004. Aunque sin diferencias significativas, se observó a su vez una tendencia a una mayor colonización por parte de las cepas clínicas tanto en tráquea como en pulmón.

A los 10 días post infección, en todos los casos se observó una disminución en el número de bacterias recuperadas en los tres órganos, con excepción de los pulmones de ratones infectados con la cepa STO1-SEAT0004 (**Figura 11.B**). Una observación interesante realizada al momento de recuperar los órganos de los animales infectados, fue la apariencia de los pulmones de los ratones infectados con las cepas clínicas, presentando un color más oscuro y un tamaño anormalmente grande. En todas las experiencias realizadas con los ratones, se colectaron los tres lóbulos izquierdos del pulmón para obtener el recuento de bacterias, mientras que los restantes dos lóbulos de los pulmones derechos fueron conservados en formalina (para la evaluación patológica del tejido infectado, que se realizará a futuro). Con respecto a la colonización de la cavidad nasal luego de 10 días de infección, encontramos diferencias significativas en la cepa Bp462, no así en la cepa STO1-SEAT0004, pero mostrando ésta una tendencia a una mayor colonización. Por su parte, los recuentos obtenidos de tráquea fueron significativamente mayores para ambas cepas clínicas con respecto a la cepa de referencia. En el caso del pulmón, la cepa STO1-SEAT0004 mostró una colonización

significativamente mayor, mientras que en los pulmones infectados con Bp462 se observó una tendencia mayor a Bp Tohama I.

A los 25 días post-infección, todos los ratones lograron clarificar la infección, resultado ya observado para cepas de referencia de *B. pertussis*, indicando que las cepas clínicas no establecerían una infección persistente en este modelo animal.



**Figura 11.** Colonización del tracto respiratorio de ratones por las cepas *B. pertussis* Bp Tohama I, Bp462 y STO1-SEAT0004. Grupos de 5 ratones C57BL/6, de entre 6 y 8 semanas fueron inoculados intranasalmente con aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC en 50  $\mu$ L de PBS. Luego de 4 (A) y 10 (B) días post infección, los animales fueron sacrificados y se determinó la colonización del septo nasal, tráquea y pulmón. Las barras horizontales representan el valor promedio de cada grupo. La significancia se analizó por medio de ANOVA de un factor, donde \*  $P < 0,05$  y \*\*  $P < 0,01$ .

---

### 3.5. Discusión

Luego de más de 60 años de vacunación intensiva contra pertussis, esta enfermedad continúa circulando en la población. El hecho de que *B. pertussis* sea un patógeno estrictamente humano estaría mostrando que la bacteria ha adaptado su fenotipo para persistir dentro de su hospedador natural, desde donde se puede transmitir a personas susceptibles. El estudio de estos posibles mecanismos de persistencia constituye un desafío para el desarrollo de nuevas estrategias de profilaxis y de tratamiento. Desde que se declaró a pertussis como una enfermedad reemergente, se han multiplicado los estudios que reportan la variabilidad presente entre los aislados clínicos que circulan actualmente en la población [37-44]. El caso de la reemergencia de pertussis muestra un cuadro complejo en el que varios factores han sido indicados como contribuyentes a la permanencia del patógeno en la población. La baja eficiencia de las vacunas actuales junto con la pérdida de la inmunidad conferida por las mismas a lo largo del tiempo, explicarían las causas por las que aún se registran casos de pertussis. A su vez, en los últimos años se ha demostrado que la vacunación ha dirigido una adaptación en las cepas clínicas, que presentan variación antigénica particularmente en aquellos determinantes incluidos en las vacunas, ausencia de Prn y predominancia de ciertos linajes. Estas variaciones a nivel fenotípico permitirían a la bacteria la evasión a la protección inducida por la vacunación [21, 43-48].

En paralelo con la reemergencia de la enfermedad se ha observado un cambio en el perfil epidemiológico de la misma, hallándose un aumento en el número de casos reportados en adolescentes y adultos [49-54]. En esta población, la enfermedad puede presentarse de forma asintomática o con sintomatología leve, siendo esta característica una de las principales razones del fallo en el correcto diagnóstico de la misma. Se ha demostrado que la principal fuente de transmisión de la bacteria a niños susceptibles son familiares directos sin síntomas alguno de la infección [55, 56]. La evidencia de que las vacunas previenen la enfermedad pero no la infección por *B. pertussis* sugeriría que la bacteria sería capaz de permanecer dentro del hospedador de forma persistente sin sintomatología [57-59]. La hipótesis de trabajo planteada por nuestro laboratorio sugiere a la formación de *biofilm* como un posible mecanismo de persistencia de *B. pertussis* dentro de su hospedador natural. En nuestro grupo se han realizado aportes significativos demostrando que la cepa de referencia de *B. pertussis* posee la capacidad de desarrollar *biofilms*, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* [16, 20, 60, 61]. Sin

embargo, a pesar de la importancia de estos estudios, aún resta por comprender cuál es la respuesta de las cepas clínicas a lo largo del proceso de formación de *biofilms*. En consecuencia, como objetivo central de este Capítulo, nos planteamos hacer un estudio intensivo de los *biofilms* producidos por aislamientos clínicos de *B. pertussis* comparando en este caso aislados provenientes de Argentina y de Estados Unidos.

Una de las primeras características que resultó notoria para los dos grupos de cepas clínicas estudiadas, es que la mayoría de ellas al ser cultivadas en tubos de ensayo crecían adheridas a las paredes del mismo, produciendo un anillo de espesor visualmente mayor al de las cepas de referencia. Al cuantificar el *biofilm* formado en las paredes de los tubos de ensayo mediante tinción con cristal violeta, observamos que la mayoría de las cepas clínicas en estudio mostraron diferencias significativas con las cepas de referencia Bp Tohama I y Bp536. Utilizando un sistema de cultivo estandarizado para el *screening* de la producción de *biofilm*, tal como son las placas multipocillo, observamos que todas las cepas clínicas mostraron altos niveles de producción de *biofilm*, con excepción de la cepa GMT1. Esta cepa fue aislada en 1996 por el grupo del Dr. Miller [62] y ha sido utilizada en varios trabajos como referente de aislamientos clínicos. El nivel de *biofilm* presentado por GMT1 fue inferior al de las cepas de referencia y análogo al de la cepa avirulenta utilizada como control negativo. Sin embargo, la cepa presenta características virulentas al ser cultivada en placas ABG, tamaño pequeño de colonia y hemólisis. Llamativamente, GMT1 presenta niveles excesivamente mayores de hemólisis que cualquier otra cepa utilizada en este estudio. Ha sido propuesto en *B. bronchiseptica*, que la toxina adenilato ciclasa (ACT), responsable de dicha hemólisis, poseería un efecto inhibitorio de la producción de *biofilm*, mediante la interacción con FHA, e incluso se han reportado cepas de *B. bronchiseptica* sin expresión de ACT que son hiperformadoras de *biofilm* [13, 32]. La sobreproducción de ACT podría ser una posible explicación de la razón por la que GMT1 presenta niveles tan bajos de producción de *biofilm*.

Otra de las características notadas al crecer las cepas clínicas en tubos de ensayo fue que el crecimiento de estas cepas clínicas era predominantemente sésil, mientras que en la fracción planctónica aparecía un crecimiento no homogéneo y particulado en ciertos casos. Asociado a esta última característica hallamos que al dejar los tubos de ensayo de forma estática, se producía una decantación de las bacterias, al punto de quedar un pellet celular mientras que el medio de cultivo se clarificaba. En este punto



del trabajo se decidió acotar el número de cepas en estudio, eligiendo tres representantes de las cepas argentinas, Bp462, Bp892 y Bp2751, y tres cepas americanas, H921, H973 y STO1-SEAT0004. Siguiendo esta característica aparente de las cepas clínicas, estudiamos su capacidad de autoagregación. Observamos que no sólo estos aislamientos poseen un índice de autoagregación mayor que Bp Tohama I, sino que además lo hacen más rápidamente. Más aún, encontramos que las cepas argentinas poseen una mayor capacidad de hemaglutinación. Estas observaciones indicarían una diferencia en la presencia de adhesinas en la membrana celular, en particular FHA. Esta proteína ha sido reportada como un factor involucrado en el proceso de formación de *biofilm*, actuando como la principal adhesina promotora del desarrollo de microcolonias, facilitando la interacción célula-célula y célula-substrato [20]. La producción de FHA fue cuantificada mediante ELISA, observándose una mayor cantidad de proteína asociada a la superficie celular y en el sobrenadante del cultivo, para las seis cepas clínicas en estudio. El hecho de que FHA se sobre-expresa en estas cepas respecto de las cepas de referencia ofrece una primera explicación de las causas por las que los aislados clínicos tienen una mayor capacidad de producir *biofilms*.

A continuación analizamos mediante microscopía la organización de la adhesión y la estructura de los *biofilms* a lo largo de su desarrollo. Para ello, se utilizó como soporte del crecimiento sécil, cubreobjetos. Al estudiar la adhesión a cubreobjetos, las cepas clínicas mostraron una adhesión que involucra la interacción entre las bacterias, observándose agregados al cabo de 1 hora de incubación. Al cuantificar el número de bacterias adheridas, las cepas clínicas mostraron un mayor número con respecto a la cepa de referencia Bp Tohama I, no así con la cepa Bp536, sin embargo esta cepa mostró un tipo de adhesión disperso como el caso de Bp Tohama I. Para el estudio por microscopía láser confocal de la estructura de los *biofilms*, se utilizó la cepa Bp536 como referencia, puesto que Bp Tohama I no fue capaz de crecer en el sistema utilizado. De todos modos, Bp536 produce niveles de *biofilm* significativamente menores que las seis cepas clínicas en estudio, ofreciendo una referencia similar al de Bp Tohama I. Por medio de un análisis cuantitativo mediante el software COMSTAT2 de las imágenes adquiridas por microscopía láser confocal de los *biofilms* a lo largo de 96 horas de crecimiento, observamos que ya desde las 24 h de incubación se encuentran diferencias de adhesión al soporte. Las cepas clínicas muestran microcolonias de mayor espesor y mayor densidad bacteriana que la cepa de referencia. Del análisis de las imágenes por

medio del software COMSTAT2, podemos concluir que desde etapas tempranas de desarrollo de *biofilm*, 24 h, las cepas clínicas mostraban una mayor estructuración, presentando mayores niveles de biomasa, altura máxima y altura promedio, diferencias que se mantuvieron hasta las 96 h de cultivo. Al comparar los *biofilms* producidos por las cepas clínicas, observamos que las cepas argentinas presentaron niveles de rugosidad menores a lo largo del cultivo que las cepas americanas y Bp536. Este parámetro representa la variabilidad en la estructura del *biofilm*, siendo más homogéneo en las cepas argentinas que en las cepas americanas.

Otra de las características estudiadas de estos *biofilms*, fue la composición de su matriz extracelular, mediante el empleo de diferentes tratamientos químicos y enzimáticos sobre los mismos. Hallamos que los tratamientos con metaperiodato de sodio, pronasa o DNasaI sobre *biofilms* preformados afectan la estabilidad de los mismos. En el caso de las cepas clínicas, el efecto de la adición de estos componentes redujo el nivel de *biofilm* hasta niveles similares al de la cepa de referencia, demostrando que tanto polisacáridos, proteínas como ADN extracelular están presentes en la matriz de estos *biofilms* y que los mismos cumplen un rol importante en el mantenimiento de la estructura de los de *biofilm* de cepas clínicas.

Al analizar la expresión génica de *fim2*, *fim3* y *bpsA* en las cepas Bp Tohama I y Bp462, mediante qPCR, observamos un incremento en la abundancia relativa del gen *fim3* en Bp462 en cultivos planctónicos y en biofilm. Este incremento podría estar asociado a un incremento en la cantidad de Fim presente en el aislado clínico, lo que no sólo explicaría su mayor capacidad de producir biofilms sino también de hemaglutinación. En el caso del gen *bpsA* no se observaron cambios entre ambas cepas, sin embargo, sería necesario realizar la detección directa del Bps para poder concluir si los aislados clínicos también producen un mayor nivel de exopolisacárido.

Una de las principales características generales que presentan los *biofilms* es el incremento de la resistencia a agentes antimicrobianos. Esto se debe a la presencia de la matriz extracelular que actúa como posible una barrera protectora, impidiendo o dificultando la difusión de distintas moléculas; y por otro lado, a la presencia de células que no presentan un metabolismo activo y que por lo tanto no se ven afectadas por la presencia de antibióticos. En primera instancia, analizamos la resistencia a antibióticos de las cepas clínicas argentinas, utilizando las tiras comerciales Etest impregnadas en

---

antibióticos. Se determinaron las CIM para cada uno de los siguientes antibióticos: ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina y gentamicina. En todos los casos, el crecimiento se inhibió por concentraciones muy bajas de antibiótico, demostrando que tanto la cepa de referencia como los aislados clínicos son igualmente susceptibles al tratamiento con estos antibióticos. Sin embargo, al analizar la resistencia a antibióticos de los correspondientes *biofilms*, observamos que todas las cepas incrementan su resistencia a estos antibióticos. De todos modos, no se observaron diferencias significativas entre las cepas, posiblemente porque la actividad de los antibióticos se analizó sobre *biofilms* de 24 h, los cuales no presentan marcadas diferencias estructurales como las que se observaron a las 96 h de cultivo.

Por último, estudiamos las cepas clínicas en el contexto de su interacción con células epiteliales y en un modelo de infección murino. Observamos que las cepas clínicas muestran un porcentaje de adhesión de hasta dos veces mayor a células epiteliales alveolares humanas A549. Esta característica posiblemente se encuentra asociada con la diferencia en la expresión de adhesinas, en particular FHA. Asimismo, al analizar la carga bacteriana de ratones infectados durante 4, 10 y 25 días con las cepas Tohama I, Bp462 y STO1-SEAT0004, hallamos una tendencia de las cepas clínicas hacia una colonización superior tanto de la cavidad nasal, la tráquea como pulmón, que en algunos casos resultó ser significativa respecto de la cepa de referencia. Una observación interesante fue la patología de los pulmones infectados con cepas clínicas luego de 10 días de post-infección, los cuales mostraron un mayor tamaño y una coloración anormal. Resulta interesante resaltar que si bien la realización del recuento de bacterias recuperadas del tracto respiratorio nos puede dar una idea de la capacidad de colonización del tejido, su visualización otorgaría más información sobre la forma en la que las bacterias se distribuyen sobre el mismo. Si bien este análisis no fue realizado hasta esta instancia, consideramos que sería de importancia para realizar un análisis más integral y concluyente de la colonización del tracto respiratorio por las cepas en estudio. Por otro lado, el hecho de que a los 25 días la infección se haya clarificado en las tres cepas estudiadas indicaría que las mismas no establecerían una infección prolongada en este modelo animal de estudio.



### 3.6. Conclusiones

Los resultados presentados en este Capítulo demuestran que los aislados clínicos de *B. pertussis* estudiados poseen una mayor capacidad de formación de *biofilm* en comparación a la cepa de referencia Bp Tohama I. Es interesante resaltar el comportamiento similar en este aspecto entre aislados clínicos provenientes de distintas regiones geográficas, lo cual estaría hablando de una “evolución” similar en cuanto a una particular forma de crecimiento. Asociado a este fenotipo hallamos una serie de características que son reportadas por primera vez en cepas clínicas de *B. pertussis*, una mayor autoagregación y hemaglutinación en las cepas clínicas, indicando una posible mayor expresión de adhesinas.

Observamos que seis de las cepas clínicas estudiadas poseen una mayor expresión de una de las principales adhesinas de esta bacteria, FHA, tanto asociada a superficie como secretada al medio de cultivo; junto con un aumento en la abundancia del ARNm de *fim3*, y consecuentemente un probable incremento en la expresión de Fim.

Al estudiar mediante microscopía confocal el desarrollo de los *biofilms* de estas cepas clínicas hallamos que al momento de adherir, las cepas clínicas lo hacen de una forma en la que se asocian entre sí, mientras que las cepas de referencia muestran un patrón disperso de células. Estructuralmente, los *biofilms* de las cepas clínicas presentan mayores niveles de biomasa, altura máxima y altura promedio, presentando las cepas argentinas una distribución más homogénea, mientras que las cepas americanas, más heterogénea.

Encontramos que tanto polisacáridos, proteínas como ADN extracelular cumplen un rol en el mantenimiento de la estabilidad de los *biofilms* formados por los aislados clínicos y la cepa de referencia.

El fenotipo de *biofilm* confiere tanto a cepas clínicas como a la cepa de referencia una mayor resistencia al tratamiento con los antibióticos ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina y gentamicina.

Las cepas clínicas poseen una mayor capacidad de adherir a células epiteliales alveolares y de colonizar órganos del tracto respiratorio de ratones.



---

### 3.7. Referencias

1. Donlan RM: Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002, 8(9):881-890.
2. Grondahl-Yli-Hannuksela K, Viander M, Mertsola J, He Q: Increased risk of pertussis in adult patients with mannose-binding lectin deficiency. *APMIS* 2013, 121(4):311-315.
3. Barkoff AM, Mertsola J, Guillot S, Guiso N, Berbers G, He Q: Appearance of *Bordetella pertussis* strains not expressing the vaccine antigen pertactin in Finland. *Clin Vaccine Immunol* 2012, 19(10):1703-1704.
4. Kallonen T, Mertsola J, Mooi FR, He Q: Rapid detection of the recently emerged *Bordetella pertussis* strains with the ptxP3 pertussis toxin promoter allele by real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 2012, 18(10):E377-379.
5. Ministerio de Salud PdlN: Boletín Integrado de Vigilancia. N° 203 - SE 3:111.
6. Winter K, Glaser C, Watt J, Harriman K: Pertussis epidemic--California, 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2014, 63(48):1129-1132.
7. Barkoff AM, Grondahl-Yli-Hannuksela K, Vuononvirta J, Mertsola J, Kallonen T, He Q: Differences in avidity of IgG antibodies to pertussis toxin after acellular pertussis booster vaccination and natural infection. *Vaccine* 2012, 30(48):6897-6902.
8. He Q, Barkoff AM, Mertsola J, Glismann S, Bacci S: High heterogeneity in methods used for the laboratory confirmation of pertussis diagnosis among European countries, 2010: integration of epidemiological and laboratory surveillance must include standardisation of methodologies and quality assurance. *Euro Surveill* 2012, 17(32).
9. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999, 284(5418):1318-1322.
10. Lewis K: Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001, 45(4):999-1007.
11. Mishra M, Parise G, Jackson KD, Wozniak DJ, Deora R: The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*. *J Bacteriol* 2005, 187(4):1474-1484.
12. Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Mishra M, Deora R: The *Bordetella* Bps polysaccharide is critical for biofilm development in the mouse respiratory tract. *J Bacteriol* 2007, 189(22):8270-8276.
13. Irie Y, Mattoo S, Yuk MH: The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol* 2004, 186(17):5692-5698.
14. Sugisaki K, Hanawa T, Yonezawa H, Osaki T, Fukutomi T, Kawakami H, Yamamoto T, Kamiya S: Role of (p)ppGpp in biofilm formation and expression of filamentous structures in *Bordetella pertussis*. *Microbiology* 2013, 159(Pt 7):1379-1389.
15. Sisti F, Ha DG, O'Toole GA, Hozbor D, Fernandez J: Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology* 2013, 159(Pt 5):869-879.
16. Bosch A, Serra D, Prieto C, Schmitt J, Naumann D, Yantorno O: Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, 71(5):736-747.
17. Parise G, Mishra M, Itoh Y, Romeo T, Deora R: Role of a putative polysaccharide locus in *Bordetella* biofilm development. *J Bacteriol* 2007, 189(3):750-760.
18. Conover MS, Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Deora R: The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Mol Microbiol* 2010, 77(6):1439-1455.

19. Conover MS, Mishra M, Deora R: Extracellular DNA is essential for maintaining *Bordetella* biofilm integrity on abiotic surfaces and in the upper respiratory tract of mice. PLoS One 2011, 6(2):e16861.
20. Serra DO, Conover MS, Arnal L, Sloan GP, Rodriguez ME, Yantorno OM, Deora R: FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. PLoS One 2011, 6(12):e28811.
21. Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, Cassiday PK, Chiang CS, Dalby T, Fry NK et al: Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. MBio 2014, 5(2):e01074.
22. Hegerle N, Guiso N: *Bordetella pertussis* and pertactin-deficient clinical isolates: lessons for pertussis vaccines. Expert Rev Vaccines 2014, 13(9):1135-1146.
23. Hegerle N, Dore G, Guiso N: Pertactin deficient *Bordetella pertussis* present a better fitness in mice immunized with an acellular pertussis vaccine. Vaccine 2014, 32(49):6597-6600.
24. de Gouw D, Hermans PW, Bootsma HJ, Zomer A, Heuvelman K, Diavatopoulos DA, Mooi FR: Differentially expressed genes in *Bordetella pertussis* strains belonging to a lineage which recently spread globally. PLoS One 2014, 9(1):e84523.
25. Gaillard ME, Bottero D, Castuma CE, Basile LA, Hozbor D: Laboratory adaptation of *Bordetella pertussis* is associated with the loss of type three secretion system functionality. Infect Immun 2011, 79(9):3677-3682.
26. Zealey G, Yacoob R: Electrotransformation of *Bordetella*. In: Electrotransformation of Bacteria. Edited by Eynard N, Teissié J: Springer Berlin Heidelberg; 2000: 150-156.
27. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods 2012, 9(7):671-675.
28. Byun J, Verardo MR, Sumengen B, Lewis GP, Manjunath BS, Fisher SK: Automated tool for the detection of cell nuclei in digital microscopic images: application to retinal images. Mol Vis 2006, 12:949-960.
29. Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA: Growing and analyzing static biofilms. Curr Protoc Microbiol 2005, Chapter 1:Unit 1B 1.
30. Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersboll BK, Molin S: Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. Microbiology 2000, 146 ( Pt 10):2395-2407.
31. Nicholson TL, Conover MS, Deora R: Transcriptome profiling reveals stage-specific production and requirement of flagella during biofilm development in *Bordetella bronchiseptica*. PLoS One 2012, 7(11):e49166.
32. Sukumar N, Nicholson TL, Conover MS, Ganguly T, Deora R: Comparative analyses of a cystic fibrosis isolate of *Bordetella bronchiseptica* reveal differences in important pathogenic phenotypes. Infect Immun 2014, 82(4):1627-1637.
33. Menozzi FD, Boucher PE, Riveau G, Gantiez C, Loch C: Surface-associated filamentous hemagglutinin induces autoagglutination of *Bordetella pertussis*. Infect Immun 1994, 62(10):4261-4269.
34. Colombi D, Oliveira ML, Campos IB, Monedero V, Perez-Martinez G, Ho PL: Haemagglutination induced by *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin adhesin (FHA) is inhibited by antibodies produced against FHA(430-873) fragment expressed in *Lactobacillus casei*. Curr Microbiol 2006, 53(6):462-466.
35. Colombi D, Horton DS, Oliveira ML, Sakauchi MA, Ho PL: Antibodies produced against a fragment of filamentous haemagglutinin (FHA) of *Bordetella pertussis* are



- able to inhibit hemagglutination induced by the whole adhesin. FEMS Microbiol Lett 2004, 240(1):41-47.
36. Kallonen T, Grondahl-Yli-Hannuksela K, Elomaa A, Lutynska A, Fry NK, Mertsola J, He Q: Differences in the genomic content of *Bordetella pertussis* isolates before and after introduction of pertussis vaccines in four European countries. Infect Genet Evol 2011, 11(8):2034-2042.
  37. van Gent M, Bart MJ, van der Heide HG, Heuvelman KJ, Kallonen T, He Q, Mertsola J, Advani A, Hallander HO, Janssens K et al: SNP-based typing: a useful tool to study *Bordetella pertussis* populations. PLoS One 2011, 6(5):e20340.
  38. Kumar Shukla S, Rao TS: Dispersal of Bap-mediated Staphylococcus aureus biofilm by proteinase K. J Antibiot (Tokyo) 2013, 66(2):55-60.
  39. Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, van der Heide HG, Gaastra W, Willems RJ: Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. Infect Immun 1998, 66(2):670-675.
  40. Mastrantonio P, Spigaglia P, van Oirschot H, van der Heide HG, Heuvelman K, Stefanelli P, Mooi FR: Antigenic variants in *Bordetella pertussis* strains isolated from vaccinated and unvaccinated children. Microbiology 1999, 145 ( Pt 8):2069-2075.
  41. Mooi FR, He Q, van Oirschot H, Mertsola J: Variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertussis toxin and pertactin in vaccine strains and clinical isolates in Finland. Infect Immun 1999, 67(6):3133-3134.
  42. Packard ER, Parton R, Coote JG, Fry NK: Sequence variation and conservation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from the UK. J Med Microbiol 2004, 53(Pt 5):355-365.
  43. Elomaa A, Advani A, Donnelly D, Antila M, Mertsola J, Hallander H, He Q: Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates in Finland, where the whole-cell pertussis vaccine has been used for 50 years. J Clin Microbiol 2005, 43(8):3681-3687.
  44. Caro V, Njamkepo E, Van Amersfoorth SC, Mooi FR, Advani A, Hallander HO, He Q, Mertsola J, Riffelmann M, Vahrenholz C et al: Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Bordetella pertussis* populations in various European countries with different vaccine policies. Microbes Infect 2005, 7(7-8):976-982.
  45. van Amersfoorth SC, Schouls LM, van der Heide HG, Advani A, Hallander HO, Bondeson K, von Konig CH, Riffelmann M, Vahrenholz C, Guiso N et al: Analysis of *Bordetella pertussis* populations in European countries with different vaccination policies. J Clin Microbiol 2005, 43(6):2837-2843.
  46. Kallonen T, He Q: *Bordetella pertussis* strain variation and evolution postvaccination. Expert Rev Vaccines 2009, 8(7):863-875.
  47. Edwards KM: Overview of pertussis: focus on epidemiology, sources of infection, and long term protection after infant vaccination. Pediatr Infect Dis J 2005, 24(6 Suppl):S104-108.
  48. Bouchez V, Caro V, Levillain E, Guigon G, Guiso N: Genomic content of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in areas of intensive children vaccination. PLoS One 2008, 3(6):e2437.
  49. Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, He Q, Bart MJ, Heuvelman KJ, de Greeff SC, Diavatopoulos D, Teunis P, Nagelkerke N et al: *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. Emerg Infect Dis 2009, 15(8):1206-1213.

50. Mooi FR, Van Der Maas NA, De Melker HE: Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin. *Epidemiol Infect* 2014, 142(4):685-694.
51. Hozbor D, Mooi F, Flores D, Weltman G, Bottero D, Fossati S, Lara C, Gaillard ME, Pianciola L, Zurita E et al: Pertussis epidemiology in Argentina: trends over 2004-2007. *J Infect* 2009, 59(4):225-231.
52. Birkebaek NH, Kristiansen M, Seefeldt T, Degn J, Moller A, Heron I, Andersen PL, Moller JK, Ostergard L: *Bordetella pertussis* and chronic cough in adults. *Clin Infect Dis* 1999, 29(5):1239-1242.
53. Cherry JD: Adult pertussis in the pre- and post-vaccine eras: lifelong vaccine-induced immunity? *Expert Rev Vaccines* 2014, 13(9):1073-1080.
54. He Q, Viljanen MK, Nikkari S, Lyytikainen R, Mertsola J: Outcomes of *Bordetella pertussis* infection in different age groups of an immunized population. *J Infect Dis* 1994, 170(4):873-877.
55. Chiappini E, Stival A, Galli L, de Martino M: Pertussis re-emergence in the post-vaccination era. *BMC Infect Dis* 2013, 13:151.
56. Cherry JD: The epidemiology of pertussis: a comparison of the epidemiology of the disease pertussis with the epidemiology of *Bordetella pertussis* infection. *Pediatrics* 2005, 115(5):1422-1427.
57. Long SS, Welton CJ, Clark JL: Widespread silent transmission of pertussis in families: antibody correlates of infection and symptomatology. *J Infect Dis* 1990, 161(3):480-486.
58. Lavine JS, Bjornstad ON, de Blasio BF, Storsaeter J: Short-lived immunity against pertussis, age-specific routes of transmission, and the utility of a teenage booster vaccine. *Vaccine* 2012, 30(3):544-551.
59. Bjornstad ON, Harvill ET: Evolution and emergence of *Bordetella* in humans. *Trends Microbiol* 2005, 13(8):355-359.
60. Galanis E, King AS, Varughese P, Halperin SA: Changing epidemiology and emerging risk groups for pertussis. *CMAJ* 2006, 174(4):451-452.
61. Gregory DS: Pertussis: a disease affecting all ages. *Am Fam Physician* 2006, 74(3):420-426.
62. Serra D, Bosch A, Russo DM, Rodriguez ME, Zorreguieta A, Schmitt J, Naumann D, Yantorno O: Continuous nondestructive monitoring of *Bordetella pertussis* biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy and other corroborative techniques. *Anal Bioanal Chem* 2007, 387(5):1759-1767.
63. Serra DO, Lucking G, Weiland F, Schulz S, Gorg A, Yantorno OM, Ehling-Schulz M: Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. *Proteomics* 2008, 8(23-24):4995-5010.
64. Martinez de Tejada G, Miller JF, Cotter PA: Comparative analysis of the virulence control systems of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol* 1996, 22(5):895-908.

## **Capítulo 4**

**Rol de la porina OmpQ en la formación de *biofilm*  
por *B. bronchiseptica***



---

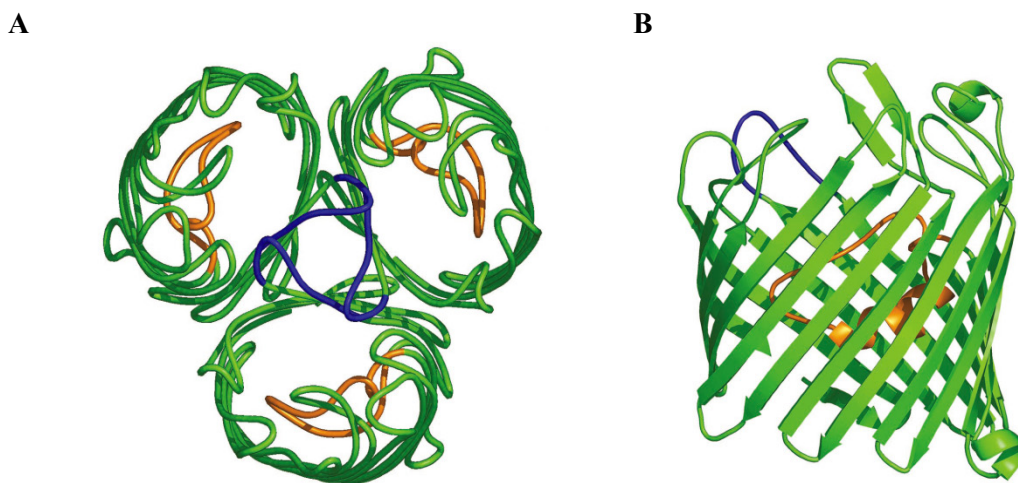
#### 4.1. Introducción

Como se expresó anteriormente, el proceso de formación de *biofilm* en *Bordetella* spp se encuentra bajo regulación del sistema de dos componentes BvgAS [1, 2]. Varios de los estudios realizados hasta la actualidad sobre el proceso de formación de *biofilm* en este género bacteriano se han orientado a identificar el rol de distintos factores, regulados por el sistema BvgAS, durante la formación de estas estructuras. En particular, las investigaciones se han centrado en un grupo pequeño de factores de virulencia, como las adhesinas FHA y Fimbria, la toxina ACT, y a la identificación de componentes de la matriz extracelular y la regulación de su producción [1, 3-9]. El rol de otros determinantes de virulencia aún no ha sido analizado, y por lo tanto se desconocen sus funciones en la fisiología del *biofilm*. En este sentido, en nuestro laboratorio se han realizado estudios de proteómica con el fin de caracterizar y diferenciar el fenotipo expresado en *biofilm* por la cepa de referencia Bp Tohama I y particularmente por el aislado clínico Bp2723 [10, 11]. En estos estudios hallamos una sobre-expresión de ciertas proteínas de membrana entre ellas varios factores de virulencia, como Prn, Vag8, BrkA, OmpQ [10, 11]. En particular, resultaron de interés para su estudio, las porinas OmpP y OmpQ, sobre-expresadas tanto en la cepa de referencia como en el aislado clínico creciendo como *biofilms*.

Las porinas son proteínas de membrana externa que permiten el transporte de solutos hidrofílicos como iones, aminoácidos, nucleósidos y azúcares, y que, a su vez, pueden excluir la entrada de antibióticos u otros inhibidores, contribuyendo a la resistencia bacteriana frente a agentes antimicrobianos [12-15]. Estas proteínas pueden ser clasificadas según su preferencia de afinidad, en generales o específicas de sustrato. Las porinas generales permiten la difusión de moléculas hidrofílicas de un tamaño menor a 600 Da, y no tienen una especificidad particular por un sustrato, más allá de alguna selectividad por cationes o aniones. Por su parte, las porinas específicas de sustrato poseen sitios de unión específicos para un sustrato o una distribución de residuos de aminoácidos de modo tal que permiten la interacción específica con el mismo, como es el caso de la maltoporina de *E. coli* [14, 16].

Las porinas se encuentran en la membrana externa en forma de homotrimeros. Cada monómero es un barril  $\beta$  compuesto por un número par de hebras  $\beta$  antiparalelas (generalmente 16) conectadas entre sí por medio de giros cortos en la cara periplasmática, y bucles largos en la cara externa de la membrana (**Figura 1**). Uno de estos bucles se pliega hacia el interior del barril produciendo un estrechamiento del canal. Los aminoácidos presentes en este bucle y en las paredes del barril son los que confieren las características funcionales de cada porina [16].

En muchos casos, la expresión de las porinas se encuentra regulada, dependiendo de las condiciones ambientales a las que se exponen las bacterias. Así, por ejemplo, en condiciones de baja osmolaridad *E. coli* expresa en forma predominante la porina OmpF, mientras que en la situación opuesta, a una osmolaridad alta, se expresa OmpC. Esta expresión diferencial se debe a distintas capacidades de transporte de iones en ambas porinas, promoviendo la supervivencia de la bacteria en condiciones extremas [16].



**Figura 1.** Estructura de la porina OmpF de *E. coli*. **A.** Vista del trímero desde una dirección perpendicular a la membrana. El bucle 2, de color azul, cumple un rol en la interacción de cada monómero con su unidad vecina. El bucle 3, de color naranja, produce un estrechamiento del canal. **B.** Vista lateral de la unidad monomérica. Imagen modificada de Nikaido *et al.* [12].

---

*B. pertussis* y *B. bronchiseptica* poseen al menos dos porinas generales, OmpP y OmpQ [17-19]. La porina OmpP, es la porina mayoritaria en *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*, tiene un peso molecular de 40 kDa, y es expresada de forma constitutiva en ambas especies [17]. Estudios previos indican que OmpP posee una alta afinidad por sustratos aniónicos, que incluso podría sugerir la presencia de un sitio específico de unión en su estructura [17]. En base a esta característica de la porina y a su abundancia, se ha propuesto que OmpP estaría involucrada en el transporte de algún sustrato aniónico de importancia para la bacteria, como podrían ser nucleósidos o ácido nicotínico [17, 18].

OmpQ es la segunda porina mayoritaria en especies de *Bordetella*. Su peso molecular es de 39 kDa y su expresión se encuentra regulada positivamente por el sistema de dos componentes BvgAS [19]. Estudios previos realizados por Finn y colaboradores (1995), han mostrado que la ausencia de OmpQ no afecta la capacidad de *B. pertussis* 18323 de colonizar el tejido pulmonar de ratones. Sin embargo, más recientemente, varios reportes han reconocido a OmpQ como un antígeno inmunodominante e incluso como un potencial antígeno protector [20-24]. A su vez, se ha propuesto que OmpQ, debe cumplir un rol en la patogénesis de *Bordetella*, tal vez durante los primeros pasos de infección o en el establecimiento de un estado *carrier* o portador [22]. Dado que la expresión de OmpQ se encuentra bajo control del sistema BvgAS, resulta lógico suponer un rol de esta porina durante el ciclo infeccioso de *Bordetella*.

Este Capítulo se enmarca en el contexto de la línea de trabajo planteada en nuestro laboratorio, la cual se enfoca en el estudio de los factores de virulencia y los mecanismos involucrados en el desarrollo en *biofilm* de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*. Específicamente en este trabajo se planteó como hipótesis que las porinas de membrana externa OmpP y OmpQ podrían desempeñar un rol en el desarrollo en *biofilm* de estos patógenos.

Para poner a prueba esta hipótesis se propuso trabajar con *B. bronchiseptica*. *B. bronchiseptica* es tal vez el patógeno más estudiado del género *Bordetella*. El interés por estudiar a esta bacteria se asocia en parte con la importancia de las enfermedades que produce en animales, particularmente en cerdos; pero fundamentalmente se relaciona con el empleo de este patógeno como modelo de estudio en lo que concierne

al género *Bordetella*. Diversos aspectos de la patogénesis de *B. pertussis* en humanos fueron comprendidos gracias a los estudios en *B. bronchiseptica*. La elección de esta especie como modelo de estudio radica en: (i) su alto grado de relación genética con las especies del género, especialmente con *B. pertussis* y *B. parapertussis*, (ii) su versatilidad para ser manipulada en el laboratorio, (iii) su mayor accesibilidad respecto de otras especies (especialmente *B. pertussis*) para ser modificada genéticamente, y (iv) la posibilidad de contar con una variedad de modelos animales, que son huéspedes naturales de esta especie, para el estudio de su patogénesis [25-27]. Al momento de iniciar este trabajo con *B. pertussis*, la principal limitación que encontramos fue la de obtener mutantes en esta especie, por lo que considerando lo expuesto anteriormente, se decidió utilizar a *B. bronchiseptica* como organismo modelo y estrechamente relacionado a *B. pertussis*. Cabe señalar en este contexto, que los genes *ompP* y *ompQ* en *B. bronchiseptica* presentan una homología del 99% y del 100% en relación a sus genes ortólogos en *B. pertussis*, respectivamente.



## 4.2. Objetivos

Los objetivos específicos planteados para esta etapa del trabajo fueron:

- 1 - Obtener cepas mutantes de *B. bronchiseptica* defectivas en la síntesis de las porinas OmpP y OmpQ.
- 2 - Analizar aspectos asociados con el crecimiento en *biofilm* in vitro de las cepas mutantes.
- 3 - Caracterizar estructuralmente estas porinas mediante modelado proteico.



### 4.3. Materiales y métodos

#### 4.3.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Las cepas y plásmidos utilizados en este estudio se detallan en la **Tabla 1**. Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en ágar Luria-Bertani (LB) o en caldo LB. Las cepas de *B. bronchiseptica* fueron cultivadas en placas de ABG suplementadas con 15% v v<sup>-1</sup> de sangre desfibrinada de carnero. Los cultivos líquidos planctónicos y en *biofilm* de *B. bronchiseptica* fueron realizados en medio sintético Stainer-Scholte (SS) o bien en caldo LB. En todos los casos los cultivos de las cepas se realizaron a 37°C. En el caso particular de los cultivos en medio líquido, los mismos fueron incubados en agitación (160 rpm). Todas las cepas se cultivaron en las condiciones de restricción adecuadas, para lo cual los medios de cultivo fueron suplementados con el/los antibióticos apropiados en las siguientes concentraciones: cloramfenicol (Cm) 50 µg mL<sup>-1</sup>, estreptomicina (Sm) 25 µg mL<sup>-1</sup>, 50 µg mL<sup>-1</sup> o 100 µg mL<sup>-1</sup> y kanamicina (Kan) 25 µg mL<sup>-1</sup>.

**Tabla 1.** Descripción de las cepas y plásmidos utilizados en este estudio

Cepas y plásmidos	Descripción	Referencia
Cepas		
<i>B. bronchiseptica</i> RB50	Genotipo salvaje, Sm <sup>r</sup>	[28]
<i>B. bronchiseptica</i> ΔompQ	Derivada de RB50, cepa mutante por delección de <i>ompQ</i>	Este estudio
<i>E. coli</i> CC118λpir	Cepa hospedadora para plásmidos dependientes de pir	[29]
<i>E. coli</i> DH5α	Cepa de <i>E. coli</i> de laboratorio	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)	Cepa de <i>E. coli</i> para expresión de proteínas recombinantes	Novagen
Plásmidos		
pRE112	Vector de intercambio alélico, Cm <sup>r</sup>	[30]
pRE112/AB3993	Derivado de pRE112, plásmido para delección de <i>ompQ</i>	Este estudio
pRK2013	Plásmido mobilizador colaborador, Kan <sup>r</sup>	[31]
pBBR1MCS	Plásmido de amplio espectro de huésped, Kan <sup>r</sup>	[32]
pBBR/ompQ	Plásmido de complementación de <i>ompQ</i> , derivado de pBBR1MCS conteniendo el locus <i>ompQ</i>	Este estudio
pSS1827	Plásmido mobilizador colaborador, Amp <sup>r</sup>	Novagen
pET28a	Plásmido de expresión de proteínas recombinantes, Kan <sup>r</sup>	Novagen
pET28a/ompQ	Plásmido para la expresión de <i>OmpQ</i> recombinante derivado de pET28a	Este estudio
pTac-GFP	Plásmido de expresión constitutiva de GFP, Cm <sup>r</sup>	[4]

### 4.3.2. Mutagénesis vía interrupción génica por integración de vector suicida

#### 4.3.2.1. Generación de las construcciones pRE112-3842int y pRE112-3993int

Para la obtención de mutantes de *B. bronchiseptica* en las porinas OmpP y OmpQ, en una primera etapa, se optó por generar interrupciones en los genes codificantes de ambas porinas por medio de una recombinación simple utilizando el vector suicida pRE112 [30]. Este vector es de bajo número de copias y requiere para su replicación de la proteína  $\pi$ . Cuando el vector se transfiere a una cepa que no posee el gen *pir*, como es el caso de *B. bronchiseptica*, éste se comporta como suicida. Para el armado de las construcciones en el vector pRE112, se diseñaron cebadores que amplificaran regiones internas de ambos genes, *ompP* y *ompQ*, incorporando en los mismos sitios de restricción específicos para facilitar los pasos posteriores de clonado (**Tabla 2**). Una región interna de 760 pb del gen *ompP* fue amplificada en reacciones de PCR a partir de ADN total de *B. bronchiseptica* RB50 utilizando los cebadores Fint3842 y Rint3842. De igual modo, una región interna de 548 pb del gen *ompQ* fue amplificada utilizando los cebadores Fint3993 y Rint3993. Los productos de PCR correspondientes a los fragmentos esperados fueron purificados utilizando el sistema *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Aproximadamente 700 ng de cada uno de los fragmentos amplificados y 1  $\mu$ g del vector pRE112 (obtenido a partir de un kit comercial de Miniprep) fueron digeridos con las enzimas XbaI y KpnI (New England Biolabs, Ipswich, EEUU). Las digestiones se realizaron a 37°C por 3 h. Los distintos productos de digestión fueron purificados utilizando el mismo sistema comercial mencionado anteriormente. Posteriormente, se realizaron las ligaciones de cada fragmento con el vector (relación molar inserto:vector de 3:1) utilizando la enzima *T4 DNA ligase* (New England Biolabs). Las reacciones de ligación se realizaron a 4°C durante 16 h.

La transformación de *E. coli* CC118 con los productos de ligación se realizó mediante electroporación. Para ello, 10  $\mu$ L de una dilución 1/5 de los productos de ligación purificados fueron mezclados con 100  $\mu$ L de una suspensión de células electrocompetentes de *E. coli* CC118, preparadas siguiendo el protocolo detallado por Sambrock y Russell [33]. La electroporación se realizó aplicando un pulso de 2,5 kv, seguido del agregado inmediato de 1 mL de medio SOC (triptona 20 g L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 5 g L<sup>-1</sup>, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM y glucosa 20 mM). Cada suspensión de bacterias fue recuperada e incubada a 37°C por 1 h en

agitación (160 rpm). Posteriormente, cada suspensión fue centrifugada a 5.000 rpm por 3 min. Los pellets de bacterias fueron recuperados, resuspendidos en 100  $\mu$ L de medio LB y plaqueados sobre ágar LB suplementado con Cm. Las placas fueron incubadas a 37°C por 18-24 h. Las colonias obtenidas fueron mantenidas en placas LB con Cm.

Para la confirmación de aquellos clones que recibieron correctamente las construcciones pRE112-3842int y pRE112-3993int, se realizaron reacciones de *colony* PCR utilizando los pares de cebadores Fint3842/Rint3842 y Fint3993/Rint3993 respectivamente. El ADN de cada clon utilizado como molde en las reacciones de PCR fue obtenido mediante lisis térmica de las bacterias. El análisis de la obtención de los productos de PCR del tamaño esperado se realizó por electroforesis en geles de agarosa. Cada inserto fue secuenciado para corroborar su correcta identidad.

#### **4.3.2.2. Transformación de *B. bronchiseptica* RB50 con las construcciones pRE112-3842int y pRE112-3993int y selección de recombinantes**

La transformación de *B. bronchiseptica* RB50 con las construcciones pRE112-3842int y pRE112-3993int se realizó mediante la técnica de conjugación triparental en placa [5], utilizando la cepa *E. coli* CC118, conteniendo cada una de las construcciones, como cepa dadora y una cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  portando el plásmido pRK2013 como colaboradora. El vector pRK2013 posee los genes necesarios para la movilización del plásmido desde la cepa dadora y posee un marcador de selección que confiere resistencia a Kan. En el caso de las cepas dadoras, debido a que portan las construcciones, las mismas presentan resistencia de Cm. Las cepas de *E. coli* (dadora y colaboradora) fueron cultivadas 12 h en medio LB suplementado con los antibióticos adecuados, mientras que la cepa receptora RB50 fue cultivada 16 h en medio SS suplementado con Sm (25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). Las bacterias recuperadas de los distintos cultivos fueron cuidadosamente lavadas en 2 oportunidades con medio SS y luego mezcladas en una relación 1:1:3 (dadora:colaboradora:receptora) en 200  $\mu$ L de medio SS suplementado con MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Cada mezcla fue depositada en alícuotas de 50  $\mu$ L sobre ágar LB (en ausencia de antibióticos). Para que la conjugación ocurra, las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, las bacterias fueron recuperadas de las placas mediante ansa y resuspendidas en PBS. Diluciones apropiadas de cada mezcla fueron plaqueadas en placas ABG suplementadas con Sm (100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) y Cm. Las placas se incubaron a 37°C por 48-72 h. Como posibles

candidatos que hayan recibido el plásmido e incorporado el mismo en el genoma por recombinación con el gen blanco, se seleccionaron aquellas colonias que en su aspecto correspondían a *B. bronchiseptica* y que a su vez mostraron actividad β-hemolítica en el ágar. Las colonias seleccionadas fueron repicadas en ABG con Sm (50 µg mL<sup>-1</sup>) y Cm en igual concentración.

### 4.3.3. Mutagénesis por intercambio alélico

#### 4.3.3.1. Generación de la construcción pRE112- AB3993

Para la obtención de un mutante por delección en el gen de la porina OmpQ en *B. bronchiseptica*, se optó por utilizar una estrategia de mutagénesis por intercambio alélico utilizando el vector suicida pRE112, de modo tal que la delección conservara el marco de lectura y que no generara, corriente abajo, efectos polares sobre los genes.

**Tabla 2.** Descripción de los cebadores utilizados en este estudio. Los sitios de restricción se encuentran subrayados.

Nombre	Secuencia	Referencia
5A-BB3993	TGCTCTAGATCTGCCTGGATTTCTCG	Este estudio
5B-BB3993	CCCAAGCTTCACCACCCATACTC	Este estudio
3A-BB3993	CCCAAGCTTAGCCTTTATGCCTATGG	Este estudio
3B-BB3993	CGGGGTACCAGGAAGACGAACAGC	Este estudio
Fint3993	GCTCTAGACCGACAACCTCTGGG	Este estudio
Rint3993	GGGGTACCTCGAAGTCGTACGTGA	Este estudio
Fint3842	GCTCTAGATCTGGGTGACGGCCTG	Este estudio
Rint3842	GGGGTACCATCTGCCACGAACC	Este estudio
FBB3993ext	CGTTTCTTTGACTTGTTCTG	Este estudio
RBB3993ext	ACATGAAACCGCCTGATGACGAC	Este estudio
FBB3993exp	GCGGATCCTCGAGTTGTATGGGGTGG	Este estudio
RBB3993exp	CCCAAGCTTTGATTGTAGTTGACGACG	Este estudio
QFBB3993	CACCAGCCTTTATGCCTATG	Este estudio
QRBB3993	GTCATTCCCACGCCAAAC	Este estudio
QF16S	TCAGCATGTCGCGGTGAAT	[8]
QR16S	TGTGACGGGCGGTGTGTA	[8]

Para la generación de la construcción, se diseñaron cebadores que amplificaran dos regiones circundantes a la secuencia central del gen a deletar. Una primera región, denominada A3993, incluye 613 pb y comprende los primeros 36 codones del gen *ompQ* y 505 pb corriente arriba del mismo. La segunda región, B3993, incluye 548 pb y comprende los últimos 37 codones de B3993 y 437 pb corriente abajo. A3993 fue amplificada en reacciones de PCR a partir de ADN total de *B. bronchiseptica* RB50 utilizando los cebadores 5A-BB3993 y 3A-BB3993 (**Tabla 2**), a través de los cuales se incorporaron sitios de restricción para las enzimas XbaI y HindIII en los extremos 5' y 3', respectivamente. De igual modo, B3993 fue amplificada utilizando los cebadores 5B-BB3993 y 3B-BB3993 (**Tabla 2**). En este caso se incorporaron sitios de restricción para las enzimas HindIII y KpnI en los extremos 5' y 3', respectivamente. Los productos de amplificación correspondientes a A3993 y B3993 fueron purificados utilizando el sistema comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Aproximadamente 700 ng de ADN correspondiente a los fragmentos A3993 y B3993 fueron digeridos con las enzimas XbaI/HindIII y HindIII/KpnI, respectivamente. En paralelo, 1 µg del vector pRE112 fue digerido con las enzimas XbaI y KpnI. Las digestiones se realizaron a 37°C por 3 h. Los distintos productos de digestión fueron purificados utilizando el sistema comercial de purificación mencionado anteriormente. Posteriormente se realizó la ligación de los fragmentos A3993 y B3993 con pRE112 (relación molar insertoA3993:insertoB3993:vector fue de 3:3:1) utilizando la enzima *T4 DNA ligase* (New England Biolabs). La reacción de ligación se realizó a 4°C durante 16 h. Los productos de ligación fueron luego purificados utilizando nuevamente el sistema comercial mencionado anteriormente.

Células electrocompetentes *E. coli* CC118 fueron transformadas con los productos de ligación purificados, de forma análoga a la descrita en la sección 4.3.2.2. Las colonias obtenidas luego de la transformación fueron mantenidas en placas LB con Cm. A modo de corroborar que los clones seleccionados hayan recibido apropiadamente la construcción pRE112-AB3993, se realizaron reacciones de *colony* PCR utilizando los cebadores 5A-BB3993 y 3B-BB3993. Los vectores fueron aislados a partir de cultivos de cada clon y secuenciados.

### 4.3.3.2. Transformación de *B. bronchiseptica* RB50 con la construcción pRE112-AB3993 y selección de simples recombinantes

La transformación de *B. bronchiseptica* RB50 con la construcción pRE112-AB3993 fue realizada mediante conjugación triparental en placa siguiendo el mismo procedimiento descrito previamente para las construcciones pRE112-3842int y pRE112-3993int. La selección de los clones correspondientes a aquellas bacterias que recibieron las construcciones e integraron las mismas en sus genomas a través de una recombinación simple se realizó en placas ABG suplementadas con Sm (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y Cm (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Asimismo, se corroboró que las colonias correspondieran en su aspecto a *B. bronchiseptica* y que presentaran actividad  $\beta$ -hemolítica en placa. Las colonias seleccionadas fueron repicadas en ABG con Sm (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y Cm. La inserción del vector en el genoma de los clones seleccionados fue corroborada en reacciones de *colony* PCR utilizando los cebadores 5A-BB3993 y 3B-BB3993.

### 4.3.3.3. Segundo evento de recombinación y selección del mutante $\Delta ompQ$

Para promover el segundo evento de recombinación, un grupo de clones simples recombinantes fue cultivado en medio líquido, en ausencia de antibióticos, variando algunas condiciones como ser: i) el medio de cultivo (medio LB sin NaCl o medio SS), ii) tiempo de incubación (24, 48 o 72 h), y iii) la presencia o ausencia de agente modulante ( $\text{MgSO}_4$ ) en el medio de cultivo. Los cultivos se desarrollaron a 37°C y en agitación (160 rpm). A partir de cada uno de estos cultivos, se realizaron diluciones apropiadas que fueron luego plaqueadas en medio LBNS (medio LB sin NaCl) y en paralelo en medio LBNS con sacarosa 7,5% ( $\text{p v}^{-1}$ ). Aquellas bacterias que sobrellevaron el segundo evento de recombinación y escindieron el vector de su genoma, fueron seleccionadas por su capacidad para crecer en medio LBNS suplementado con sacarosa, debido a la pérdida del marcador de contraselección, el gen *sacBI*, de su genoma. Las colonias obtenidas en las placas suplementadas con sacarosa fueron luego repicadas en paralelo en placas ABG con Sm (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y Cm y en placas ABG con Sm (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Aquellos clones con capacidad para crecer en presencia de Sm, pero no de Cm, fueron seleccionados como candidatos posibles que sobrellevaron el reemplazo de la copia salvaje del gen *ompQ* por el alelo deleciónado. Para cada clon seleccionado se evaluó mediante *colony* PCR, utilizando los cebadores 5A-BB3993 y 3B-BB3993, la presencia del alelo mutado del gen. Aquellos clones que



resultaron positivos en esta prueba, fueron posteriormente sujetos a nuevas pruebas control de PCR en las cuales se utilizaron los cebadores Fint3993 y Rint3993 para corroborar la ausencia de la copia del gen salvaje. Finalmente, se realizaron las extracciones de ADN total de los clones mutantes seleccionados. Las muestras de ADN fueron utilizadas para amplificar en reacciones de PCR el alelo deleciónado utilizando los cebadores FBB3993ext y RBB3993ext que aparean en una región más alejada de la que lo hacen los primers utilizados para generar la mutación. El producto de amplificación obtenido para cada clon seleccionado fue purificado utilizando el sistema comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) y secuenciado.

#### 4.3.4. Complementación genética del gen *ompQ*

Para la complementación de la mutación en el gen *ompQ*, un fragmento de unas 2000 pb incluyendo la región codificante del gen *ompQ* y su correspondiente región promotora fue amplificado por PCR utilizando ADN genómico de *B. bronchiseptica* RB50 como molde y los cebadores 5A-BB3993 y 3B-BB3993. El producto de PCR fue digerido utilizando las endonucleasas XbaI y KpnI, ligado al vector de amplio rango pBBR1MCS, previamente digerido con XbaI/KpnI siguiendo un protocolo similar al clonado detallado previamente. El producto de ligación fue luego transformado en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  químicamente competentes de acuerdo a lo reportado por Chung, et al [34]. Clones de *E. coli* conteniendo la construcción pBBR/*ompQ* fueron seleccionados por su capacidad de crecer en placas con Km y luego por *colony* PCR. A partir de cada clon, se extrajo la construcción purificada por *miniprep*, que luego fue secuenciada para corroborar la correcta secuencia nucleotídica. Clones de *E. coli* que portaban el plásmido pBBR/*ompQ* con la correcta secuencia fueron usados como cepas dadoras en experimentos de conjugación triparental, incluyendo la cepa *B. bronchiseptica*  $\Delta$ *ompQ* como receptora, y una cepa de *E. coli* conteniendo el vector colaborador pSS1827. Como control de la complementación, se transfirió por conjugación triparental el plásmido pBBR1MCS sin ningún inserto, a la cepa *B. bronchiseptica*  $\Delta$ *ompQ*.

### 4.3.5. Transformación de cepas de *B. bronchiseptica* para la expresión de la proteína de fluorescencia verde (GFP)

Las cepas *B. bronchiseptica* y *B. bronchiseptica*  $\Delta ompQ$  fueron transformadas con el plásmido pTacGFP, el cuál induce la expresión de la GFP sin afectar el crecimiento o la expresión antigénica [4]. La transformación se realizó a través de la técnica de conjugación triparental en placa, como se detalló previamente, utilizando cada cepa de *B. bronchiseptica* como cepa receptora del vector y una cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  conteniendo el plásmido pRK2013 como colaboradora. La selección de transformantes en ambos caso se realizó en placas ABG combinando los antibióticos que permitían la selección de las bacterias que habían recibido el vector.

### 4.3.6. Cultivo planctónico de *B. bronchiseptica* RB50 y del mutante $\Delta ompQ$

Para evaluar comparativamente el crecimiento de *B. bronchiseptica* RB50 y del mutante  $\Delta ompQ$  en medio líquido, se realizaron cultivos de cada cepa utilizando frascos Erlenmeyer conteniendo 100 mL de medio de cultivo SS los cuales fueron inoculados con suspensiones de bacterias provenientes de cultivos de 12 h, ajustando la DO<sub>650</sub> a 0,2. Los cultivos se realizaron a 37°C en agitación (160 rpm). El crecimiento de las cepas fue monitoreado mediante determinación de la DO<sub>650</sub> de alícuotas de cultivo tomadas cada 2 h durante 30 h.

El crecimiento de las cepas *B. bronchiseptica* RB50 y  $\Delta ompQ$  se estudió en diferentes limitaciones y estrés nutricionales, como caldo LB diluido, medio SS diluido, caldo LB con diferentes concentraciones salinas y medio SS bajo limitación de oxígeno. Para la limitación de oxígeno se emplearon frascos Erlenmeyers de 100 mL conteniendo 50, 60 y 80 mL. En todos los casos, la DO<sub>650</sub> fue medida luego de cultivar por 16 h a 37°C.

### 4.3.7. Análisis de la concentración inhibitoria mínima

Se evaluó el perfil de resistencia a los antibióticos estreptomycin, ciprofloxacina, gentamicina y kanamicina, de células crecidas en cultivos planctónicos. Cultivos de 12 h de *B. bronchiseptica* RB50 y *B. bronchiseptica*  $\Delta ompQ$  fueron utilizados para inocular microplacas de 96 pocillos a una DO<sub>650</sub> de 0,05 con diferentes concentraciones de antibióticos. Las placas fueron incubadas por 24 h a 37°C, y la

---

DO<sub>650</sub> fue medida para cada pocillo. La CIM es definida como la mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento.

#### **4.3.8. Cultivos en *biofilm* de *B. bronchiseptica* RB50 y del mutante $\Delta ompQ$**

##### **4.3.8.1. Placas multipocillo**

Células de *B. bronchiseptica* RB50 y *B. bronchiseptica*  $\Delta ompQ$  fueron cultivadas en pocillos de placas de poliestireno (placas de 96 pocillos de fondo plano; NUNC) conteniendo un volumen total de 100  $\mu$ L de medio SS. Las placas fueron inoculadas con una dilución de un cultivo crecido por 12 h, a una DO<sub>650</sub> de 0.05. Las placas fueron selladas e incubadas a 37°C bajo condiciones estáticas durante 4, 24 o 48 h. En el caso de las placas incubadas por 48 h, el medio de cultivo fue removido a las 24 h y reemplazado por medio fresco. Al finalizar cada etapa de cultivo, la suspensión de bacterias presente en cada pocillo fue cuidadosamente removida y transferida a otro pocillo en una nueva placa a fin de realizar una lectura de la DO<sub>650</sub>. La biomasa adherida en los pocillos fue cuantificada utilizando el método de cristal violeta. Para cada cepa el ensayo fue repetido de manera independiente en 3 oportunidades incluyendo al menos 6 replicados por ensayo.

##### **4.3.8.3. Evaluación de la adhesión a superficies abióticas por microscopía de fluorescencia**

La adhesión de las cepas de *B. bronchiseptica* sobre cubreobjetos de borosilicato fue analizada por microscopía de fluorescencia. Se utilizaron las cepas *B. bronchiseptica* RB50 y *B. bronchiseptica*  $\Delta ompQ$  transformadas con el plásmido pTac-GFP. Cubreobjetos de borosilicato fueron utilizados como superficie. Cada cubreobjeto fue colocado dentro de un pocillo de una placa de 6 pocillos. Cada pocillo fue inoculado con un 1,5 mL de una suspensión bacteriana de la cepa correspondiente ajustada a una DO<sub>650</sub> de 0,05. Luego de incubar por 2 h a 37°C, la suspensión bacteriana fue removida y cada pocillo fue lavado dos veces con PBS. Las bacterias que permanecieron adheridas al cubreobjeto fueron visualizadas utilizando un microscopio de epifluorescencia Leica DMLB. Al menos tres experimentos independientes fueron realizados para cada cepa. La cuantificación de las células adheridas se llevó a cabo utilizando el programa Image J [35] y el plug-in ITCN [36].

### 4.3.8.4. Análisis estructural de *biofilms* por microscopía de escaneo láser confocal (CLSM)

La formación de *biofilm* por las cepas *B. bronchiseptica* RB50 y  $\Delta ompQ$  fue también examinada por CLSM. Como sistema de cultivo se utilizaron cámaras comerciales, denominadas *Lab-Tek chambered coverglasses*, las cuales consisten en un cubreobjetos de 1 mm de espesor dividido en diferentes pocillos y que permiten la visualización del *biofilm* utilizando un microscopio invertido. Cada cámara fue inoculada con una suspensión bacteriana expresando GFP y ajustada a una  $DO_{650}$  de 0,05. El medio de cultivo SS fue suplementado con Cm. A las 24 h de incubación, el medio de cultivo fue removido y cambiado por medio fresco. Luego de 48 h de incubación a 37°C, cada pocillo de la cámara fue lavado dos veces con PBS.

Se utilizó además un sistema de cultivo con flujo continuo de nutrientes para crecer los *biofilms*. Cámaras de flujo fueron inoculadas con cultivos en fase de crecimiento exponencial, con una  $DO_{650}$  ajustada a 0,2, e incubadas de manera estática durante 2 h a 37°C. Luego, medio SS fresco suplementado con Cm fue agregado a un flujo constante de 0,1 mL min<sup>-1</sup>. Los *biofilms* fueron evaluados a las 24 y 48 h.

En ambos casos, los *biofilms* fueron visualizados en un microscopio confocal Leica TCS SP5. Las imágenes fueron analizadas con el *plug-in* COMSTAT2 [37], a modo de obtener datos estructurales cuantitativos de los *biofilms*. Se realizaron experimentos en triplicado para cada cepa.

### 4.3.9. Cuantificación del nivel relativo de expresión del gen *ompQ*

Para evaluar la expresión del gen *ompQ* durante el proceso de formación de *biofilm* por *B. bronchiseptica* RB50 se realizaron ensayos de PCR cuantitativa (qPCR). Para ello, se obtuvieron muestras de ARN a partir de células sésiles cosechadas de cultivos en *biofilm* de 24, 48 y 72 h de incubación, y a partir de células planctónicas en fase de crecimiento exponencial. Se realizaron cultivos en *biofilm* en placas de Petri de vidrio, inoculadas con una suspensión bacteriana ajustada a una  $DO_{650}$  de 0,05. El medio de cultivo fue reemplazado cada 24 h en los casos que fuera necesario. A cada tiempo de cultivo, las células planctónicas fueron removidas de la placa de Petri y las células remanentes adheridas fueron lavadas dos veces con PBS y resuspendidas en 1 mL de *RNAlater* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU). Para las muestras provenientes de

cultivos planctónicos, 30 mL de medio SS fueron inoculados con un cultivo de 12 h, ajustando la  $DO_{650}$  a 0,2, e incubados hasta que los cultivos alcanzaron una  $DO_{650}$  igual a 1. A partir de cada cultivo se tomó 1 mL y se centrifugó a 13.000 rpm a 4°C; el pellet celular fue resuspendido en 1 mL de *RNAlater*. Todas las muestras obtenidas en *RNAlater* fueron incubadas por 24 h a 4°C y almacenadas a -20°C hasta su uso. La extracción de ARN se llevó a cabo utilizando el kit comercial *Purelink RNA mini kit* (Invitrogen). Para la síntesis de ADNc, 1 µg de cada muestra de ARN fueron tratados con DNasa I (Promega) durante 45 minutos a 37°C. El ARN libre de ADN fue utilizado como molde para sintetizar ADNc con la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) siguiendo las instrucciones detalladas por el proveedor para la enzima. Cada muestra fue analizada previamente y luego de la transcripción reversa por PCR para controlar la ausencia de ADN residual y la correcta obtención de ADNc. Los ensayos de PCR cuantitativa se realizaron con una premezcla de SYBR (Thermo Scientific) y los cebadores detallados en la **Tabla 2** (QFBB3993, QRBB3993, QF16S y QR16S). Las reacciones se realizaron con triplicados biológicos y duplicados técnicos. El nivel relativo de expresión de *ompQ* fue calculado por medio de la normalización con el ARN 16S, utilizando el método  $\Delta\Delta Ct$ , de modo similar al descrito por Conover y colaboradores [9].

#### 4.3.10. Clonado del gen *ompQ* para la producción de OmpQ recombinante

La región codificante para el gen *ompQ* sin la secuencia señal fue amplificada mediante PCR utilizando como molde ADN genómico de *B. bronchiseptica* RB50, Pfx DNA polimerasa (Invitrogen) y los cebadores FBB3993exp y RBB3993exp (**Tabla 2**). El producto de PCR fue digerido secuencialmente con las enzimas BamHI y HindIII (New England Biolabs) y ligado con el plásmido pET28a igualmente digerido con BamHI y HindIII, de forma análoga a la previamente descrita. El clonado fue diseñado de manera tal que a la secuencia primaria de OmpQ se le incluyeran 6 histidinas en su extremo N-terminal para facilitar la posterior purificación de la proteína de interés. El producto de la ligación fue transformado en células *E. coli* BL21-Codon Plus químicamente competentes. Los clones transformados fueron seleccionados por su capacidad de crecer en medio suplementado con Kan y Cm, y luego confirmada la presencia del inserto de tamaño apropiado por PCR. Posteriormente, se purificó el ADN plasmídico de los clones positivos por *miniprep* (QIAprep Spin Miniprep kit, QIAGEN) para su consiguiente confirmación de la identidad de secuencia por secuenciación.

### 4.3.11. Expresión de OmpQ recombinante y purificación

La sobreexpresión y purificación de la proteína OmpQ recombinante (OmpQr) se realizó siguiendo el protocolo detallado previamente por Alvarez Hayes y colaboradores [38]. Brevemente, células de *E. coli* BL21-Codon Plus conteniendo la construcción pET28a/ompQ fueron cultivadas en caldo LB suplementado con Kan y Cm e incubadas a 37°C bajo condiciones de agitación (160 rpm). Al momento en que el cultivo llegó a una DO<sub>600</sub> de 0,4, la expresión de OmpQr fue inducida por medio del agregado de Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0,5 mM. Luego de 4 h de inducción, las células fueron cosechadas por centrifugación durante 15 min a 5.000 rpm a 4°C. El pellet bacteriano fue recuperado y resuspendido en buffer de lisis (50 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol y 8 M urea, pH 7.4) e incubado 16 h a temperatura ambiente bajo agitación moderada. Luego, el lisado celular fue centrifugado por 20 min a 10.000 g para deshacerse de restos celulares, y el sobrenadante conteniendo la proteína recombinante fue recuperado. La purificación de OmpQr fue llevada a cabo utilizando una resina de afinidad de cobalto-ácido nitriloacético-agarosa (*HisPur™ Cobalt Resin*, Pierce Biotechnology) bajo condiciones desnaturizantes. Luego de aplicar el lisado celular a la columna previamente equilibrada con buffer desnaturizante, la resina conteniendo la proteína OmpQr unida fue lavada con el mismo buffer. La proteína recombinante fue eluída de la columna por el agregado de buffer de elusión (50 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 150 mM imidazol y 8 M urea, pH 7.4). La presencia de proteínas en las fracciones de elusión se determinó por SDS-PAGE al 10%. La proteína OmpQr purificada fue finalmente dializada, liofilizada y resuspendida en PBS. La cuantificación de la proteína recombinante se realizó por el método de Bradford.

### 4.3.12. Producción de anticuerpos

Se utilizaron ratones hembras BALB/c de entre 3 y 5 semanas provenientes del bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata. Los ratones fueron inmunizados intraperitonealmente con 10 µg de la proteína OmpQr purificada, preparada con adyuvante completo de Freund. Se aplicaron dosis de refuerzo conteniendo 10 µg de proteína recombinante y adyuvante incompleto de Freund a los 17 y 33 días post-inmunización. La respuesta inmunológica de los ratones se siguió por medio de ensayos de inmunoabsorción (ELISA) utilizando OmpQr. Al día 55 post-

inmunización, los ratones fueron sangrados y el suero fue separado y almacenado a -20°C.

#### 4.3.13. Ensayo de Western Blot

El análisis del reconocimiento del suero de ratón anti-OmpQr ( $\alpha$ -OmpQr) fue llevado a cabo mediante Western Blot, utilizando muestras de lisado total de células de *B. bronchiseptica* y OmpQr purificada. Las muestras proteicas fueron preparadas en buffer Laemmli 2x y separadas por SDS-PAGE al 10%. Luego de la separación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (Immobilon PVDF, Millipore, Bedford, MA, USA). La membrana fue incubada con suero  $\alpha$ -OmpQr durante 16 h a 4 °C. Luego, fue lavada e incubada con anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón, conjugados con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research, BaltimorePike) durante 2 h a temperatura ambiente. La detección inmunoquímica se realizó empleando los reactivos NBT y BCIP (Bio-Rad) como sustratos de reacción.

#### 4.3.14. Inhibición de la formación de *biofilm*

La acción inhibitoria de suero normal pre-inmune y anti-OmpQr sobre la formación de *biofilm* fue evaluada utilizando el sistema de cultivo en microplacas de 96 pocillos, de forma análoga a la descrita previamente. Las suspensiones bacterianas fueron incubadas en medio SS con la adición de tres diferentes diluciones de suero (1:100, 1:200 y 1:400) e incubadas a 37°C en microplacas durante 48 h bajo condiciones estáticas. A las 24 h de cultivo, el medio fue reemplazado por medio SS fresco conteniendo la correspondiente dilución de suero. La formación de *biofilm* fue cuantificada por el método de CV.

#### 4.3.15. Análisis bioinformático y modelado proteico

A partir de la secuencia proteica de OmpQ, se realizó una búsqueda de proteínas homólogas en la base de datos no redundante de NCBI, utilizando el programa BLAST. Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando el programa CLUSTALV [39]. Las proteínas alineadas fueron utilizadas para estimar un árbol filogenético utilizando el programa PHYML [40], utilizando un modelo JTT+F con una distribución gamma para simular la escala de heterogeneidad entre los sitios. Para obtener soporte de nodos, se utilizó un *bootstrap* no paramétrico con 500 re-muestras.

Por otro lado, se corrieron métodos de asignación de plegamiento, a modo de estimar posibles moldes para las proteínas OmpQ y OmpP. Para ello se utilizaron los programas HHpred [41] y FFas03 [42], y los posibles moldes obtenidos fueron utilizados en MODELLER [43], para adquirir 100 modelos 3D para cada proteína. Los mejores modelos de acuerdo a la función objetiva de MODELLER fueron evaluados posteriormente con Prosall [44]. El análisis de la distribución electroestática se estimó con los programas APBS (*Adaptative Poisson –Boltzmann Solver*) y PDB2PQR [45].

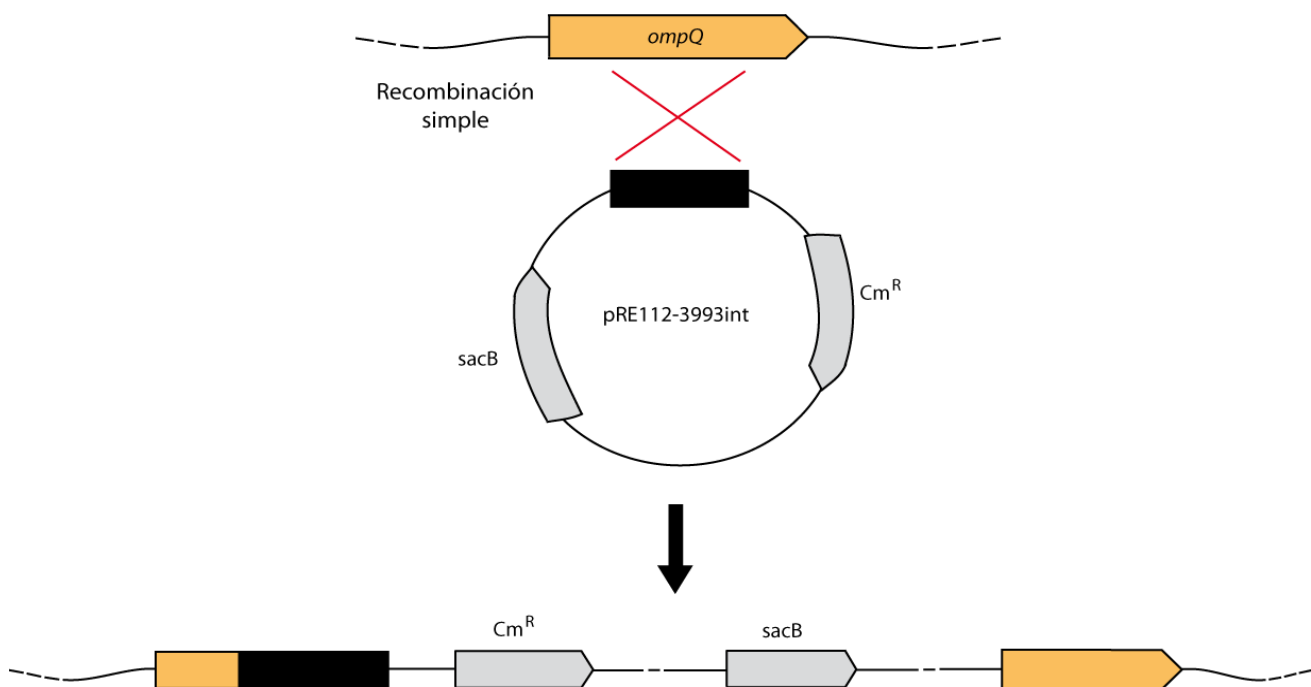


#### 4.4. Resultados

##### 4.4.1. Obtención de cepas mutantes por interrupción génica

Previo a la obtención de mutantes por delección por intercambio alélico, decidimos evaluar en primera instancia la obtención de mutantes por interrupción génica de las porinas OmpQ y OmpP. Esta decisión se basó en uno de los primeros interrogantes planteados, si la ausencia de alguna de estas porinas podría comprometer la viabilidad bacteriana. Este cuestionamiento parte del hecho de que OmpP es una proteína de membrana mayoritaria y de expresión constitutiva. De este modo, se planteó la interrupción de los genes *ompP* y *ompQ* mediante la integración del plásmido suicida pRE112 por medio de una recombinación homóloga a través de un fragmento de secuencia interna a cada gen blanco clonado en el vector (**Figura 2**).

Como se detalló en Materiales y métodos, se diseñaron dos construcciones para cada gen en el vector pRE112. Una vez obtenidas ambas construcciones, se transfirieron a células de *B. bronchiseptica* RB50. Se seleccionaron aquellos clones que recibieron el vector y sobrellevaron la integración del mismo en su genoma mediante la resistencia conjunta de los antibióticos Sm y Cm. Como resultado, se obtuvieron únicamente recombinantes para la construcción correspondiente al gen *ompQ*. A pesar de repetidos intentos no pudo obtenerse ningún recombinante para el caso del gen *ompP*. Estos resultados indicarían que la interrupción de *ompQ* no es letal para *B. bronchiseptica*, mientras que si podría serlo la interrupción de *ompP*.



**Figura 2.** Esquema de la estrategia de mutagénesis vía interrupción génica utilizada.

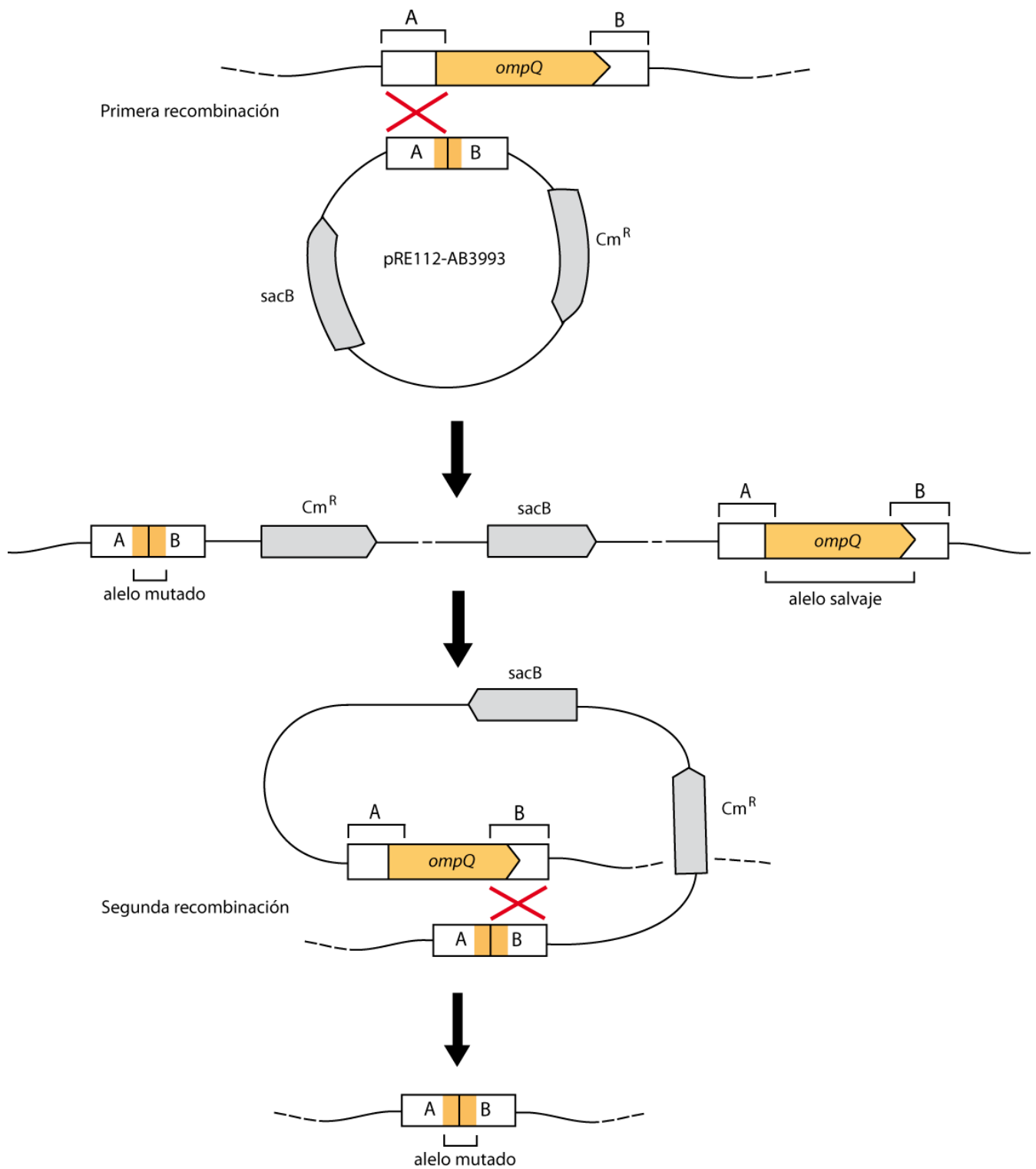
En base a estos resultados decidimos continuar con la estrategia de mutación por intercambio alélico únicamente para la porina OmpQ. De esta forma se obtendría una mutación estable en el gen *ompQ*.

### 4.4.2. Generación de la cepa mutante *B. bronchiseptica* $\Delta ompQ$

Para generar una mutación por delección en el gen *ompQ* se recurrió a una estrategia de mutagénesis por intercambio alélico, representada en la **Figura 3**. Nuevamente, se utilizó el vector pRE112. Esta estrategia ha sido previamente utilizada para obtener mutaciones en *B. bronchiseptica* [5]. El plásmido pRE112, además de comportarse como vector suicida en nuestra cepa de interés, posee un marcador de contraselección, el gen *sacBI*, el cual codifica para una sacarasa que polimeriza levano, un producto que se almacena en el periplasma de bacterias Gram-negativas, resultando tóxico para ellas [30].

La estrategia se desarrolló en distintas etapas. En una primera instancia se generó una construcción en pRE112 que incluyó dos regiones circundantes a la secuencia central de *ompQ*. En una segunda etapa la construcción fue transferida a *B. bronchiseptica* RB50 y se seleccionaron aquellas bacterias que recibieron la construcción y que integraron el vector a su genoma luego de una recombinación simple. En una tercera etapa, los recombinantes elegidos fueron propagados para permitir el segundo evento de recombinación. Posteriormente, se seleccionaron a través del marcador de contraselección aquellas bacterias en las cuales tuvo lugar la segunda recombinación y que, por consiguiente, perdieron el vector. Finalmente se analizó la obtención del genotipo mutante deseado.

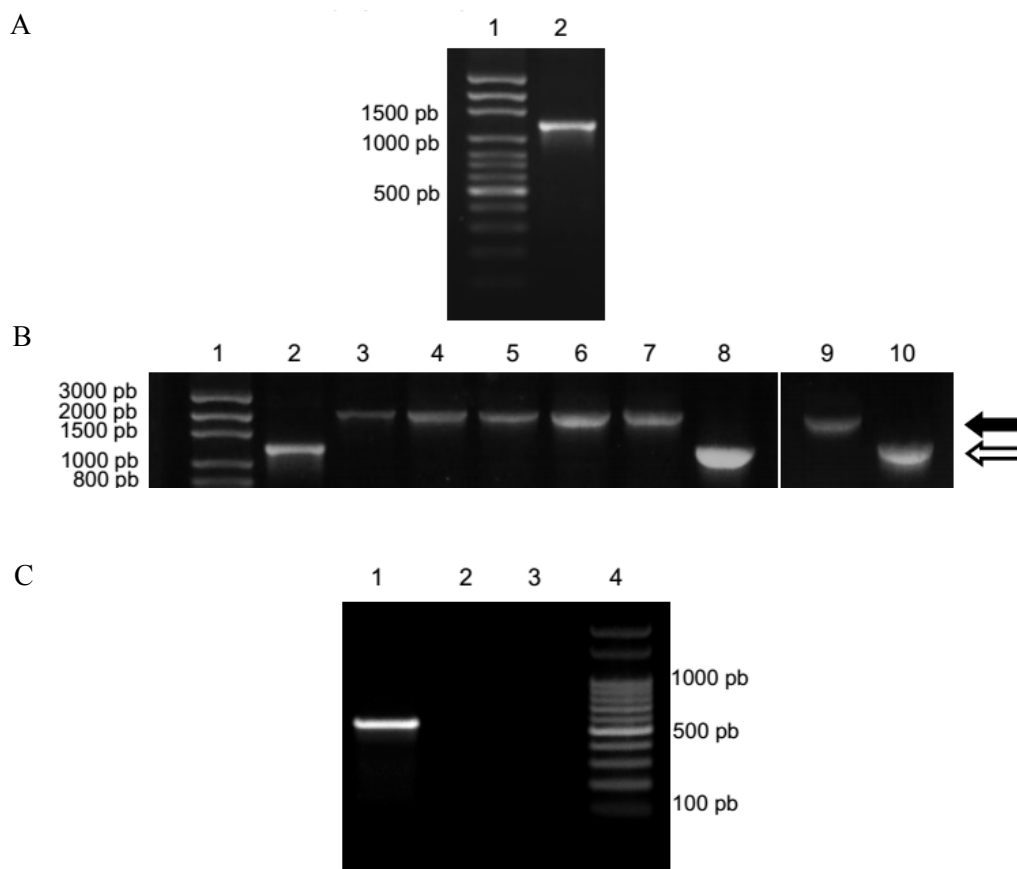
Debido a que la segunda recombinación puede resultar en el reemplazo de la copia salvaje de *ompQ* por el alelo mutante, pero también en la restauración del gen salvaje, se analizó por medio de reacciones de *colony* PCR los potenciales clones mutantes. La presencia del gen mutado corresponde a la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1200 pb, mientras que la presencia de la copia salvaje del gen *ompQ*, con la amplificación de un fragmento de unas 2100 pb, como se observa en la **Figura 4**.



**Figura 3.** Esquema de la estrategia de intercambio alélico utilizada para obtener el mutante por delección de la porina *OmpQ*.

A su vez, a manera de confirmar el reemplazo alélico en dos de los clones mutantes obtenidos, se realizaron reacciones de PCR en las que se buscó hacer amplificaciones sobre la región delecionada utilizando los cebadores Fint3993 y Rint3993. Como se observa en la **Figura 4.C**, la prueba de PCR fue negativa para los clones mutantes, mientras que resultó positiva para la cepa salvaje RB50. Esto confirmó que ambos clones poseían sólo la copia delecionada del gen de la porina OmpQ.

Luego de la identificación de los clones mutantes, se obtuvo el ADN genómico de ambos. Para cada clon, a partir del ADN purificado se amplificó por PCR la región delecionada utilizando cebadores con secuencia de apareamiento externa a la de los cebadores utilizados para generar la mutación. El fragmento de amplificación fue purificado y secuenciado utilizando los cebadores FBB3993ext y RBB3993ext. A partir de la comparación de las secuencias obtenidas con la secuencia del genoma de *B. bronchiseptica* RB50 utilizando el algoritmo BLASTN, se corroboró que, para ambos clones, la mutación ocurrió en el sitio esperado, conservando el marco de lectura dentro del gen y sin introducir modificaciones en las regiones génicas adyacentes.



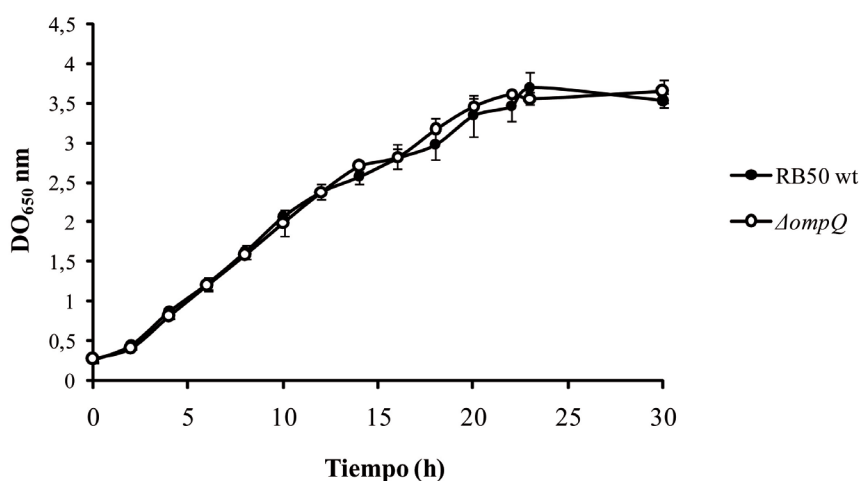
**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de **A.** Producto de amplificación realizada sobre la construcción pRE112-AB3993 utilizando los cebadores 5A3993 y 3B3993. Calle 1, marcador de peso molecular; Calle 2, pRE112-AB3993 como molde. Se puede apreciar la amplificación de un fragmento de unas 1200 pb correspondiente al inserto clonado en el vector. **B.** Productos de amplificación de *colony* PCR realizadas sobre clones seleccionados para verificar el segundo evento de recombinación. Calle 1, marcador de peso molecular; Calle 2, control positivo (utilizando al plásmido pRE112-AB3993 como molde); Calle 3, control negativo (utilizando ADN genómico de RB50 como molde); Calles 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 se utilizó ADN obtenido a partir de segundos recombinantes como molde. Se observa en los clones de las calles 8 y 10, la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1200pb (flecha blanca) en lugar del fragmento de 2000 pb (flecha negra) hallado en los demás casos. **C.** Productos de amplificación de *colony* PCR utilizando los cebadores Fint3993 y Rint3993. Calle 1, control positivo (ADN genómico de RB50 como molde); Calles 2 y 3, se utilizó ADN obtenido de clones mutantes como molde; Calle 4, marcador de peso molecular. En el caso de RB50 se observa la amplificación del fragmento interno de unas 550pb, mientras que en los dos clones aislados no hay amplificación, como resultado de la pérdida de la secuencia donde aparecen ambos cebadores

#### 4.4.3. Caracterización del crecimiento de *B. bronchiseptica* $\Delta ompQ$ en condiciones de cultivo planctónico

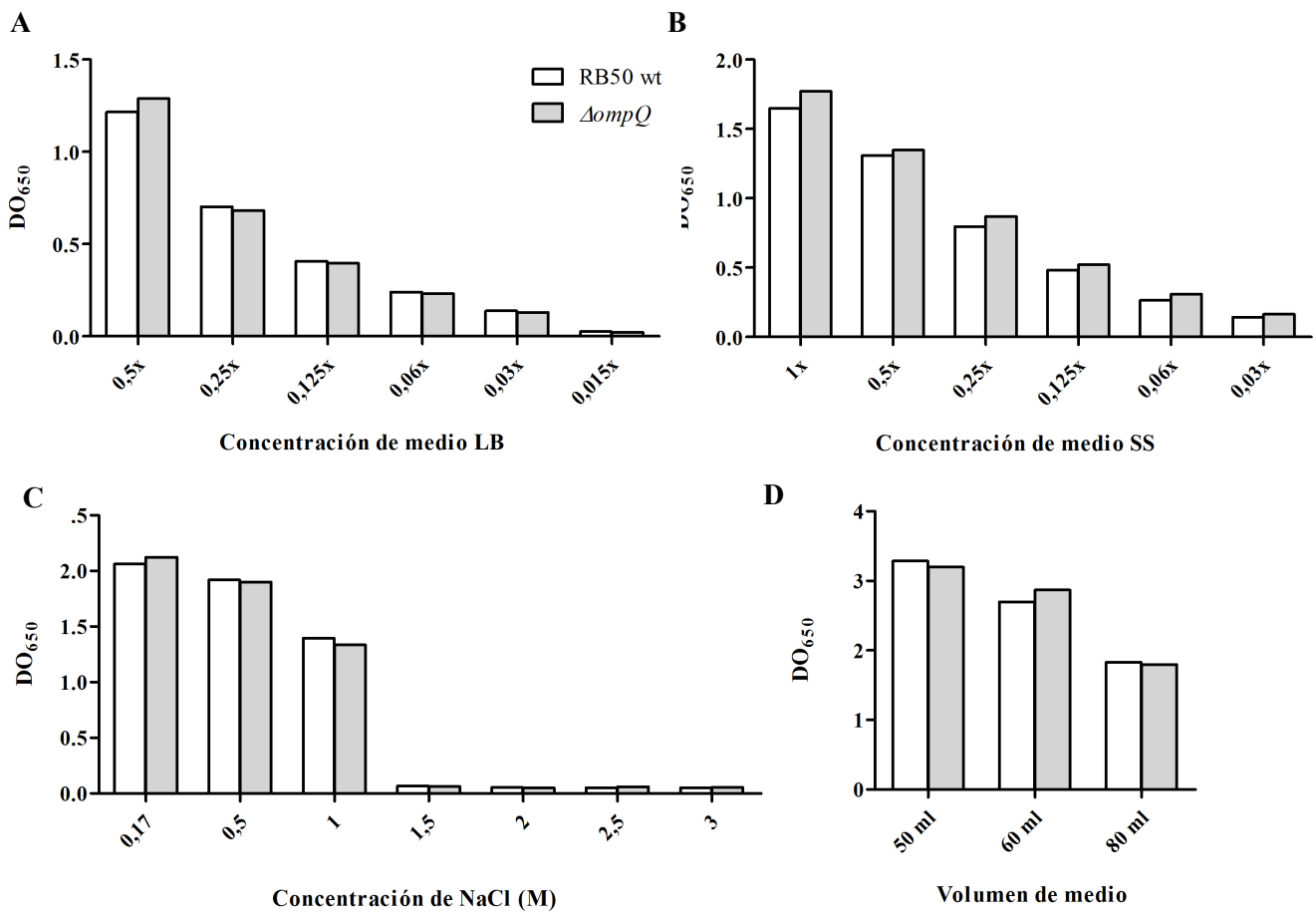
Las porinas cumplen principalmente un rol fisiológico que en muchos casos influencia la capacidad de las bacterias para sobrevivir en un determinado ambiente. Por lo tanto, comenzamos a estudiar cómo la ausencia de OmpQ impacta en la habilidad de *B. bronchiseptica* RB50 para crecer *in vitro* bajo diferentes condiciones de cultivo.

En primera instancia, analizamos las características cinéticas de crecimiento de la cepa *B. bronchiseptica*  $\Delta ompQ$ , en el medio líquido definido SS con respecto a las de la cepa salvaje. Como se observa en la **Figura 5**, ambas cepas mostraron curvas de crecimiento parecidas, alcanzando niveles similares de biomasa al final del cultivo, indicando que la ausencia de OmpQ no afecta la capacidad de *B. bronchiseptica* de crecer en estas condiciones de cultivo.

Asimismo, estudiamos comparativamente el efecto nutricional y de condiciones de estrés en el crecimiento de ambas cepas, la cepa salvaje y la mutante. Se evaluaron diferentes condiciones de cultivo, considerando aquellas en las cuales porinas de otros organismos se hallaron involucradas, como estrés hiperosmótico, limitación de nutrientes y de oxígeno, y resistencia a antibióticos [46-50]. Como se observa en la **Figura 6** y en la **Tabla 3**, en las diferentes condiciones ensayadas, la cepa mutante mostró un crecimiento similar al de la cepa salvaje.



**Figura 5.** Curva de crecimiento de *B. bronchiseptica* RB50 (círculos negros) y de *B. bronchiseptica*  $\Delta ompQ$  (círculos blancos). Medio SS fue inoculado a partir de cultivos de 12 h de cada cepa, alcanzando una DO<sub>650</sub> inicial de 0,2. El crecimiento fue monitoreado cada 2 h. los resultados presentados son representativos de tres experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar.



**Figura 6.** Crecimiento de las cepas *B. bronchiseptica* RB50 y  $\Delta ompQ$  bajo diferentes condiciones de estrés. **A.** Crecimiento en medio LB diluido. **B.** Crecimiento en medio SS diluido. **C.** Crecimiento en medio LB con diferentes concentraciones salinas. **D.** Crecimiento bajo limitación de oxígeno, donde los cultivos fueron incubados en frascos Erlenmeyer de 100 mL conteniendo un volumen de 50, 60 u 80 mL. En todos los casos la DO<sub>650</sub> fue medida luego de cultivar durante 16 h a 37 °C.

**Tabla 3.** Determinación de la resistencia a antibióticos por Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

Antibiótico	CIM(μg/ml)	
	RB50	$\Delta ompQ$
Estreptomicina	625	625
Ciprofloxacina	6,25	6,25
Gentamicina	12,5	12,5
Kanamicina	12,5	12,5
Ampicilina	5000	5000

### 4.4.4. Crecimiento de las cepas de *B. bronchiseptica* en el medio sólido ABG

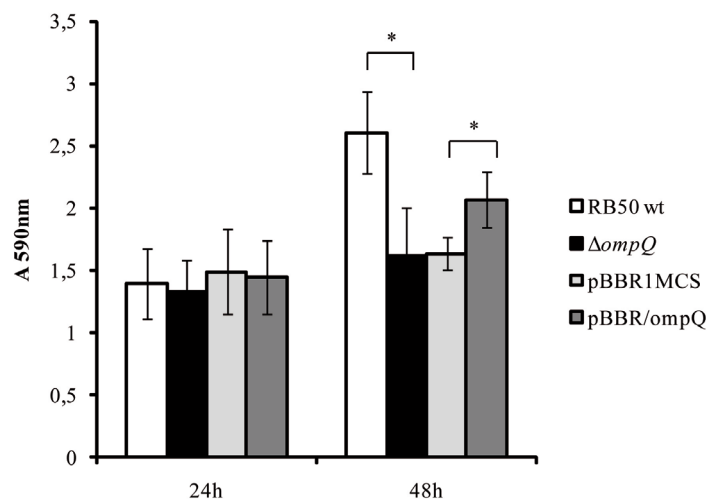
Se evaluó el crecimiento de la cepa mutante comparativamente con el de la cepa salvaje RB50 en medio sólido ABG. En este ensayo no se observaron diferencias en el crecimiento de ambas cepas, así como tampoco en el tamaño y aspecto de las colonias formadas por ellas. Para ambas cepas, las colonias mostraron  $\beta$ -hemólisis.

### 4.4.5. Crecimiento en *biofilm* de las cepas de *B. bronchiseptica*

#### 4.4.5.1. Formación de *biofilm* sobre placas multipocillo

La expresión de la porina OmpQ se encuentra regulada positivamente por el sistema de dos componentes BvgAS. Debido a que este sistema de transducción de señales a su vez controla el proceso de formación de *biofilm*, se consideró que OmpQ podría estar involucrada en este proceso. Para investigar esta hipótesis, se evaluó comparativamente la capacidad de las cepas de *B. bronchiseptica* RB50 y del mutante  $\Delta ompQ$  de formar *biofilm* en pocillos de placas de poliestireno. Este es uno de los sistemas de cultivo en *biofilm* más difundidos y estandarizados. Las placas fueron incubadas a distintos períodos de tiempo, 24 y 48 h, y la biomasa adherida a la superficie fue evaluada mediante tinción con CV, mientras que la biomasa en suspensión en la fase líquida fue determinada por medio de la medición de su DO<sub>650</sub>. Como se observa en la **Figura 7**, a las 24 h de cultivo, ambas cepas formaron virtualmente la misma cantidad de *biofilm*. Sin embargo, a las 48 h, mientras la cepa defectiva  $\Delta ompQ$  mostró casi el mismo nivel de biomasa adherida que a las 24 h, la cepa salvaje RB50 duplicó su cantidad, sugiriendo que OmpQ se vuelve importante en una etapa avanzada del ciclo de formación de *biofilm*, posiblemente cuando ocurre la maduración estructural. Esta diferencia no se atribuye a defectos en el crecimiento de la cepa mutante, ya que ambas cepas mostraron un crecimiento similar en su fracción planctónica. Para confirmar que el defecto de la cepa mutante  $\Delta ompQ$  en la formación de *biofilm* es consecuencia de la delección del gen *ompQ*, se analizó el crecimiento en *biofilm* de la cepa  $\Delta ompQ$  expresando el gen *ompQ* suplementado en trans. Como control se utilizó la cepa  $\Delta ompQ$  transformada con el plásmido utilizado para la complementación vacío. Los resultados muestran que la cepa  $\Delta ompQ$  complementada ciertamente forma más *biofilm* que la cepa  $\Delta ompQ$  que porta el vector vacío, aunque la complementación es parcial, lo cual podría deberse a la presencia del antibiótico en el medio de cultivo (**Figura 7**).

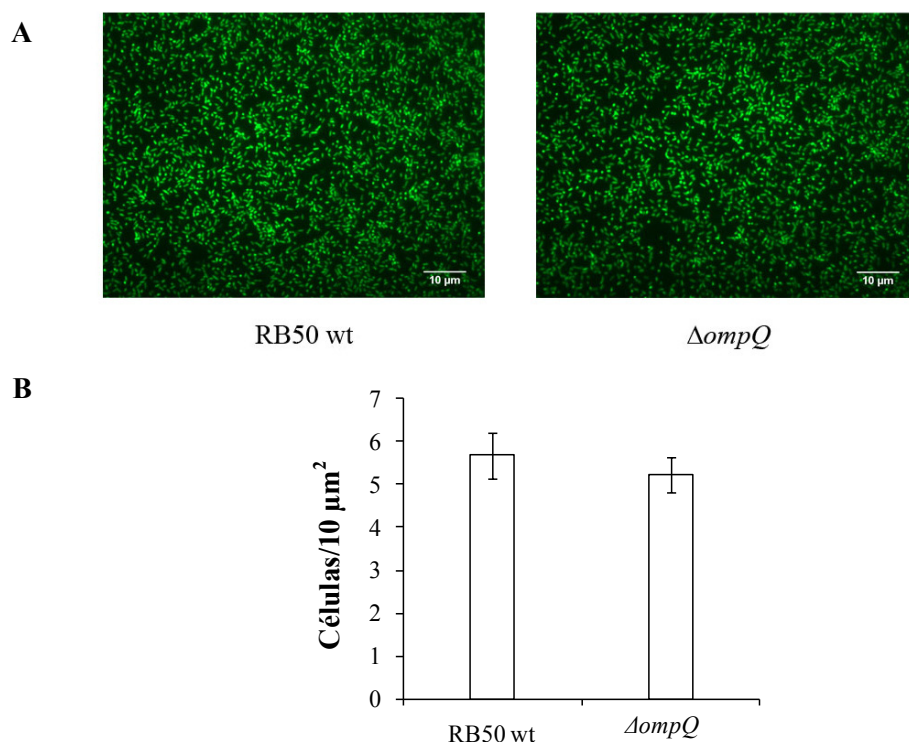




**Figura 7.** Cuantificación de la formación de *biofilm*. Se determinó la biomasa del *biofilm* formado por las cepas *B. bronchiseptica* RB50,  $\Delta ompQ$ , pBBR1MCS (control de complementación) y pBBR/ompQ (cepa complementada). Cada barra indica la absorbancia a 590 nm del cristal violeta solubilizado. Se muestra el promedio de tres ensayos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. La significancia estadística fue analizada por el Test de Student, los asteriscos indican un valor  $P < 0.05$ .

#### 4.4.5.2. Efecto de la ausencia de expresión de OmpQ en la adhesión a cubreobjetos de borosilicato

Adicionalmente, nos propusimos ganar una mayor perspectiva en la capacidad de adherir y crecer como *biofilm* de la cepa  $\Delta ompQ$  utilizando microscopía de fluorescencia y microscopía de escaneo láser confocal. Con este objetivo, las cepas salvaje y mutante fueron transformadas con un plásmido conteniendo el gen *egfp* (de *enhanced green fluorescence protein*) bajo el control de un promotor constitutivo. Las bacterias marcadas con GFP fueron utilizadas para inocular placas de 6 pocillos conteniendo un cubreobjetos en su superficie, a una  $DO_{650}$  de 0,05. Luego de 2 h de incubación a 37°C, las bacterias adheridas al vidrio de borosilicato fueron visualizadas por medio de microscopía de fluorescencia y cuantificadas utilizando una herramienta de conteo operada con el programa ImageJ (**Figura 8**). Un promedio de 5,2 y 5,7 células por cada  $10 \mu m^2$  fueron detectadas para la cepa  $\Delta ompQ$  y la cepa salvaje respectivamente, lo cual demuestra que la ausencia de OmpQ no produce una deficiencia en la adhesión a la superficie estudiada.



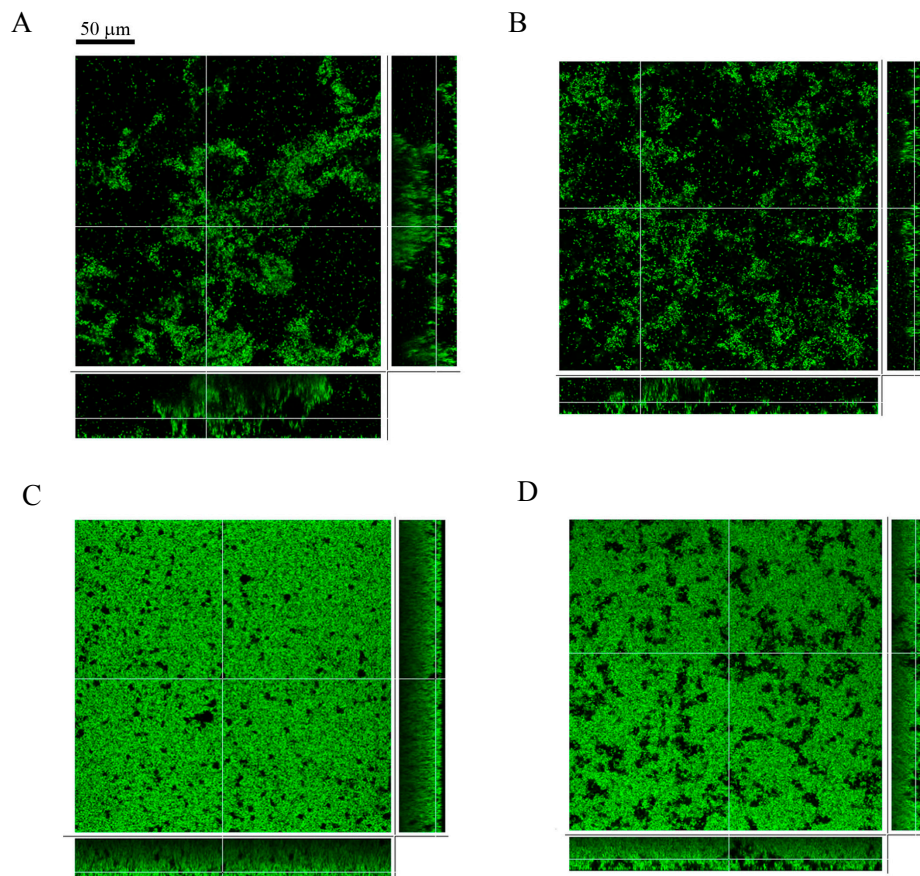
**Figura 8.** Análisis de la adhesión a cubreobjetos por las cepas *B. bronchiseptica* RB50 y  $\Delta ompQ$ . **A.** Micrografías de fluorescencia de bacterias luego de 2 h de adhesión a 37°C. **B.** Cuantificación de las células adheridas. El número de células fue determinado con la herramienta ITCN, un plug in del software ImageJ. Las barras de error indican la desviación estándar.

#### 4.4.5.3. Análisis estructural de *biofilms* producidos en sistemas de cultivo estático y de flujo continuo

Para el estudio estructural de los *biofilms* formados por ambas cepas, salvaje y mutante, se utilizó como sistema de cultivo cámaras de cultivo Lab-Tek, las cuales contienen como base un vidrio de 1 mm de espesor compatible con la visualización utilizando un microscopio invertido. Cada pocillo de la cámara fue inoculado con una suspensión de la cepa bacteriana correspondiente expresando GFP, a una  $DO_{650}$  de 0,05, el cultivo fue realizado durante 48 h a 37°C en condiciones estáticas. Los *biofilms* fueron examinados por microscopía confocal, adquiriendo colecciones de imágenes tomadas a lo largo del eje z, las cuales fueron luego analizadas utilizando los software Imaris y COMSTAT 2. Como se observa en la **Figura 9.A** y **9.B**, la cepa salvaje *B. bronchiseptica* RB50 desarrolló microcolonias distribuidas de forma irregular relativamente anchas (en algunos casos mayores a 60  $\mu\text{m}$  de ancho) y de un espesor considerable (en promedio de 42  $\mu\text{m}$ ). Estas características de la cepa salvaje fueron consistentes con aquellas previamente reportadas [7]. En contraste, la cepa  $\Delta ompQ$

formó microcolonias significativamente más pequeñas, cuyo espesor promedio fue de 27  $\mu\text{m}$  (**Tabla 4**).

A su vez, se estudió el efecto de la ausencia de OmpQ durante el crecimiento en *biofilm* en condiciones de cultivo con flujo continuo de nutrientes. Nuevamente, no se observaron diferencias a las 24 h de cultivo, mientras que a las 48 h, la cepa mutante mostró menores valores de biomasa, altura máxima y altura promedio (**Figura 9.C y 9.D y Tabla 4**). Una característica interesante que resultó evidente fue que el *biofilm* producido por  $\Delta\text{ompQ}$  presentó un número mayor y más grandes de canales de agua. Esta característica podría ser una estrategia estructural para facilitar el acceso a nutrientes dentro del *biofilm*, en un modo de compensar la ausencia del transportador.



**Figura 9.** Análisis por microscopía de escaneo laser confocal de los *biofilms* formados por las cepas *B. bronchiseptica* RB50 y  $\Delta\text{ompQ}$ . Las cepas *B. bronchiseptica* RB50 (paneles de la izquierda) y la cepa  $\Delta\text{ompQ}$  (paneles de la derecha) marcadas con la proteína GFP fueron cultivadas en cámaras de cultivo estático (A-B) y en cámaras de flujo continuo (C-D). Se muestran micrografías representativas de biofilms de 48 h en los planos x-y, y-z y x-z.

## Capítulo 4

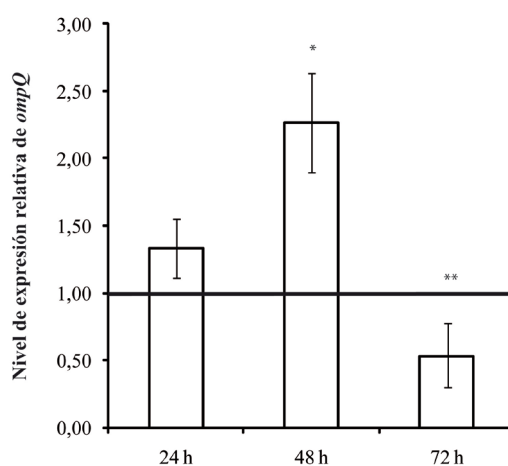
**Tabla 4.** Parámetros estructurales de *biofilms* cultivados en sistemas estáticos y de flujo continuo.

Sistema de cultivo	Tiempo	Cepa	Biomasa	Altura máxima	Altura promedio
			( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ )	( $\mu\text{m}$ )	( $\mu\text{m}$ )
			Valor (SD)	Valor (SD)	Valor (SD)
Estático	24 h	RB50 wt	2,244 (0,153)	31,977 (1,918)	1,326 (0,079)
		$\Delta ompQ$	1,839 (0,473)	30,879 (0,447)	1,273 (0,202)
	48 h	RB50 wt	2,493 (1,46)	42,33 (14,16)	13,17 (5,17)
		$\Delta ompQ$	1,55 (0,70)	27,47 (7,73)	6,16 (2,76)
Flujo continuo	24 h	RB50 wt	3,123 (1,490)	19,101 (1,509)	8,154 (1,285)
		$\Delta ompQ$	2,973 (0,795)	16,655 (3,490)	6,750 (1,707)
	48 h	RB50 wt	12,93 (2,62)	28,19 (3,19)	17,69 (2,56)
		$\Delta ompQ$	8,04 (3,07)	24,25 (2,69)	13,45 (3,59)

En su conjunto, el análisis microscópico también soporta la idea de que OmpQ cumple un rol en la formación de *biofilm* de *B. bronchiseptica*, particularmente en una etapa cuando el *biofilm* desarrolla su estructura madura.

#### 4.4.6. Análisis de la expresión de *ompQ* a lo largo del cultivo en *biofilm*

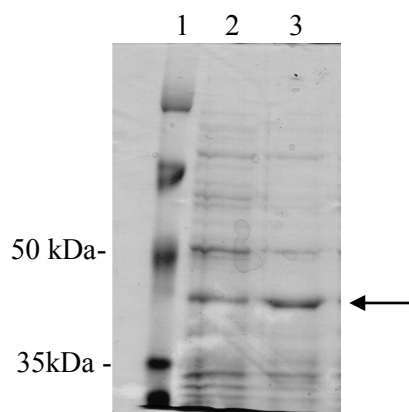
El hecho de que OmpQ se vuelve relevante en el momento en el que el *biofilm* necesita consolidar su estructura (es decir, entre las 24 y 48 h), nos llevó a pensar si la expresión de la porina se encuentra alterada en esta etapa. Para estudiar esto, se analizó, utilizando qPCR, el nivel de expresión de *ompQ* en células de *B. bronchiseptica* RB50 crecidas en *biofilm* a las 24, 48 y 72 h de cultivo. Los niveles de expresión fueron comparados con aquellos encontrados en células planctónicas de la cepa RB50 recolectadas en fase exponencial de crecimiento. Mientras que las células de *biofilm* de 24 h mostraron un incremento menor de la expresión relativa de *ompQ* con respecto a células planctónicas creciendo exponencialmente, células de *biofilms* de 48 h mostraron niveles de expresión relativa de *ompQ* que fueron más de dos veces mayores que aquellos encontrados en la población planctónica (**Figura 10**). A su vez, la expresión de *ompQ* disminuyó significativamente en células de *biofilm* de 72 h. Debido a que los defectos de la cepa mutante *B. bronchiseptica*  $\Delta ompQ$  observados a las 48 h se extienden a lo largo del tiempo (al menos observado hasta 96 h), estos resultados sugieren que el claro incremento del nivel de ARNm de *ompQ*, y probablemente los niveles de proteína OmpQ, a las 48 h, sería necesario para promover el desarrollo y posiblemente el mantenimiento de un *biofilm* maduros.



**Figura 10.** Expresión relativa del gen *ompQ* a lo largo del proceso de formación de *biofilm*. El nivel de expresión relativa se determinó por medio de *PCR* cuantitativa en tiempo real en *biofilms* cultivados durante 24, 48 y 72 h (el nivel de expresión de *ompQ* en condición planctónica se indica como 1). El mRNA 16 S fue utilizado como control de estandarización. La significancia estadística de los cambios en la expresión fue analizada por el Test de Student, los asteriscos \* y \*\* indican un valor  $P < 0,05$  y  $0,01$  respectivamente. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM de al menos tres replicados biológicos y dos replicados técnicos. El nivel de cambio fue calculado utilizando el método  $\Delta\Delta Ct$  [9].

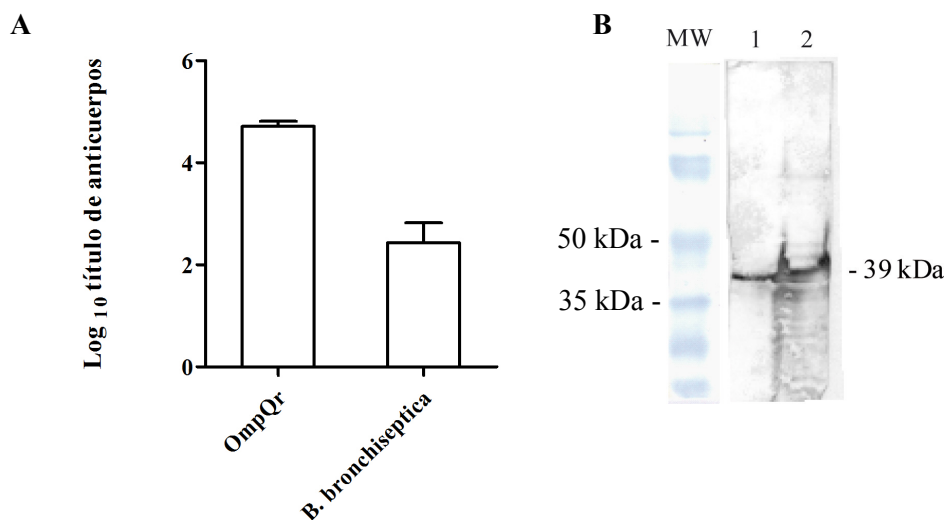
#### 4.4.7. Expresión de OmpQ recombinante (OmpQr) y obtención de suero anti-OmpQr

Sobre la base de que OmpQ se muestra relevante para la maduración del *biofilm* de *B. bronchiseptica*, que es una proteína de membrana externa y que ha sido propuesta como un antígeno con generación de anticuerpos luego de una infección por *B. pertussis* [51, 52], nos propusimos analizar si anticuerpos contra OmpQ podrían tener algún efecto sobre la formación de *biofilm*. Para ello, se decidió obtener la porina de forma recombinante. De este modo, la secuencia codificante para el gen *ompQ* sin su secuencia señal de exportación, fue clonada en un plásmido para su expresión en la cepa *E. coli* BL21 Codon-Plus. La estrategia utilizada consistió en diseñar una construcción en la que una cola de 6 histidinas sea agregada a la secuencia aminoacídica de la proteína OmpQ, para luego facilitar la purificación de la misma. La inducción de la expresión de la proteína OmpQr se realizó durante 4h, luego del agregado del inductor IPTG al medio de cultivo. La expresión de la proteína recombinante se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (**Figura 11**), observándose la sobreexpresión de la proteína de unos 40 kDa aproximadamente. La purificación de OmpQr se realizó por medio de una cromatografía de afinidad, utilizando una resina con cobalto, la cual se compleja con la cola de 6 histidinas presentes en OmpQr.



**Figura 11.** SDS-PAGE al 10%. Se muestra la inducción de la expresión de OmpQr en *E. coli*. Las bacterias fueron cultivadas hasta una  $DO_{600}$  de 0,4, la expresión de la proteína recombinante fue inducida durante 3 h al agregar IPTG 0,5 mM. Línea 1, marcador de peso molecular; línea 2, lisado celular sin inducir; línea 3, lisado celular luego de la inducción. La flecha indica la presencia de OmpQr.

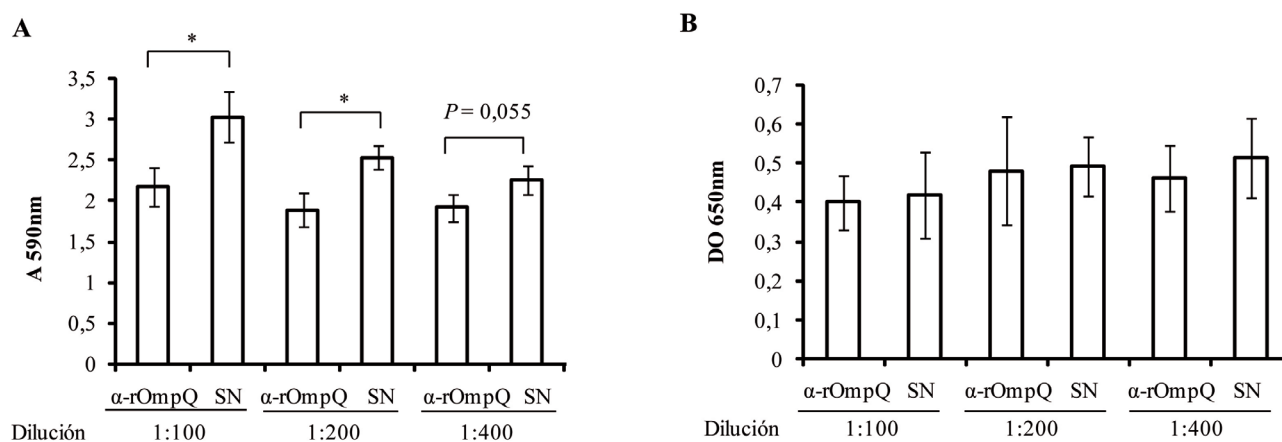
Luego de obtener la proteína recombinante, se la utilizó para generar anticuerpos en ratones. Para ello, se inmunizaron ratones BALB/c con OmpQr formulada en adjuvante de Freund completo (primera inmunización) o con Freund incompleto (inmunizaciones subsiguientes). Se recolectaron muestras de suero al momento de cada inmunización y luego de 15 días de la última inmunización. Los títulos para los anticuerpos específicos obtenidos fueron determinados por ELISA (**Figura 12.A**). Adicionalmente, el suero fue evaluado para el reconocimiento de OmpQ por medio de Western Blot. Como se muestra en la **Figura 12.B**, en un lisado de células de *B. bronchiseptica* RB50 fue detectada por el suero una única banda del mismo tamaño de OmpQr lo que demostró su especificidad. El suero mostró a su vez reactividad en la muestra de OmpQr en bandas de diferente peso molecular. Esto puede ser el resultado de una reacción cruzada con proteínas inespecíficas del lisado post-inducción de *E. coli* o bien OmpQr degradada que se encontraban presentes en la muestra de proteína purificada. Sin embargo, el suero mostró una reactividad específica hacia una única proteína en el lisado celular de *B. bronchiseptica*.



**Figura 12.** Reconocimiento de OmpQr por sueros de ratones inmunizados. **A.** El título de sueros de ratones inmunizados con OmpQr fue determinado mediante ensayos de ELISA en placas sensibilizadas con células enteras de *B. pertussis* o bien con OmpQr. Los resultados muestran la media  $\pm$  DE. **B.** Cinco  $\mu$ g de muestras de lisado total de RB50 (línea 1) y OmpQr purificada (línea 2) se corrieron en electroforesis de poliacrilamida SDS-PAGE (12%) y fueron transferidos a una membrana de PVDF. El análisis por inmunoblot se realizó con el suero policlonal de ratón obtenido contra OmpQr, y con anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con fosfatasa alcalina.

#### 4.4.8. Ensayo de inhibición de la formación de *biofilm*

Con el fin de estudiar si el suero anti-OmpQr interfiere con la formación de *biofilm* de *B. bronchiseptica*, suspensiones bacterianas de la cepa RB50 fueron suplementadas con tres diluciones diferentes de suero (1:100, 1:200 y 1:400), inoculadas en placas multipocillos e incubadas durante 48 h a 37°C. De manera análoga, suero normal pre-inmune diluido en la misma proporción fue utilizado como control negativo para el ensayo. Los *biofilms* fueron cuantificados luego de 48 h de crecimiento por medio de tinción con cristal violeta. En concordancia con nuestra hipótesis, se encontró que el suero anti-OmpQr redujo de forma significativa la formación de *biofilm* por RB50 (**Figura 13.A**). Esta reducción fue proporcional a la cantidad de suero presente en el medio de cultivo, reduciendo entre un 14 y un 28 % la biomasa del *biofilm* resultante, cuando se compara a las condiciones con diluciones similares de suero pre-inmune utilizadas. No se observaron diferencias significativas en la fracción de crecimiento planctónico (**Figura 14.B**). Estos resultados se asemejan al efecto de la delección de *ompQ* y apoyan el rol de OmpQ en la formación de *biofilms* maduros por *B. bronchiseptica*.



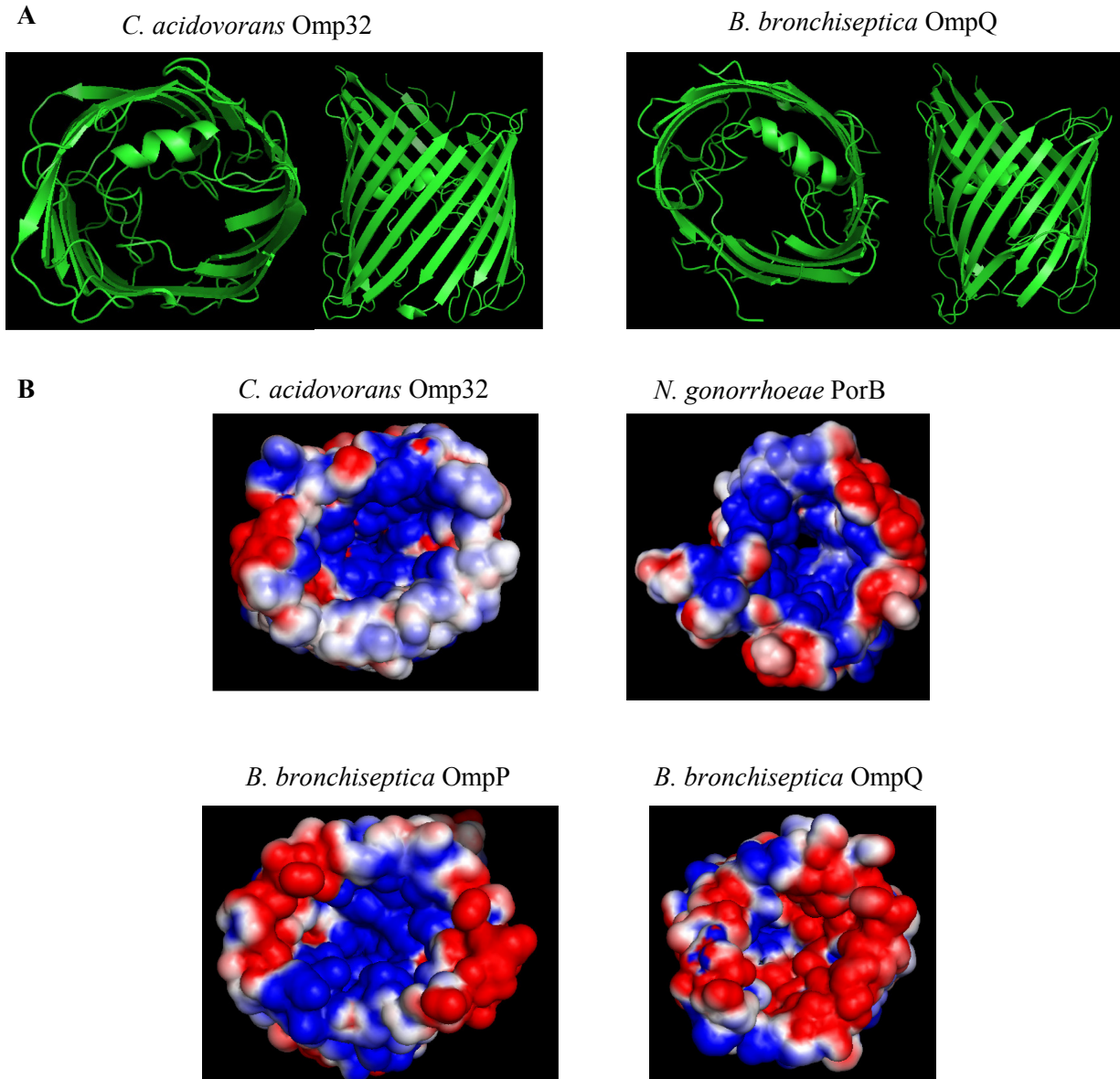
**Figura 13.** Ensayo de inhibición de la formación de *biofilm*. Varias diluciones de suero anti-OmpQr fueron agregadas al medio de cultivo SS. Suero normal pre-inmune (SN) fue utilizado como control negativo en las mismas diluciones ensayadas para el suero anti-OmpQr ( $\alpha$ -rOmpQ). El ensayo se realizó en placas multipocillo durante 48 h y el *biofilm* fue cuantificado por el método de CV. **A.** Cada barra representa los valores promedio de la A590 del CV solubilizado. **B.** El crecimiento planctónico fue evaluado luego de 48 h de cultivo, midiendo la DO<sub>650</sub> del medio recuperado. Las barras de error indican la desviación estándar. La significancia estadística fue determinada por el Test de Student, los asteriscos indican un valor  $P < 0,05$ .



#### 4.4.9. Análisis bioinformático de la estructura proteica de OmpQ y OmpP

Mediante el estudio de secuencias de porinas con homología a OmpQ, nos propusimos obtener un modelo que aproxime a la estructura de esta porina, a modo de analizar posibles características que permitan un acercamiento al estudio de su función. Se encontraron varias estructuras de porinas cristalizadas con significancias estadísticas en su homología con OmpQ (2fgq, 2vy8, 1e54 y 4aui de varios organismos). Utilizando estas estructuras como moldes, se obtuvieron modelos estructurales para OmpQ y OmpP. Ambas porinas poseen un 61% de similitud, y un 39% de identidad sobre su secuencia proteica, estos valores podrían indicar una funcionalidad similar en ambas proteínas, o bien sólo corresponder al grado esperado de homología en una familia de proteínas que conservan una estructura común en diferentes organismos. Por este motivo, decidimos incluir a OmpP en el estudio de modelado proteico, a modo de evaluar posibles diferencias estructurales con respecto a OmpQ. Como se observa en la **Figura 14.A**, los modelos hallados presentan la estructura típica de barril de hojas  $\beta$  antiparalelas, compuestas por hebras  $\beta$  anfipáticas [53].

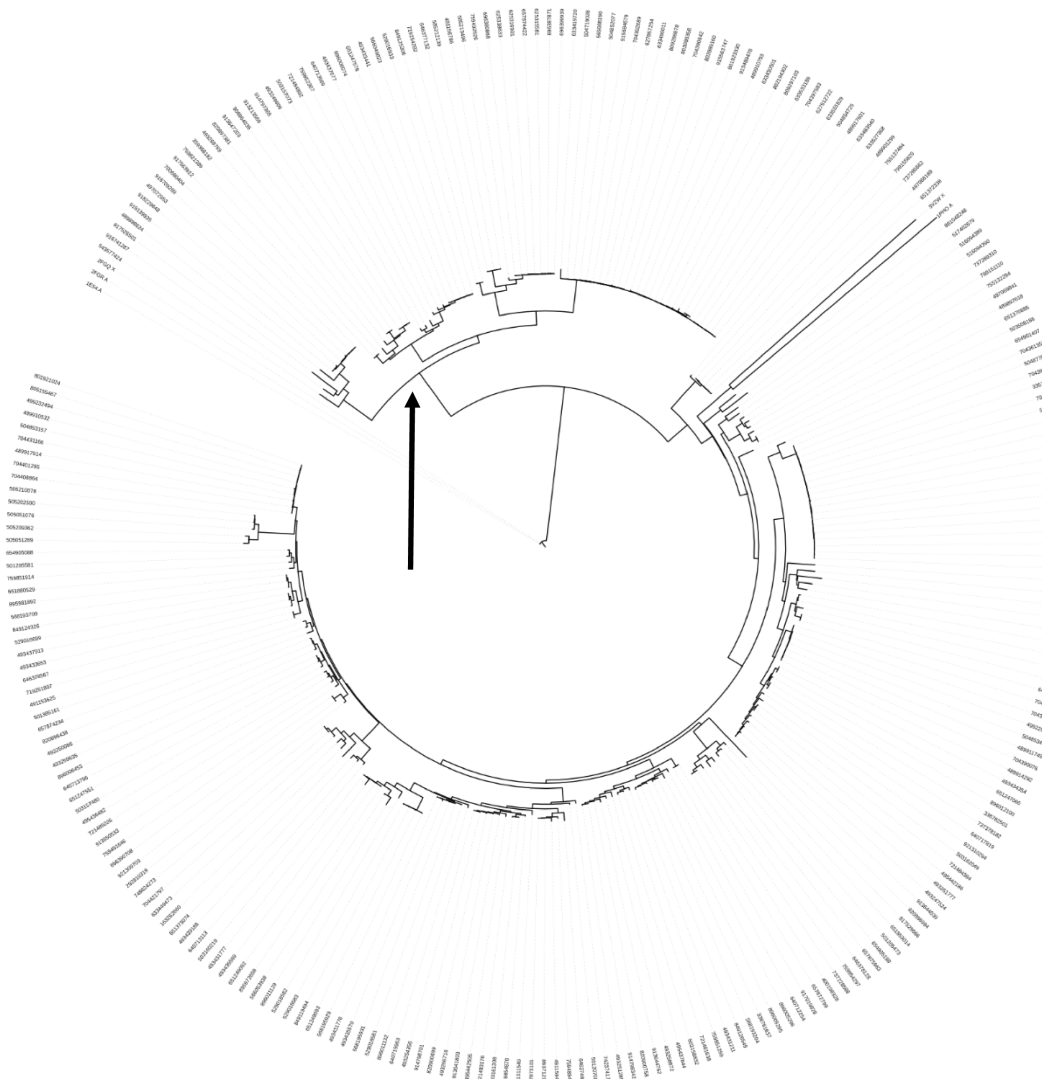
Por otro lado, se analizó la distribución de cargas electroestáticas en los modelos proteicos hallados. Como se observa en la **Figura 14.B**, encontramos una distribución diferencial en las cargas presentes en OmpQ en referencia a las de OmpP, y así como la distribución observada en otras porinas bien caracterizadas, como Omp32 de *Comamonas acidovorans* (PDB 1e45) o la porina PorB de *Neisseria gonorrhoeae* (PDB 4aui), ambas incluidas como proteínas homólogas cercanas halladas por búsquedas de secuencia. Debido a que el tipo de campo electroestático presente en el canal de las porinas define una clase general de moléculas a ser transportadas, las diferencias observadas entre OmpQ y OmpP podrían indicar una diferenciación funcional.



**Figura 14.** Representación de la estructura de las porinas OmpQ y OmpP. **A.** Estructuras de la porinas Omp32 de *C. acidovorans* (PDB 1e45) y de OmpQ (vistas laterales e inferiores). **B.** Distribución de cargas electrostáticas en la superficie de las porinas Omp32 de *C. acidovorans*, PorB de *N. gonorrhoeae* (PDB 4aui), OmpP y OmpQ. La orientación es observada desde la cara inferior. Se puede observar que en los canales de Omp32 y OmpP la distribución es positiva en su mayoría (color azul), mientras que es negativa en OmpQ (color rojo).

Un dato interesante es que en el árbol filogenético obtenido para las 250 porinas con alto *score* en la búsqueda de proteínas homólogas, OmpQ de *B. bronchiseptica* forma un clúster separado (**Figura 15**) junto con otras proteínas ortólogas de diferentes *Bordetellae* (como *B. pertussis*, *B. trematum*, *B. holmesii*, *B. hinzii*, y aislamientos de *B. bronchiseptica*), y unas pocas proteínas putativas de organismos no relacionados (como

*Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Achromobacter insuaves* y *Kerstersia gyiorum*, ninguna de ellas previamente estudiadas). Apartado de este grupo, se observa un gran clúster en el que se hallan porinas bien caracterizadas, junto con proteínas cristalizadas, y que incluye a OmpP. Este resultado refuerza la idea de que nos encontraríamos ante una adaptación funcional en la selectividad del canal y/o la función de la proteína que ha ocurrido durante la evolución de OmpQ, de forma específica para *Bordetella*.



**Figura 15.** Estimación filogenética de proteínas cercanamente homólogas a OmpQ. La flecha indica el clúster que contiene a OmpQ de *B. bronchiseptica*. Las proteínas en este clúster muestran características diferenciales en la distribución del potencial electroestático el canal, que podría indicar una adaptación evolutiva funcional. El valor de confianza *Bootstrap* para este nodo fue de 86%.



#### 4.5. Discusión

Las porinas son proteínas de membrana externa que se ensamblan como oligómeros y que permiten el transporte a través de la membrana de solutos hidrofílicos, como iones, aminoácidos, nucleósidos, y azúcares; y que en algunos casos pueden excluir la entrada de antibióticos u otros inhibidores, contribuyendo a la resistencia a agentes antimicrobianos [12-14]. OmpQ es una de las dos porinas mayoritarias identificadas en el género *Bordetella*. La otra porina, OmpP, es una porina general de unos 40 kDa, de expresión constitutiva y con selectividad por sustratos aniónicos [17]. Los pocos reportes sobre OmpQ son controversiales. Por un lado, Finn y colaboradores [19], mostraron que la ausencia de OmpQ no afecta la capacidad de *B. pertussis* de colonizar el tejido pulmonar de ratones, descartando la posibilidad de que esta proteína pueda jugar un rol en la sobrevivencia de esta bacteria dentro de su hospedador. Por otro lado, estudios recientes de proteómica proponen a OmpQ como un nuevo antígeno candidato a ser protector [20-24], e incluso sugieren que OmpQ podría cumplir un rol en la patogénesis de *Bordetella* [22].

A partir de resultados obtenidos en estudios de proteómica realizados en nuestro laboratorio con el fin de caracterizar el fenotipo de *biofilm* en *B. pertussis*, se observó que las porinas OmpP y OmpQ se hallaban sobreexpresadas en esta condición de crecimiento [10, 11]. Varios reportes han asociado la presencia de una porina particular con la virulencia bacteriana y la capacidad de formar *biofilms*, como es el caso de OpdF y OprF, porinas específica de sustrato y general, respectivamente, que contribuyen a la formación de *biofilm* por *P. aeruginosa* [48, 54]. A su vez, la expresión de OmpQ se encuentra regulada positivamente por BvgAS, el cual controla el proceso de formación de *biofilm* en *Bordetella* tanto in vitro como in vivo.

Por este motivo, resultó de interés estudiar la participación de estas proteínas en este proceso. En una primera etapa, considerando que la función de las porinas podría resultar esencial para la bacteria, decidimos analizar rápidamente el efecto de una mutación por inserción en cada gen correspondiente. A pesar de reiterados intentos no se obtuvo ningún recombinante que presentara la interrupción de *ompP*, lo cual indicaría que este gen sería esencial para la sobrevivencia de la bacteria en las condiciones de estudio ensayadas. Debido a que *ompP* no forma parte de un operón y a que la interrupción de este gen, en principio, no afectaría las regiones intergénicas de los genes

adyacentes, se descartan posibles efectos polares asociados con la mutación. Por otro lado, cuando se utilizó la misma estrategia para la interrupción del gen *ompQ*, se obtuvieron recombinantes que mostraron la integración del vector en el genoma. Esto confirmó que este gen no es esencial, como así lo sugiere el hecho que su expresión se encuentra regulada por el sistema BvgAS, o sea que se expresa únicamente en condiciones de virulencia.

Considerando estos resultados, se decidió avanzar en la obtención de una mutación estable para la proteína OmpQ. De este modo, se siguió una estrategia de mutación por intercambio alélico, la cual lleva a la delección del gen *ompQ*. Debido a que las porinas juegan principalmente un rol fisiológico que en muchos casos determina la habilidad de una bacteria de sobrevivir en un ambiente particular, en primer lugar se evaluó si la ausencia de OmpQ afectaba la capacidad de *B. bronchiseptica* para crecer en el medio definido SS. Bajo esta condición de cultivo, OmpQ no parece poseer un rol fisiológico significativo que impacte en el crecimiento de la bacteria. Este resultado tal vez no sea muy sorprendente, considerando que OmpQ es un factor regulado por BvgAS y por lo tanto *B. bronchiseptica* podría prescindir de esta porina cuando transita la fase avirulenta. Sin embargo, es de alguna manera sorprendente que OmpQ no contribuya significativamente a enfrentarse con alguno de los estreses ambientales frecuentes, como cambios osmóticos, limitación de nutrientes y de oxígeno e incluso la presencia de antibióticos. Los ensayos realizados sobre el comportamiento frente a condiciones de estrés, no mostró que la ausencia en la expresión de OmpQ afectara el crecimiento de estas bacterias en medios de cultivo líquido bajo las presiones ensayadas.

A continuación, se analizó la capacidad de producir *biofilms* por la cepa defectiva de OmpQ. En este caso, encontramos que la cepa *B. bronchiseptica*  $\Delta ompQ$  tiene una capacidad disminuida de formar *biofilms* maduros cuando se la compara con la cepa salvaje creciendo en similares condiciones de cultivo (placas multipocillo, sistema batch). Aunque hasta las 24 h de crecimiento adherido a superficie, las cepas salvaje y mutante mostraron biomásas similares, una reducción en la misma fue evidente para la cepa mutante luego de 48 h de incubación. A este tiempo de cultivo, el *biofilm* de la cepa salvaje de *B. bronchiseptica* alcanza una estructura más organizada y madura, tal como ha sido previamente reportado [2, 7].

---

Asimismo, utilizando análisis por microscopía, se demostró que, mientras la ausencia de OmpQ no afecta la habilidad de la cepa mutante de adherirse a superficies abióticas, sí es incapaz de producir estructuras de *biofilm* altamente organizadas luego de 48 h de cultivo similares a los de la cepa salvaje. Estos resultados señalan la necesidad de OmpQ para alcanzar una estructura madura en el *biofilm* de *B. bronchiseptica*. Cuando se forma un *biofilm*, el crecimiento bacteriano se organiza en una estructura compleja representada por las microcolonias. La maduración de un *biofilm* depende de la difusión de los nutrientes dentro del mismo, un proceso que se ve afectado no sólo por la complejidad de la estructura del *biofilm*, sino también por la naturaleza del nutriente y de la matriz [55]. En este escenario, las bacterias dentro del *biofilm* pueden detectar una reducción de la disponibilidad de algunos nutrientes y como consecuencia, podrían utilizar un transportador de nutrientes particular, tal vez de alta afinidad a modo de facilitar la entrada de un sustrato específico.

La importancia de OmpQ en la maduración del *biofilm* está sustentada a su vez por la evidencia de que la expresión del gen *ompQ* en las condiciones de cultivo estudiadas se incrementa en células sésiles a las 48 h de cultivo, tal como se observó en el análisis por qPCR. El patrón de expresión hallado en nuestras condiciones experimentales se correlaciona con aquel reportado por Nicholson y colaboradores [8], donde se llevó a cabo un estudio de la transcriptómica a lo largo del proceso de formación de *biofilm* de *B. bronchiseptica* desde las 6 hasta a las 48 h de cultivo. Tomando estos resultados en su conjunto, podemos concluir que OmpQ tiene un rol en el desarrollo del *biofilm* maduro de *B. bronchiseptica*, aunque su mecanismo molecular queda aún por ser determinado. Nuestros resultados muestran claras diferencias en las características estructurales del *biofilm* formado por la mutante defectiva en OmpQ cuando la población microbiana es crecida en sistema batch o bajo flujo continuo de nutrientes. Es evidente que la mutante “siente” la falta de la porina cuando se hacen más notorias las limitaciones de nutrientes (crecimiento batch a 48 h de desarrollo). Bajo condiciones de flujo continuo de medio de cultivo la limitación de nutrientes es menor y por tanto en esa condición las diferencias en cuanto a biomasa de *biofilm* no son tan marcadas como en el sistema de cultivo batch, de todas formas la población sésil muestra una particular estructura con mayor cantidad de canales que “compensaría” en parte una limitación parcial.

Varios estudios han mostrado el efecto de la aplicación de anticuerpos contra componentes de superficie bacteriana en la formación de *biofilm*, a modo de un primer acercamiento a inhibir este proceso in vitro [56, 57]. De este modo, nos propusimos estudiar el efecto de la presencia de anticuerpos contra OmpQ en el desarrollo del *biofilm* de *B. bronchiseptica*. Con este objetivo, la proteína fue expresada de forma recombinante, purificada y utilizada para obtener suero policlonal en ratones. El suero obtenido mostró especificidad únicamente por OmpQ. Al agregar diferentes diluciones del suero anti-OmpQr al medio de cultivo utilizado en los ensayos de formación de *biofilm* por la cepa salvaje, observamos una reducción significativa en la biomasa final de *biofilm* alcanzado, de manera análoga al observado para la cepa mutante defectiva de OmpQ. Estos resultados sugieren que OmpQ podría ser un candidato potencial para el estudio de la prevención del desarrollo en *biofilm* de *B. bronchiseptica* in vivo.

Finalmente, mediante el estudio bioinformático estructural de OmpQ hallamos que dicha porina posee una distribución de cargas electrostáticas opuestas a la de OmpP. Esta característica implicaría una diferenciación en ambas proteínas, que podría significar funciones opuestas en cuanto al transporte de solutos. La distribución de cargas predominantemente negativas en OmpQ podría significar una preferencia por sustratos cargados positivamente. Asimismo, al estudiar la filogenia de OmpQ en comparación a porinas con alto grado de similitud, encontramos que OmpQ agrupa separada de la mayoría de las proteínas, asociándose con ortólogos de la especie *Bordetella*. Este resultado refuerza la idea de una diferenciación en las características estructurales y consecuentemente en la función de OmpQ del resto de las porinas. Este aspecto podría ser mejor comprendido mediante la determinación estructural por cristalografía de OmpQ, lo que a su vez daría información sobre el tipo de moléculas que son transportadas por esta proteína.



---

#### 4.6. Conclusiones

Los resultados presentados en este Capítulo revelan por primera vez la participación de la porina OmpQ en un proceso que tiene implicancias en la patogénesis de *B. bronchiseptica*, y que podría también tener su correlato en *B. pertussis*. En este Capítulo han sido presentadas varias líneas de evidencia indicando que OmpQ es una proteína crucial para la formación de un *biofilm* maduro por *B. bronchiseptica*.

OmpP parecería ser una proteína esencial a la bacteria, debido a que no fue posible obtener un mutante defectivo para la misma.

La ausencia de OmpQ parece no ser importante para el crecimiento de células planctónicas aunque un rol más importante pudo ser observado durante la formación de *biofilm* en cajas multipocillo. Se comprobó que un mutante defectivo en la expresión de OmpQ muestra una reducción de la biomasa del *biofilm* a las 48 h de cultivo. Además, estudios sobre la arquitectura de los mismos mostraron para el mutante la formación de un *biofilm* sub-estructurado.

Se demostró la expresión variable del gen *ompQ* durante el desarrollo en *biofilm*, y que el momento en el que se incrementa el nivel de expresión y el requerimiento del gen *ompQ* funcional son coincidentes.

El efecto negativo de anticuerpos contra OmpQ en el *biofilm* de *B. bronchiseptica* sugiere que, en términos del control de este patógeno, esta proteína podría ser un potencial blanco contra el desarrollo sésil de la bacteria.

OmpQ posee una distribución electrostática opuesta a la de OmpP, y a su vez al estudiar más de 250 porinas con alta similitud a OmpQ hallamos que evolutivamente difieren de la misma, lo cual hablaría de una divergencia específica de la especie *Bordetella*, en cuanto a su estructura, y consecuentemente a su función, del resto de las porinas cristalizadas con función conocida.

Con certeza, son necesarios aún más estudios para elucidar el mecanismo molecular de la proteína OmpQ en la patogénesis de *Bordetella*, incluyendo la formación de *biofilm* en un modelo animal de infección, y corroborar si OmpQ cumple la misma función en *B. pertussis*, abriendo nuevas implicancias en el estudio de esta proteína.



---

#### 4.7. Referencias

1. Irie Y, Mattoo S, Yuk MH: The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol* 2004, 186(17):5692-5698.
2. Mishra M, Parise G, Jackson KD, Wozniak DJ, Deora R: The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*. *J Bacteriol* 2005, 187(4):1474-1484.
3. Serra DO, Conover MS, Arnal L, Sloan GP, Rodriguez ME, Yantorno OM, Deora R: FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One* 2011, 6(12):e28811.
4. Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Mishra M, Deora R: The *Bordetella* Bps polysaccharide is critical for biofilm development in the mouse respiratory tract. *J Bacteriol* 2007, 189(22):8270-8276.
5. Parise G, Mishra M, Itoh Y, Romeo T, Deora R: Role of a putative polysaccharide locus in *Bordetella* biofilm development. *J Bacteriol* 2007, 189(3):750-760.
6. Conover MS, Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Deora R: The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Mol Microbiol* 2010, 77(6):1439-1455.
7. Conover MS, Mishra M, Deora R: Extracellular DNA is essential for maintaining *Bordetella* biofilm integrity on abiotic surfaces and in the upper respiratory tract of mice. *PLoS One* 2011, 6(2):e16861.
8. Nicholson TL, Conover MS, Deora R: Transcriptome profiling reveals stage-specific production and requirement of flagella during biofilm development in *Bordetella bronchiseptica*. *PLoS One* 2012, 7(11):e49166.
9. Conover MS, Redfern CJ, Ganguly T, Sukumar N, Sloan G, Mishra M, Deora R: BpsR modulates *Bordetella* biofilm formation by negatively regulating the expression of the Bps polysaccharide. *J Bacteriol* 2012, 194(2):233-242.
10. Serra DO, Lucking G, Weiland F, Schulz S, Gorg A, Yantorno OM, Ehling-Schulz M: Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. *Proteomics* 2008, 8(23-24):4995-5010.
11. Arnal L, Grunert T, Cattelan N, de Gouw D, Villalba MI, Serra DO, Mooi FR, Ehling-Schulz M, Yantorno OM: *Bordetella pertussis* Isolates from Argentinean Whooping Cough Patients Display Enhanced Biofilm Formation Capacity Compared to Tohama I Reference Strain. *Front Microbiol* 2015, 6:1352.
12. Schulz GE: Porins: general to specific, native to engineered passive pores. *Curr Opin Struct Biol* 1996, 6(4):485-490.
13. Schirmer T: General and specific porins from bacterial outer membranes. *J Struct Biol* 1998, 121(2):101-109.
14. Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P: Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* 2000, 37(2):239-253.
15. Schulz GE: The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1565(2):308-317.
16. Nikaido H: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003, 67(4):593-656.

17. Armstrong SK, Parr TR, Jr., Parker CD, Hancock RE: *Bordetella pertussis* major outer membrane porin protein forms small, anion-selective channels in lipid bilayer membranes. *J Bacteriol* 1986, 166(1):212-216.
18. Armstrong SK, Parker CD: Surface proteins of *Bordetella pertussis*: comparison of virulent and avirulent strains and effects of phenotypic modulation. *Infect Immun* 1986, 54(2):308-314.
19. Finn TM, Li Z, Kocsis E: Identification of a *Bordetella pertussis* bvg-regulated porin-like protein. *J Bacteriol* 1995, 177(3):805-809.
20. Packard ER, Parton R, Coote JG, Fry NK: Sequence variation and conservation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from the UK. *J Med Microbiol* 2004, 53(Pt 5):355-365.
21. Zhu YZ, Cai CS, Zhang W, Guo HX, Zhang JP, Ji YY, Ma GY, Wu JL, Li QT, Lu CP *et al*: Immunoproteomic analysis of human serological antibody responses to vaccination with whole-cell pertussis vaccine (WCV). *PLoS One* 2010, 5(11):e13915.
22. Tefon BE, Maass S, Ozcengiz E, Becher D, Hecker M, Ozcengiz G: A comprehensive analysis of *Bordetella pertussis* surface proteome and identification of new immunogenic proteins. *Vaccine* 2011, 29(19):3583-3595.
23. Williamson YM, Moura H, Simmons K, Whitmon J, Melnick N, Rees J, Woolfitt A, Schieltz DM, Tondella ML, Ades E *et al*: A gel-free proteomic-based method for the characterization of *Bordetella pertussis* clinical isolates. *J Microbiol Methods* 2012, 90(2):119-133.
24. Gouw D, Jonge MI, Hermans PW, Wessels HJ, Zomer A, Berends A, Pratt C, Berbers GA, Mooi FR, Diavatopoulos DA: Proteomics-identified Bvg-activated autotransporters protect against *Bordetella pertussis* in a mouse model. *PLoS One* 2014, 9(8):e105011.
25. Diavatopoulos DA, Cummings CA, Schouls LM, Brinig MM, Relman DA, Mooi FR: *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. *PLoS Pathog* 2005, 1(4):e45.
26. Mattoo S, Cherry JD: Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* 2005, 18(2):326-382.
27. Preston A: *Bordetella pertussis*: the intersection of genomics and pathobiology. *CMAJ* 2005, 173(1):55-62.
28. Cotter PA, Miller JF: BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect Immun* 1994, 62(8):3381-3390.
29. de Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U, Timmis KN: Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* 1990, 172(11):6568-6572.
30. Edwards RA, Keller LH, Schifferli DM: Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression. *Gene* 1998, 207(2):149-157.
31. Figurski DH, Helinski DR: Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, 76(4):1648-1652.
32. Kovach ME, Phillips RW, Elzer PH, Roop RM, 2nd, Peterson KM: pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* 1994, 16(5):800-802.
33. Sambrook J, Russell DW: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

34. Chung CT, Niemela SL, Miller RH: One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, 86(7):2172-2175.
35. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012, 9(7):671-675.
36. Byun J, Verardo MR, Sumengen B, Lewis GP, Manjunath BS, Fisher SK: Automated tool for the detection of cell nuclei in digital microscopic images: application to retinal images. *Mol Vis* 2006, 12:949-960.
37. Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersboll BK, Molin S: Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 2000, 146 ( Pt 10):2395-2407.
38. Alvarez Hayes J, Erben E, Lamberti Y, Ayala M, Maschi F, Carbone C, Gatti B, Parisi G, Rodriguez ME: Identification of a new protective antigen of *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 2011, 29(47):8731-8739.
39. Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R: CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput Appl Biosci* 1992, 8(2):189-191.
40. Guindon S, Delsuc F, Dufayard JF, Gascuel O: Estimating maximum likelihood phylogenies with PhyML. *Methods Mol Biol* 2009, 537:113-137.
41. Soding J, Remmert M, Biegert A, Lupas AN: HHsenser: exhaustive transitive profile search using HMM-HMM comparison. *Nucleic Acids Res* 2006, 34(Web Server issue):W374-378.
42. Jaroszewski L, Rychlewski L, Li Z, Li W, Godzik A: FFAS03: a server for profile-profile sequence alignments. *Nucleic Acids Res* 2005, 33(Web Server issue):W284-288.
43. Webb B, Sali A: Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics* 2014, 47:5 6 1-5 6 32.
44. Wiederstein M, Sippl MJ: ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res* 2007, 35(Web Server issue):W407-410.
45. Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA, Baker NA: PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res* 2004, 32(Web Server issue):W665-667.
46. Liu X, Ferenci T: An analysis of multifactorial influences on the transcriptional control of *ompF* and *ompC* porin expression under nutrient limitation. *Microbiology* 2001, 147(Pt 11):2981-2989.
47. Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, Ochsner UA, Parvatiyar K, Kamani MC, Allen HL, DeKievit TR, Gardner PR, Schwab U *et al*: *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell* 2002, 3(4):593-603.
48. Finelli A, Gallant CV, Jarvi K, Burrows LL: Use of in-biofilm expression technology to identify genes involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* 2003, 185(9):2700-2710.
49. Aunkham A, Schulte A, Winterhalter M, Suginta W: Porin involvement in cephalosporin and carbapenem resistance of *Burkholderia pseudomallei*. *PLoS One* 2014, 9(5):e95918.
50. Kojima S, Nikaido H: High salt concentrations increase permeability through OmpC channels of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2014, 289(38):26464-26473.

51. Altindis E, Tefon BE, Yildirim V, Ozcengiz E, Becher D, Hecker M, Ozcengiz G: Immunoproteomic analysis of *Bordetella pertussis* and identification of new immunogenic proteins. *Vaccine* 2009, 27(4):542-548.
52. de Gouw D, Hermans PW, Bootsma HJ, Zomer A, Heuvelman K, Diavatopoulos DA, Mooi FR: Differentially expressed genes in *Bordetella pertussis* strains belonging to a lineage which recently spread globally. *PLoS One* 2014, 9(1):e84523.
53. Zeth K, Diederichs K, Welte W, Engelhardt H: Crystal structure of Omp32, the anion-selective porin from *Comamonas acidovorans*, in complex with a periplasmic peptide at 2.1 Å resolution. *Structure* 2000, 8(9):981-992.
54. Fito-Boncompte L, Chapalain A, Bouffartigues E, Chaker H, Lesouhaitier O, Gicquel G, Bazire A, Madi A, Connil N, Veron W *et al*: Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infect Immun* 2011, 79(3):1176-1186.
55. Stewart PS: Diffusion in biofilms. *J Bacteriol* 2003, 185(5):1485-1491.
56. Tashiro Y, Nomura N, Nakao R, Senpuku H, Kariyama R, Kumon H, Kosono S, Watanabe H, Nakajima T, Uchiyama H: Opr86 is essential for viability and is a potential candidate for a protective antigen against biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2008, 190(11):3969-3978.
57. Shahrooei M, Hira V, Stijlemans B, Merckx R, Hermans PW, Van Eldere J: Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by rabbit polyclonal antibodies against the SesC protein. *Infect Immun* 2009, 77(9):3670-3678.

## **Capítulo 5**

### **Discusión general**





---

## 5. 1. Discusión general

*B. bronchiseptica* y *B. pertussis* son bacterias Gram-negativas que producen infecciones respiratorias en animales y humanos. *B. pertussis* es un patógeno estrictamente humano, agente causal de la tos convulsa o pertussis. A pesar de que la implementación de la vacunación masiva en la década de 1950 disminuyó la mortalidad relacionada con pertussis, se estima que anualmente se producen alrededor de 300.000 muertes a causa de esta enfermedad [1]. La mayoría de estas muertes corresponden a infantes sin vacunar o con un esquema de vacunación incompleto. Debido al hecho de que *B. pertussis* continúa circulando en la población y causando brotes epidémicos, se ha declarado a la enfermedad como reemergente. A modo de ejemplo, en el caso particular de Estados Unidos, la incidencia de la enfermedad ha alcanzado niveles que no se observaban desde 1950 [2]. En Argentina, a pesar de la inclusión de nuevas dosis en el calendario nacional de vacunación, pertussis permanece como la segunda enfermedad inmunoprevenible de mayor incidencia [3].

La persistencia y resurgencia de pertussis en la población de países con altos niveles de vacunación ha sido atribuida a varios factores, incluyendo: i) un mayor conocimiento y alerta en la detección de la enfermedad, llevando a un mejor reporte de casos clínicos; ii) mejores herramientas de diagnóstico; iii) vacunas ineficaces; iv) disminución de la inmunidad adquirida; y v) adaptación del patógeno [4-7]. Con respecto a la disminución de la inmunidad adquirida, aún se conoce poco sobre las causas subyacentes. Definitivamente se puede incluir la calidad de las vacunas, la cual es determinada por los adyuvantes y los antígenos administrados. Se observa que, en comparación a la infección natural, la protección inducida que se produce por vacunación es de más corta duración. Así, por ejemplo, se ha reportado que luego de la quinta dosis de la vacuna acelular, el 15% de los individuos pierde su inmunidad dentro de los 5 años posteriores a la vacunación [8] y que, la probabilidad de adquirir pertussis se incrementa en un promedio cercano al 42% por año [9]. Por otro lado, hay evidencias de que las vacunas celulares inducen una protección más duradera, por lo que en la actualidad es considerado dentro de la comunidad científica de *Bordetella*, que el cambio del uso de vacunas celulares por acelulares (principalmente en países desarrollados) podría haber contribuido a agravar el problema de esta enfermedad [10, 11].

Otro factor importante que afectaría la reemergencia como así también la disminución de la inmunidad contra pertussis, es la adaptación del patógeno a la vacunación [12-14]. En este sentido, la adaptación del patógeno podría afectar la estructura o regulación de determinantes antigénicos de *B. pertussis* y por lo tanto su reconocimiento por, e interacción con, las defensas del organismo. Las primeras adaptaciones reportadas en *B. pertussis* involucraban pequeños cambios en las proteínas de superficie que inducen inmunidad protectora: PTx, Prn y Fim [6]. Luego, se hallaron cambios en la regulación génica, resultando en algunos aislados clínicos en un incremento de la producción de ciertos factores de virulencia, como PTx y proteínas involucradas en la resistencia a complemento [15, 16]. La adaptación más reciente reportada en *B. pertussis* consiste en la pérdida de la producción de Prn, un componente de la mayoría de las vacunas acelulares. Sin embargo, no se encuentra globalmente una predominancia de un cierto linaje de *B. pertussis*, más bien aparecen ciertas tendencias en cada país, lo cual también podría estar asociado a las diferentes políticas de vacunación aplicadas. De todos modos, la caracterización genética de los aislados clínicos circulantes revela que la cepa de referencia Bp Tohama I ya no es representativa de la especie *B. pertussis* [17].

El complejo panorama de pertussis, no sólo incluye la reemergencia del patógeno, sino también se debe sumar un cambio en la epidemiología de la enfermedad, reportándose en los últimos años un aumento en la incidencia de la enfermedad en adolescentes y adultos. En estos casos aparecen síntomas leves, que pueden ser mal asociados con infecciones respiratorias virales, ya que a su vez puede ausentarse la tos característica de esta enfermedad [18]. Adicionalmente, este grupo de individuos es reconocido como el principal foco de infección de infantes por medio de la transmisión de bacterias residentes principalmente en la nasofaringe [19].

A pesar de que se ha obtenido una importante información sobre el rol de diferentes factores de virulencia en la colonización del tracto respiratorio, modulación y evasión del sistema inmune y sobre el control de la expresión génica, los mecanismos mediante los cuales *B. pertussis* persiste dentro del hospedador aún no se encuentran bien caracterizados [5, 20]. Nuestro laboratorio ha propuesto la hipótesis de que la sobrevivencia y la continua persistencia de *Bordetella* se deben a la formación de *biofilms*.

---

Los *biofilms* son definidos como comunidades microbianas compuestas por estructuras multicelulares adheridas a una superficie, embebidas en una matriz extracelular [21]. Este modo de crecimiento les confiere a las bacterias rasgos asociados con virulencia, patogénesis y resistencia a condiciones de estrés del ambiente, defensas del hospedador y agentes antimicrobianos [22-24]. Aún cuando varias evidencias han sido presentadas en relación al crecimiento de *B. pertussis* en forma de *biofilms*, esta temática continúa siendo poco estudiada y presenta varios desafíos a futuro. Al hablar del crecimiento en *biofilm* de una bacteria, varios interrogantes inherentes a este tipo de crecimiento son planteados: i) la existencia de un fenotipo particularmente asociado al *biofilm*, ii) los mecanismos por los cuales se desarrollan las estructuras de microcolonias, iii) la identidad y el rol de los factores que contribuyen a este desarrollo, iv) la relación entre la formación de *biofilms*, la sobrevivencia y persistencia en humanos y/o animales.

Nuestro grupo de trabajo ha realizado importantes aportes con respecto a la capacidad de adaptación de organismos del género *Bordetella* para crecer adheridos a soportes. Se ha caracterizado el fenotipo expresado por células sésiles de *B. pertussis*, trabajando particularmente con la cepa de referencia Bp Tohama I, mediante estudios de proteómica, y caracterización química global del crecimiento adherido a superficies, demostrando que las bacterias en esta forma de crecimiento poseen un fenotipo que diverge de su contraparte planctónico [25]. Asimismo, se han identificado mecanismos de regulación involucrados en el proceso formación de *biofilm*, como BvgAS, di-c-GMP, (p)ppGpp y BpsR [26-30]. En conjunto, se ha caracterizado a FHA como la principal adhesina, involucrada en la estabilización de la interacción entre células dentro del *biofilm* y con el sustrato que actúa como soporte [31]. Por otro lado, se han estudiado los componentes de la matriz extracelular, el exopolisacárido Bps y ADNe [32-35]. Finalmente, se ha demostrado que la colonización del tejido epitelial del tracto respiratorio de ratones se condice con la presencia de microcolonias asociadas a un *biofilm* [31, 32, 35]. Sin embargo, aún resta por conocer qué otros factores contribuyen al fenotipo de *biofilm*, y más importante aún, profundizar cómo se comportan cepas clínicas de *B. pertussis* en comparación a su cepa de referencia en este contexto de crecimiento.

Las preguntas que nos hicimos al iniciar este trabajo de Tesis fueron entonces dirigidas a establecer: i) si la forma de crecimiento en *biofilm* de los aislados circulantes

resultaba similar a la que mostraba la cepa de referencia en el caso de *B. pertussis*; ii) si había diferencias en cuanto a la formación de *biofilm* cuáles eran esas diferencias y si de alguna forma esos cambios resultaban más efectivos en cuanto a la adaptación del patógeno frente a su hospedador; iii) si algún otro factor de virulencia diferente a los tradicionalmente empleados en las formulaciones de vacunas podría ser importante en la formación de *biofilm* y eventualmente podría ser parte de las nuevas formulaciones acelulares.

En experiencias previas realizadas en nuestro laboratorio, en relación a aislados circulantes, se encontró que los mismos mostraban una mayor capacidad de adherir a soportes abióticos que la cepa de referencia [36, 37]. De la colección de aislados disponible en nuestro cepario, se estudiaron ocho aislados clínicos que presentaron una incrementada capacidad de formar *biofilms* sobre perlas de polipropileno, aunque con una alta variabilidad entre cepas en los valores cuantificados de biomasa en *biofilm* [37]. En el desarrollo de esta Tesis Doctoral se planteó extender el estudio del proceso de formación de *biofilm* desplegado por aislamientos clínicos, incluyendo un mayor número de cepas, provenientes tanto de Argentina como de Estados Unidos. En este estudio, utilizando la técnica estandarizada de cultivo en *biofilm* de placas multipocillo, observamos que todas las cepas estudiadas presentan niveles de producción de *biofilm* muy superiores a los de las cepas de referencia Bp Tohama I y Bp536, con excepción del aislado GMT1.

Para la primera etapa del análisis diferencial del fenotipo expresado en *biofilm* recurrimos al uso de técnicas fisicoquímicas como la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR). Al estudiar la composición bioquímica global de los *biofilms* formados por aislados argentinos observamos que en el crecimiento asociado al *biofilm*, las cepas se diferencian de Bp Tohama I, en particular en la región espectral donde absorben grupos funcionales presentes en polisacáridos y en la región denominada mixta. Por otro lado, avanzando en estos análisis mediante la aplicación de técnicas de deconvolución de picos en la región de absorción de grupos Amidas, encontramos evidencia de que todas las cepas clínicas muestran una mayor proporción de proteínas con conformación de hoja plegada beta. Más adelante, comprobamos en concordancia con estos resultados, que tres de estos aislados, en conjunto con otros provenientes de Estados Unidos, expresan una mayor cantidad de la adhesina FHA. Posiblemente esta proteína, en particular la que permanece sobre la superficie celular, o

bien retenida dentro de la matriz extracelular estaría aportando a este aumento detectado por IR en expresión de proteínas con dicha conformación. Las proteínas de membrana presentan esta conformación de hoja plegada  $\beta$ , siendo posible que también otras proteínas asociados a la membrana de la bacteria se encuentren además en una mayor proporción [38].

Más allá de la incrementada capacidad de formar *biofilms*, encontramos una diferencia en el crecimiento en condiciones planctónicas de las cepas clínicas argentinas, con respecto al mostrado por Bp Tohama I. Esta observación, también indicaría una diferencia en la adaptación de los aislados clínicos, siendo que Bp Tohama I no representaría el comportamiento de cepas circulantes actuales. Sin embargo, es importante resaltar que dichas diferencias resultan evidentes dependiendo de la composición del medio de cultivo utilizado. Al realizar los primeros estudios se utilizó el medio SS, observándose una limitación en la cepa de referencia de utilizar el glutamato, que resulta ser la principal fuente de carbono y energía, y de alcanzar mayores niveles de biomasa. Sin embargo, las diferencias en biomasa final entre la cepa de referencia y aislados clínicos, no resultan tan evidentes al cultivar a las cepas en el medio SS suplementados con casaminoácidos o casaminoácidos y ciclodextrina. En estudios sobre la composición del líquido de lavado bronco-alveolar se ha reportado en individuos sanos que los mayores metabolitos detectados son: L-glutamato, L-leucina, metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-tirosina, L-triptofano, L-treonato, D-glucosa, alfa cetoglutarato, cis-aconitato, L-lactato, citrato, creatinina, creatina, O-acetilcarnitina, guanosina, hypoxantina, bis(2-etilhexil)ftalato, uridina, inosina, ácido palmitoleico, ácido araquidónico y ácido linoleico [39, 40]. Esta composición de nutrientes es una indicación de por qué a estas bacterias le resultaría más adecuado desarrollarse en un medio de cultivo suplementado con todos los aminoácidos frente a un medio que aporta solo glutamato y prolina.

Avanzando en el estudio sobre características asociadas a la forma de crecimiento sésil de los aislados clínicos, observamos que junto al fenotipo de mayor producción de *biofilm*, los aislados clínicos poseen una mayor capacidad de autoagregar, de producir hemaglutinación, y de adherir a células epiteliales A549. Todos estos resultados indican una diferencia en la proporción de componentes de la membrana externa, posiblemente las adhesinas FHA, Fim, Prn y el exopolisacárido Bps. En particular, se pudo posteriormente determinar que las cepas en estudio presentan

mayores niveles de FHA asociada a membrana y liberada al medio extracelular. Previamente, ha sido reportado en estudios de proteómica utilizando aislados clínicos, una mayor expresión de FHA, PTx, Prn en ciertos casos (aunque en otros no es expresada), mientras que en el caso de Fim, no se ha observado una mayor expresión de los diferentes serotipos de la proteína [41]. El hecho que se observe una mayor expresión de FHA posiblemente influye en el nivel de producción de *biofilm*, ya que esta proteína ha sido caracterizada como la principal adhesina promotora de interacciones célula-célula y célula-substrato [31]. Asimismo, por medio de estudios de PCR cuantitativa, hallamos una mayor expresión del gen *fim3* en el aislado Bp462 con respecto a Bp Tohama I, tanto en la condición de cultivo líquido como en crecimiento en *biofilm*, lo que también podría contribuir a la alta capacidad de hemaglutinación presentada por la cepa, como así a la estabilización del desarrollo sésil de la misma.

El análisis por microscopía realizado sobre cepas clínicas desde etapas tempranas de adhesión (1 h) a etapas tardías de maduración del *biofilm* (96 h) permitió monitorear el desarrollo de los *biofilms*, obteniendo parámetros cuantitativos asociados a la estructura de los mismos. En el primer paso de adhesión, observamos que las cepas clínicas adhieren en mayor número por unidad de área, y en una organización diferente que involucra la interacción entre células, produciéndose agregados. Esta observación resulta muy interesante y se puede asociar con la mayor capacidad de autoagregación de los aislados clínicos, y posiblemente con la mayor presencia de FHA en la superficie celular. En cuanto al desarrollo en *biofilm*, observamos que desde las 24 h de cultivo aparecen diferencias significativas en la cantidad de biomasa presente en el *biofilm* y en sus arquitecturas, evaluadas mediante parámetros como biomasa, alturas máxima y promedio y coeficiente de rugosidad. Dichas diferencias se mantienen a lo largo del desarrollo sésil, haciéndose máximas entre las 72 y 96 h. En general, podemos apreciar que las cepas aisladas en Argentina presentan una estructura más compacta y una altura relativamente homogénea, mientras que las cepas aisladas en Estados Unidos presentan una estructura más heterogénea, aunque en todos los casos superando al desarrollo presentado por la cepa de referencia.

Con respecto a los estudios in vivo de colonización del tracto respiratorio de ratones, decidimos trabajar con una cepa representativa de Argentina y otra de Estados Unidos, comparando los resultados con los aquellos de la cepa de referencia Bp Tohama I. La estrategia empleada en estos trabajos se ajustó a las disposiciones éticas que rigen

---

el manejo de estos animales, las cuales priorizan, entre otras exigencias, reducir el número de ratones utilizados en los ensayos. Estudiando la infección en este modelo animal, luego de 4, 10 y 25 días de infección, observamos que ambas cepas clínicas presentan una mayor tendencia en la colonización de todos los tejidos colectados, septo nasal, tráquea y pulmón. Dicha tendencia resultó significativa en ciertos casos. Teniendo en cuenta estos resultados y considerando la alta variabilidad presentada en este tipo de ensayo, asociado a que no resulta éticamente apropiado repetir dichos experimentos, concluimos que los aislados clínicos estudiados presentan una mayor capacidad de colonización del tracto respiratorio de ratones. En cuanto a tiempos tardíos de infección, 25 días, en los tres casos, la población microbiana fue eliminada, indicando que no ocurre una colonización persistente en ratones por parte de los aislados clínicos.

En la última parte del trabajo de Tesis Doctoral fueron incluidos estudios con *B. bronchiseptica*. Este organismo posee un rango de hospedador más grande que *B. pertussis* y causa enfermedades respiratorias en una gran variedad de animales. En ciertos casos, puede causar infecciones en personas inmunocomprometidas, produciéndose una transmisión zoonótica de la bacteria [42]. Diversos aspectos de la patogénesis de *B. pertussis* fueron comprendidos gracias a estudios realizados en *B. bronchiseptica*. Se conoce que *B. pertussis* evolucionó de un ancestro de *B. bronchiseptica*, por lo que posiblemente varios aspectos de la patobiología de esta bacteria podrían ser extrapolados al de *pertussis* [43]. En nuestro caso, escogimos trabajar con *B. bronchiseptica* debido a su facilidad para ser manipulada genéticamente. Una de las características más notorias de las infecciones de *B. bronchiseptica* es la colonización a largo tiempo. En el caso de animales de laboratorio, se ha observado que la infección con esta bacteria resulta en una colonización crónica y asintomática del tracto respiratorio superior [43-46].

A partir de estudios previos de proteómica desarrollados en nuestro laboratorio, observamos una sobreexpresión de las porinas OmpP y OmpQ en el fenotipo de *biofilm* [25, 37]. En este trabajo, nos propusimos analizar si estas proteínas, poco estudiadas en *Bordetella* hasta este momento, participaban de alguna forma como factores importantes para el desarrollo de *biofilms*. El planteo de este objetivo se sustentó en el hecho que las proteínas de membrana externa suelen desempeñar papeles relevantes en el desarrollo sésil, ya que en muchos casos median interacciones célula-soporte y célula-célula, y

más aún, como transportadores de sustratos que podría beneficiar al crecimiento en *biofilm*. De este modo, nos propusimos obtener cepas mutantes defectivas para ambos genes codificantes de OmpP y OmpQ. En el primer caso, no fue posible obtener una mutación para *ompP*, lo cual teniendo en cuenta que se trata de una porina de expresión constitutiva, posiblemente sea un gen esencial para la bacteria. En el caso de la mutante defectiva en OmpQ, observamos que su ausencia no repercute en el crecimiento en cultivos líquidos, ni tampoco afectó el desarrollo bacteriano bajo diversas limitaciones o condiciones de estrés. Sin embargo, llamativamente al cultivar dicho mutante en *biofilm* en sistema batch, hallamos que el desarrollo de la población sésil se ve afectado en alcanzar *biofilms* maduros, frenándose su crecimiento luego de las 24 h de incubación. En concordancia con este resultado, encontramos que el nivel de expresión de *ompQ* se incrementa en la cepa salvaje a las 48 h de cultivo en *biofilm*. Más aún, si se agregan anticuerpos específicos para OmpQ al medio de cultivo, el efecto observado es similar al de la ausencia de la proteína, es decir, menor desarrollo sésil. Este último resultado es de particular interés debido a que dichos anticuerpos interferirían con un proceso que es importante para el ciclo infeccioso de la bacteria, y que más aún, podría representar una aplicación directa del uso de esta proteína como candidato vacunal.

A efectos de avanzar en la caracterización estructural de estas porinas realizamos un análisis bioinformático de la secuencia de OmpQ en comparación a las proteínas que mostraron mayor homología de secuencia. Dicho análisis demostró una divergencia del resto de las porinas caracterizadas tanto funcional como estructuralmente. Esta divergencia se pone en evidencia al analizar el modelado de OmpQ, la cual presenta características opuestas al de OmpP y de sus proteínas más cercanas en homología de secuencia, Omp32 y PorB. En particular, OmpQ despliega un canal con carga mayoritariamente negativa, indicando posiblemente una preferencia de sustratos con carga positiva. Al tratarse de un modelo estructural de la proteína, no es posible realizar mayores inferencias en cuanto a la asociación de función y estructura. Las diferencias estructurales encontradas entre OmpQ y OmpP confirmarían características de transporte diferentes para las mismas, lo cual contribuiría a sostener que la presencia o ausencia de una (caso OmpQ) no se compensa con un cambio de expresión de la otra.

En resumen, presentamos por primera vez evidencias de la participación de OmpQ en un proceso importante para la patogénesis de una bacteria del género *Bordetella*. Nuevos estudios serán necesarios para identificar el modo de acción de esta



---

porina, revelando principalmente el tipo de transportador que constituye y su selectividad por ciertos sustratos. Asimismo, identificar si, como proteína de membrana externa, se encuentra influenciando la estabilidad de las microcolonias por medio de la interacción con otras proteínas, facilitando así el contacto célula-célula. Avances en esta dirección podrían ayudar a comprender mejor el mecanismo que da lugar a la maduración de los *biofilms* de *Bordetella*. Resulta interesante también conocer si este fenotipo mutante también es observado en *B. pertussis*, y a su vez, estudiar la capacidad de actuar como inmunógeno a ser incluido en formulaciones de vacunas contra *B. bronchiseptica* y *B. pertussis*.

En síntesis, los estudios presentados en este trabajo de Tesis Doctoral han permitido caracterizar los *biofilms* producidos por aislamientos clínicos de *B. pertussis*, investigando asimismo aspectos correspondientes a la patología de esta bacteria. Los resultados obtenidos resaltan el comportamiento diferencial de aislamientos clínicos con respecto a la cepa de referencia, otorgando nuevas evidencias de la falta de representación de *B. pertussis* por parte de cepas adaptadas al laboratorio. Más aún, hemos identificado la participación de un factor de virulencia en el proceso de desarrollo del *biofilm*, habiendo sido hasta ahora desconocida su participación en la patobiología de *Bordetella*. Los resultados obtenidos nos permiten señalar, por un lado, la necesidad de la continuación del trabajo con aislamientos clínicos, a modo de comprender mejor el mecanismo de persistencia de los mismos dentro del hospedador, y por otro lado, continuar con la caracterización de aquellos factores de virulencia involucrados en el desarrollo sésil, a fin de esclarecer aspectos básicos del proceso infeccioso y patogénesis de las bacterias del género *Bordetella*.



---

## 5.2. Referencias

1. <http://www.who.int/topics/pertussis>.
2. Winter K, Glaser C, Watt J, Harriman K: Pertussis epidemic--California, 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2014, 63(48):1129-1132.
3. Ministerio de Salud PdIN: Boletín Integrado de Vigilancia. N° 203 - SE 3:111.
4. He Q, Mertsola J: Factors contributing to pertussis resurgence. *Future Microbiol* 2008, 3(3):329-339.
5. Mooi FR: *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol* 2010, 10(1):36-49.
6. Mooi FR, Van Der Maas NA, De Melker HE: Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin. *Epidemiol Infect* 2014, 142(4):685-694.
7. de Gouw D, Diavatopoulos DA, Bootsma HJ, Hermans PW, Mooi FR: Pertussis: a matter of immune modulation. *FEMS Microbiol Rev* 2011, 35(3):441-474.
8. Lavine JS, Bjornstad ON, de Blasio BF, Storsaeter J: Short-lived immunity against pertussis, age-specific routes of transmission, and the utility of a teenage booster vaccine. *Vaccine* 2012, 30(3):544-551.
9. Klein NP, Bartlett J, Rowhani-Rahbar A, Fireman B, Baxter R: Waning protection after fifth dose of acellular pertussis vaccine in children. *N Engl J Med* 2012, 367(11):1012-1019.
10. Gustafsson L, Hessel L, Storsaeter J, Olin P: Long-term follow-up of Swedish children vaccinated with acellular pertussis vaccines at 3, 5, and 12 months of age indicates the need for a booster dose at 5 to 7 years of age. *Pediatrics* 2006, 118(3):978-984.
11. Sheridan SL, Ware RS, Grimwood K, Lambert SB: Number and order of whole cell pertussis vaccines in infancy and disease protection. *JAMA* 2012, 308(5):454-456.
12. Lavine JS, King AA, Bjornstad ON: Natural immune boosting in pertussis dynamics and the potential for long-term vaccine failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108(17):7259-7264.
13. Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, van der Heide HG, Gaastra W, Willems RJ: Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect Immun* 1998, 66(2):670-675.
14. Mooi FR, van Loo IH, King AJ: Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: a cause for its reemergence? *Emerg Infect Dis* 2001, 7(3 Suppl):526-528.
15. Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, He Q, Bart MJ, Heuvelman KJ, de Greeff SC, Diavatopoulos D, Teunis P, Nagelkerke N *et al*: *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis* 2009, 15(8):1206-1213.
16. de Gouw D, Hermans PW, Bootsma HJ, Zomer A, Heuvelman K, Diavatopoulos DA, Mooi FR: Differentially expressed genes in *Bordetella pertussis* strains belonging to a lineage which recently spread globally. *PLoS One* 2014, 9(1):e84523.
17. Caro V, Bouchez V, Guiso N: Is the Sequenced *Bordetella pertussis* strain Tohama I representative of the species? *J Clin Microbiol* 2008, 46(6):2125-2128.
18. McLaughlin JM, McGinnis JJ, Tan L, Mercatante A, Fortuna J: Estimated Human and Economic Burden of Four Major Adult Vaccine-Preventable Diseases in the United States, 2013. *J Prim Prev* 2015, 36(4):259-273.

19. Cherry JD: Adult pertussis in the pre- and post-vaccine eras: lifelong vaccine-induced immunity? *Expert Rev Vaccines* 2014, 13(9):1073-1080.
20. Hewlett EL, Burns DL, Cotter PA, Harvill ET, Merkel TJ, Quinn CP, Stibitz ES: Pertussis pathogenesis--what we know and what we don't know. *J Infect Dis* 2014, 209(7):982-985.
21. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ: Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987, 41:435-464.
22. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999, 284(5418):1318-1322.
23. Donlan RM: Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002, 8(9):881-890.
24. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P: Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004, 2(2):95-108.
25. Serra DO, Lucking G, Weiland F, Schulz S, Gorg A, Yantorno OM, Ehling-Schulz M: Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. *Proteomics* 2008, 8(23-24):4995-5010.
26. Mishra M, Parise G, Jackson KD, Wozniak DJ, Deora R: The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*. *J Bacteriol* 2005, 187(4):1474-1484.
27. Irie Y, Mattoo S, Yuk MH: The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol* 2004, 186(17):5692-5698.
28. Sisti F, Ha DG, O'Toole GA, Hozbor D, Fernandez J: Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology* 2013, 159(Pt 5):869-879.
29. Sugisaki K, Hanawa T, Yonezawa H, Osaki T, Fukutomi T, Kawakami H, Yamamoto T, Kamiya S: Role of (p)ppGpp in biofilm formation and expression of filamentous structures in *Bordetella pertussis*. *Microbiology* 2013, 159(Pt 7):1379-1389.
30. Conover MS, Redfern CJ, Ganguly T, Sukumar N, Sloan G, Mishra M, Deora R: BpsR modulates *Bordetella* biofilm formation by negatively regulating the expression of the Bps polysaccharide. *J Bacteriol* 2012, 194(2):233-242.
31. Serra DO, Conover MS, Arnal L, Sloan GP, Rodriguez ME, Yantorno OM, Deora R: FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One* 2011, 6(12):e28811.
32. Conover MS, Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Deora R: The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Mol Microbiol* 2010, 77(6):1439-1455.
33. Parise G, Mishra M, Itoh Y, Romeo T, Deora R: Role of a putative polysaccharide locus in *Bordetella* biofilm development. *J Bacteriol* 2007, 189(3):750-760.
34. Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Mishra M, Deora R: The *Bordetella* Bps polysaccharide is critical for biofilm development in the mouse respiratory tract. *J Bacteriol* 2007, 189(22):8270-8276.
35. Conover MS, Mishra M, Deora R: Extracellular DNA is essential for maintaining *Bordetella* biofilm integrity on abiotic surfaces and in the upper respiratory tract of mice. *PLoS One* 2011, 6(2):e16861.
36. Nosedá D: Tesis Doctoral: Biofilm como forma de vida de *Bordetella pertussis* en su hospedador. Diferencias fenotípicas y en la capacidad de adhesión y formación de

- biofilm entre cepas de referencia y aislados clínicos. Identificación de moléculas de Quórum Sensing. *Facultad de Ciencias Exactas* 2011.
37. Arnal L: Tesis Doctoral: Caracterización fenotípica de *Bordetella pertussis* creciendo en biofilm. Desde la proteómica al reconocimiento molecular de factores de virulencia. *Facultad de Ciencias Exactas* 2014.
  38. Schulz GE: The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1565(2):308-317.
  39. Evans CR, Karnovsky A, Kovach MA, Standiford TJ, Burant CF, Stringer KA: Untargeted LC-MS metabolomics of bronchoalveolar lavage fluid differentiates acute respiratory distress syndrome from health. *J Proteome Res* 2014, 13(2):640-649.
  40. Armstrong SK: Bacterial Metabolism in the Host Environment: Pathogen Growth and Nutrient Assimilation in the Mammalian Upper Respiratory Tract. *Microbiol Spectr* 2015, 3(3).
  41. Williamson YM, Moura H, Whitmon J, Woolfitt AR, Schieltz DM, Rees JC, Guo S, Kirkham H, Bouck D, Ades EW *et al*: A Proteomic Characterization of *Bordetella pertussis* Clinical Isolates Associated with a California State Pertussis Outbreak. *Int J Proteomics* 2015, 2015:536537.
  42. Woolfrey BF, Moody JA: Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin Microbiol Rev* 1991, 4(3):243-255.
  43. Mattoo S, Cherry JD: Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* 2005, 18(2):326-382.
  44. Akerley BJ, Cotter PA, Miller JF: Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *Bordetella*-host interaction. *Cell* 1995, 80(4):611-620.
  45. Goodnow RA: Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Rev* 1980, 44(4):722-738.
  46. Mattoo S, Miller JF, Cotter PA: Role of *Bordetella bronchiseptica* fimbriae in tracheal colonization and development of a humoral immune response. *Infect Immun* 2000, 68(4):2024-2033.