



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Farmacia y Bioquímica

**Adaptabilidad de *Staphylococcus aureus* frente a
señales microambientales. Impacto sobre la
formación de biopelícula.**

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Ciencias de la Salud.

Lic. Cristian M. Dotto

Directora: Dra. Fernanda R. Buzzola

Consejera de estudios: Dra. Marta Mollerach

**Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología
Médica (IMPam) UBA-CONICET, Facultad de Medicina, Buenos
Aires, Argentina.**



2017

Agradecimientos

A la Dra. Buzzola, por permitirme realizar mi Tesis Doctoral en su grupo de investigación, por estar abierta a escuchar ideas y a valorar los aportes individuales, por darme la oportunidad de viajar y de dar un paso más en este camino.

Al Dr. Sordelli, por permitirme trabajar en el laboratorio a su cargo y por todos sus consejos.

A mis amigos y compañeros de grupo y de instituto quienes siempre me ayudaron cuando los necesité y a quienes voy a extrañar muchísimo!

A la Dra. Centrón, Dra. Cerquetti y Dra. Catalano por darme la oportunidad de hacer docencia en el Departamento de Microbiología.

Al Dr. Tom Grunert, a la Dra. Ehling-Schulz y a todo su grupo por aceptarme y guiarme en su laboratorio, durante mi estadía en Viena.

A la Dra. Adriana Casas y a todo su grupo por su colaboración y buena predisposición.

Al Dr. Yantorno y a su grupo de investigación por su colaboración en la realización de los experimentos de microscopía confocal.

A mis amigos de la vida y mi familia por estar siempre.

A mis padres, por estar siempre, por ser un ejemplo a seguir y por darme la oportunidad de formarme y de ser lo que yo elija.

Muchas gracias a todos!!!

Publicaciones

Los resultados del presente trabajo de tesis se publicaron parciamente en:

Dotto CM, Lombarte A, Cattelan N, Barbagelata MS, Yantorno O, Ehling-Schulz M, Sordelli DO, Grunert T and Buzzola FR. The active component of aspirin, salicylic acid, promotes *Staphylococcus aureus* biofilm formation in a PIA-dependent manner. *Front. Microbiol.* 2017. 23; 8:4. doi: 10.3389/fmicb.2017.00004.

Dotto CM, Alvarez LP, Barbagelata MS, Sordelli DO and Buzzola FR. Enhancing effect of sub-inhibitory concentrations of vancomycin on biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Recent Res. Develop. Infect. Immun.*, (2013), 4:1-18. Transworld Research Network (Ed). ISBN: 978-81-7895-606-0. Artículo disponible en: (<http://ressign.com/UserArticleDetails.aspx?arid=12028#>).

VII Congreso Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas (SADEBAC) Buenos Aires, Argentina. 2012.

Dotto C, Gándara L, Alvarez L, Casas A y Buzzola F. Efecto de ciprofloxacina en concentraciones subinhibitorias sobre la biopelícula de *Staphylococcus aureus*.

XIV Congreso Internacional de Medicina Interna del Hospital de Clínicas. Buenos Aires, Argentina. 2012.

Dotto C, Gándara L., Alvarez L, Barbagelata M, Medina L., Casas A y Buzzola F. La proteína de adherencia extracelular (Eap) de *Staphylococcus aureus* no contribuye a la formación de biopelícula inducida por concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacina.

XIII Congreso Argentino de Microbiología y II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires, Argentina. 2013.

Dotto C, Lombarte-Serrat A, Riviere A, Sordelli D y Buzzola F. Formación de biopelícula en cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes y sensibles expuestas al ácido salicílico.

XV Congreso Internacional de Medicina Interna del Hospital de Clínicas. Buenos Aires, Argentina. 2014.

Dotto C, Lombarte A, Casas A y Buzzola F. Efecto del ácido salicílico sobre de la producción de la biopelícula en cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes a meticilina. Rol del ADN extracelular.

International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections - ISSSI 2014. Chicago, Illinois, Estados Unidos. 2014.

Dotto C, Grunert T, Cattelan N, Lombarte Serrat A, Yantorno O, Ehling-Schulz M, Sordelli D, Buzzola F. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* strains exposed to salicylic acid.

XI Congreso Argentino de Microbiología General (SAMIGE). Córdoba, Argentina. 2015

Dotto C, Grunert T, Cattelan N, Lombarte A, Suligoy C, Yantorno O, Sordelli D, Buzzola F. Efecto del ácido salicílico sobre la formación de biopelícula en cepas de *Staphylococcus aureus*.

XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología-XIV Congreso argentino de Microbiología. Rosario, Argentina. 2016.

Dotto C, Lombarte Serrat A, Suligoy C, Sordelli D, Buzzola F. Modulación regulatoria del ácido salicílico sobre la biopelícula de *Staphylococcus aureus*.

International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections - ISSSI 2016. Seoul, Korea. 2016.

Dotto C, Grunert T, Lombarte Serrat A, Suligoy C, Sordelli D, Buzzola F. Salicylic acid induces augmentation of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* biofilms.

Financiamiento

El presente trabajo de tesis contó con el apoyo económico de las siguientes instituciones:

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT).

Universidad de Buenos Aires (UBA).

Resumen

S. aureus coloniza asintómicamente a más del 20% de la población sana y es el agente causal de un amplio espectro de infecciones, tanto intrahospitalarias como adquiridas en la comunidad. Tal versatilidad se debe a la adaptación de *S. aureus* a vivir en un entorno dinámico donde varía la disponibilidad de nutrientes y la presencia de varias moléculas. Frente a condiciones hostiles *S. aureus* puede formar biopelículas lo que hace refractarias al tratamiento a las infecciones con estas características. La matriz extracelular que encierra a la comunidad bacteriana está constituida por el polisacárido intercelular de adhesión (PIA), proteínas de superficie y el ADN extracelular liberado por la autólisis. La formación de biopelícula por *S. aureus* está sujeta a una regulación compleja y aún no dilucidada en su totalidad. En este trabajo se propuso estudiar el efecto de señales del microambiente, como el ácido salicílico (SAL) y concentraciones subinhibitorias (C_{sub}) de vancomicina (VAN) o ciprofloxacina (CIP), sobre los principales factores y reguladores de *S. aureus* involucrados en la formación de biopelícula y su implicancia como estrategia adaptativa hacia la persistencia de la bacteria en el hospedador.

Al respecto, la disminución de la biodisponibilidad de hierro por acción del SAL contribuyó al incremento de la síntesis del exopolisacárido PIA, debido al descenso de la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y al direccionamiento del metabolismo hacia la ruta fermentativa del lactato. Asimismo, el SAL provocó la disminución transcripcional de *codY* (regulador negativo de los genes que codifican para formar el PIA) y de los genes del sistema *agr* (regulador positivo de moléculas encargadas del desensamble de la biopelícula). Por medio de estos mecanismos, el SAL indujo el aumento de la biomasa de las biopelículas formadas por cepas de *S. aureus* relacionadas a los linajes genéticos USA100 y USA300 independientemente de la sensibilidad a la meticilina. Por lo cual, si bien el SAL aumentó la biomasa de las biopelículas de *S. aureus*, evita la dispersión de las bacterias que la conforman y por ende la posible generación de nuevos focos de infección. Además, la presencia del SAL propició el aumento de la colonización de este patógeno en narinas murinas debido a la generación de un fenotipo bacteriano más adherente. Por su parte, la VAN y la CIP en bajas concentraciones afectaron la formación de biopelícula de un modo cepa-dependiente. La inducción de la biomasa de la biopelícula por acción de

Csub de ambos antibióticos, ocurrió por mecanismos que involucran principalmente el incremento de adhesinas. Al respecto, ambos antibióticos incrementaron la transcripción de *sae*, el cual regula positivamente la expresión de diversas adhesinas. Además, la VAN afectó negativamente al regulador MgrA el cual reprime la expresión de adhesinas.

S. aureus responde a la acción de éstas señales adoptando una forma de vida sésil más robusta, al adaptar el metabolismo, la expresión de factores de virulencia y la red regulatoria de forma dinámica. Dicha respuesta podría modificar el curso de las infecciones causadas por *S. aureus* y conducir a la persistencia o cronicidad.

A través de este trabajo se comprenden los mecanismos por los cuales *S. aureus* incrementa la biopelícula, aportando una pieza de conocimiento importante para ulteriores investigaciones basadas en el diseño de compuestos o estrategias que bloqueen o interfieran con el/los principal/es actor/es que participan en la formación de la biopelícula.

Índice

Agradecimientos.....	i
Publicaciones.....	ii
Financiamiento	iv
Resumen	v
Índice.....	vii
Abreviaturas.....	x
Introducción.....	1
1. <i>Staphylococcus aureus</i> . Características morfológicas, bioquímicas y genéticas.....	1
2. Interacción de <i>S. aureus</i> con el hospedador.....	1
3. Emergencia de la resistencia antibiótica.....	2
4. Factores de virulencia	2
5. Reguladores	3
6. Respuesta de <i>S. aureus</i> frente a señales del microambiente de la infección	8
7. Formación y regulación de las biopelículas.....	11
8. Respuesta de <i>S. aureus</i> a condiciones deficientes de hierro.....	14
Hipótesis de trabajo	15
Objetivos.....	17
Materiales y Métodos	18
1. Cepas bacterianas.....	18
2. Concentración inhibitoria mínima (CIM).....	18
3. Formación de biopelículas	19
4. Ensayo de MTT	20
5. Visualización de las biopelículas mediante microscopía.....	20
6. Disgregación de las biopelículas preformadas	21
7. Capacidad quelante del SAL	22
8. Cuantificación del hierro intracelular en biopelículas	22
9. Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR)	22
10. Autólisis mediada por Tritón X-100.....	23
11. Extracción de ARN de las biopelículas	23
12. Transcripción reversa seguida por PCR de tiempo real (qRT-PCR).....	23

13. Actividad promotora por fusión transcripcional a GFP	24
14. Extracción de proteínas.....	24
15. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	25
16. Identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF.....	25
17. Extracción de polisacárido capsular e inmunoprecipitación doble	26
18. Cuantificación del PIA y del PC.....	27
19. Actividad hemolítica y proteolítica.....	28
20. Actividad aconitasa	28
21. Medición del pH y liberación del hierro unido a transferrina.....	28
22. Cuantificación de glucosa, lactato y acetato	29
23. Estudio <i>in silico</i> de acoplamiento y simulación de dinámica molecular	29
24. Modelo murino de colonización nasal	30
25. Análisis estadístico.....	31
Anexo I. Oligonucleótidos utilizados para qRT-PCR.....	32
Resultados.....	34
Señal I: SAL	34
Obj. 1. Determinar el efecto de las señales sobre la capacidad de <i>S. aureus</i> para formar biopelículas	34
1.1. Efecto del SAL sobre la biodisponibilidad de hierro.....	34
1.2. Influencia del SAL sobre la formación de la biopelícula.....	35
Obj. 2. Establecer el impacto de las señales sobre los constituyentes de la matriz extracelular de las biopelículas de <i>S. aureus</i>	39
2.1. Efecto del SAL sobre la composición polisacáridica de las biopelículas	39
Obj. 3. Evaluar las consecuencias de la acción de las señales en las células bacterianas que integran la biopelícula, con principal atención en los cambios regulatorios y metabólicos	44
3.1. Impacto del SAL sobre el metabolismo central en biopelículas.....	44
3.2. Efecto del SAL sobre el regulador CodY de <i>S. aureus</i>	49
3.3. Influencia del SAL sobre el sistema regulador <i>agr</i> en biopelículas de <i>S. aureus</i>	52
3.3.1. Interacción <i>in silico</i> del SAL con el regulador AgrA.....	55
3.3.2. Modulación transcripcional de genes regulados por AgrA en las biopelículas inducidas por SAL.....	58
3.3.3. Consecuencias en la dispersión por acción del SAL sobre <i>agr</i>	60
Obj. 4. Determinar <i>in vivo</i> el efecto del SAL sobre <i>S. aureus</i>	64
4.1. Efecto del SAL sobre la colonización nasal de <i>S. aureus</i> en ratón.....	64

Señal II: VAN y CIP en concentraciones bajas	65
Obj. 1. Determinar el efecto de las señales sobre la capacidad de <i>S. aureus</i> para formar biopelículas	65
1.1. Formación de biopelículas por <i>S. aureus</i> en presencia de VAN o CIP	65
Obj. 2. Establecer el impacto de las señales sobre los constituyentes de la matriz extracelular de las biopelículas de <i>S. aureus</i>	66
2.1. Influencia de VAN y CIP sobre la composición de la matriz extracelular de biopelículas	66
Obj. 3. Evaluar las consecuencias de la acción de las señales en las células bacterianas que integran la biopelícula, con principal atención en los cambios regulatorios y metabólicos	70
3.1. Efecto de Csub de VAN y CIP sobre los reguladores Sae y MgrA	70
Discusión.....	78
Señal I: SAL	78
Señal II: VAN y CIP en concentraciones bajas	87
Adaptabilidad de <i>S. aureus</i>	91
Conclusiones.....	93
Referencias.....	96

Abreviaturas

Abs: absorbancia

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AIP: péptido autoinductor

ARN: ácido ribonucleico

BSA: albúmina sérica bovina

CIM: concentración inhibitoria mínima

ClfA: factor de unión A

ClfB: factor de unión B

Cm: cloranfenicol

Ct: número de ciclo en el cual se alcanza el “threshold”

Coa: coagulasa

DO: densidad óptica

Eap: proteína de adhesión extracelular

Efb: proteína de unión al fibrinógeno extracelular

ELISA: enzimoimmunoensayo

Em: eritromicina

Emp: proteína de unión a la matriz extracelular

FnBPA: proteína de unión a la fibronectina A

FnBPB: proteína de unión a la fibronectina B

Fur: regulador de la toma de hierro

GFP: proteína verde fluorescente

hs: horas

Hla: α -hemolisina

Hlb: β -hemolisina

KDa: Kilo Daltons

LB: medio Luria Bertani

min: minutos

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NCCLS: “National Committee for Clinical Laboratory Standards”

PBS: solución tampón salina de fosfato

PBST: solución tampón salina de fosfato con 0,05 % de Tween 20

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDB: “Protein Data Bank”

PMSF: fenilmetilsulfonilfluorado

rpm: revoluciones por minuto

qRT-PCR: transcripción inversa seguida de PCR de tiempo real

seg: segundos

SDS: duodecil sulfato sódico

SpA: proteína A

TEMED: tetrametiletilendiamina

Tet: tetraciclina

U: unidad enzimática

UFC: unidades formadoras de colonias

VG: violeta de genciana

WGA: aglutinina de germen de trigo

OG: Oregon Green[®] 488

1. *Staphylococcus aureus*. Características morfológicas, bioquímicas y genéticas.

Staphylococcus aureus es un patógeno oportunista Gram positivo con morfología de coco, cuya división celular ocurre en tres planos logrando una disposición en forma de racimo. Produce típicamente colonias de color amarillo-dorado, debido a la producción del pigmento estafiloxantina. Es considerado un microorganismo inmóvil, no esporulado, anaerobio facultativo que posee ciertas características bioquímicas que contribuyen con su identificación clínica, como la capacidad de producir las enzimas catalasa y coagulasa, de fermentar manitol y la incapacidad de producir oxidasa. En su genoma, este microorganismo posee un cromosoma de aproximadamente 2.800 pb con un bajo contenido G-C (33%) y un gran número de elementos genéticos como plásmidos, secuencias de inserción, transposones e islas de patogenicidad, que poseen genes que codifican para factores de virulencia y resistencia antibiótica ^{1 2 3}.

2. Interacción de *S. aureus* con el hospedador.

S. aureus es el agente causal de una amplia variedad de infecciones tanto en humanos como en animales. La gran versatilidad que presenta este patógeno le confiere la capacidad de producir enfermedades con diferentes grados de severidad, entre las que se encuentran endocarditis, osteomielitis, neumonía, infecciones de piel y partes blandas, mastitis, entre otras ³. En humanos, la mayoría de los niños y adultos pueden ser colonizados intermitentemente por *S. aureus*, sin manifestar síntomas. Este patógeno puede encontrarse en diversos sitios corporales como la piel, perineo, vagina, siendo la cavidad nasal el lugar de preferencia ³. Al respecto *S. aureus* coloniza la cavidad nasal de aproximadamente entre el 20 y 50% de la población ⁴. Históricamente, los portadores nasales de *S. aureus* se clasificaron en tres grupos: permanentes, intermitentes y no colonizados. Sin embargo, recientemente se determinó mediante estudios basados en los perfiles de anticuerpos anti-estafilocócicos y en la capacidad de eliminar cepas de *S. aureus* de la cavidad nasal, que los grupos intermitentes y no colonizados compartían similitudes. Esto, permitió la reclasificación en dos grupos: persistentes y otros ^{4 5}. *S. aureus* es capaz de formar biopelículas sobre el tejido nasal humano y también murino, contribuyendo a la colonización de las narinas del hospedador ^{6 7 8}.

3. Emergencia de la resistencia antibiótica.

Las infecciones graves causadas por *S. aureus* con frecuencia requieren hospitalización y enérgica terapia antimicrobiana preponderantemente porque *S. aureus* desarrolla resistencias múltiples a los antibióticos de uso habitual ^{9 10}. La aparición de penicilinas resistentes a penicilinasas condujo a la generación de la resistencia a meticilina y la consecuente aparición de cepas de *S. aureus* meticilina resistentes (SAMR) ¹¹. La resistencia a meticilina está dada por la presencia del gen *mecA*, el cual se encuentra en un elemento móvil denominado cassette cromosomal estafilocócico y codifica para una proteína de unión a penicilina (PBP2) ¹². En América Latina circula una variedad de clones epidémicos resistentes a meticilina que a menudo vienen acompañados de otras resistencias a antibióticos ¹³. Particularmente, en nuestro país se reportó una prevalencia mayor al 50% de cepas SAMR provenientes de infecciones intrahospitalarias, destacándose al clon cordobés (CBS) entre ellas ¹⁴. Más aún, se han registrado infecciones por SAMR adquiridas en la comunidad y algunos de éstos clones están circulando ahora en el ambiente hospitalario ¹⁵. Una opción terapéutica para el tratamiento de pacientes con infecciones por SAMR es la administración de vancomicina (VAN), con el inconveniente de la emergencia actual de cepas de *S. aureus* con susceptibilidad reducida (VISA) o resistentes (VRSA) a dicho antibiótico ^{16 17 18}. Cabe destacar que las cepas VISA han sido también aisladas de pacientes que no recibieron VAN como terapia antimicrobiana. En estos casos, las infecciones estuvieron asociadas con la colonización de *S. aureus* formando biopelículas o agregados adheridos a una superficie con un alto nivel de densidad bacteriana ^{17 19}. Los mismos autores reportaron que las biopelículas serían uno de los factores de riesgo de la aparición de cepas VISA. Por su parte, la ciprofloxacina (CIP) también ha sido utilizada en la terapia de ciertas infecciones causadas por *S. aureus*, especialmente contra cepas SAMR resistentes a otros antibióticos de preferencia. La aparición de cepas de *S. aureus* resistentes a CIP ha sido reportada ^{20 21}.

4. Factores de virulencia.

El gran número de factores de virulencia que posee *S. aureus* posiciona a esta bacteria como uno de los patógenos nosocomiales más exitosos. Entre ellos se encuentran factores asociados a superficie y también extracelulares que permiten la

adherencia a los tejidos del hospedador, contribuyen al daño tisular y a la evasión de los mecanismos inmunes. Entre estos factores cabe destacar:

- los componentes superficiales microbianos que reconocen moléculas adhesivas de la matriz o MSCRAMMs (sigla de las palabras en inglés microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) entre los que se encuentran las proteínas de unión a fibronectina (FnBPA y FnBPB), factores de agrupamiento (ClfA y ClfB), proteína A (SpA), SdrC y SdrD, entre otras.
- las adhesinas que son secretadas y luego pueden volver a unirse a la superficie bacteriana, conocidas como SERAMs (sigla de las palabras en inglés secretable expanded repertoire adhesive molecules), entre las que mencionamos a Emp, Coa, proteína de unión a fibrinógeno (Efb) y Eap^{22 23}.

De los factores extracelulares que produce esta bacteria, cabe mencionar:

- el polisacárido capsular (PC), encontrado en el 90 % de los aislamientos de *S. aureus* de humanos, contribuye con la evasión de las defensas del hospedador al inhibir la quimiotaxis y poseer función antifagocítica. Los serotipos 5 y 8 son los más frecuentes entre los aislamientos provenientes de humanos. El PC está constituido por unidades de *N*-acetilglucosamina, cuya síntesis se encuentra a cargo de las enzimas codificadas en el operón *cap*, que está conformado por 16 genes.
- el polisacárido intercelular de adhesión (PIA), contribuye a la adhesión célula-célula y es uno de los componentes de la matriz extracelular de las biopelículas.
- las hemolisinas (α , β y δ) responsables de la lisis de células del huésped, especialmente los glóbulos rojos.
- las proteasas extracelulares que facilitan la diseminación de la infección a otros sitios del hospedador.

5. Reguladores.

La expresión del conjunto de factores de virulencia que posee *S. aureus* se encuentra bajo el control de una compleja red regulatoria conformada por un gran número de factores transcripcionales (tales como MgrA, Fur, CodY, entre otros), sistemas regulatorios de dos componentes (como *saeRS*, *srrAB*, *arlRS*, *vraSR*, otros) y el sistema *agr* que se activa en respuesta a la densidad bacteriana^{24 25}. La

naturaleza compleja de las vías regulatorias que controlan la virulencia en *S. aureus* surge del hecho que múltiples reguladores pueden activar o reprimir un único gen blanco. Además, el encendido y apagado de los reguladores varía según la fase de crecimiento en la que la bacteria se encuentra, generando así un programa temporal durante el cual la expresión orquestada de diferentes factores de virulencia se favorece según la etapa en la que se encuentra el proceso infeccioso²⁶. Durante la fase de crecimiento exponencial, la expresión de proteínas superficiales de adhesión se encuentra favorecida, facilitando así los procesos de adherencia a los tejidos por parte de la bacteria que son fundamentales en las etapas iniciales de la infección y colonización. Al alcanzar la fase post-exponencial, la expresión de moléculas adhesivas ya no sería esencial, mientras que la expresión de toxinas (ej. hemolisinas) y enzimas (ej. proteasas) extracelulares está favorecida, contribuyendo con la invasión y diseminación bacteriana²⁶.

A continuación se describen los reguladores relevantes para este trabajo:

- **mgrA**

Es un factor transcripcional homólogo a proteínas de la familia MarR de *E. coli* y está involucrado en la resistencia antibiótica. Regula más de 300 genes en *S. aureus*, entre los cuales se encuentran los que codifican para importantes factores de virulencia, así como también genes metabólicos²⁷. MgrA estimula la expresión de los genes *cap* y *hla*, mientras que regula negativamente los genes *spa* y *norA*, siendo este último el que codifica para una bomba de eflujo involucrada en la resistencia a quinolonas como la CIP^{27 28}. Más aún, una mutante *mgrA* de *S. aureus*, generada por transposición, provocó un aumento en la concentración inhibitoria mínima (CIM) a CIP²⁹. Un resultado similar se observó para la VAN, denotando la acción de MgrA sobre la resistencia al glucopeptido²⁹. A su vez, MgrA es capaz de controlar otros reguladores globales como SarA y SarS y de esta forma afectar sus respectivos regulones^{27 30}. También, MgrA actúa redundantemente con otros sistemas regulatorios, tal es el caso de *agr*, estimulando la producción de exoproteínas y reprimiendo la expresión de proteínas de superficie²⁷.

- **codY**

El factor transcripcional CodY es una proteína altamente conservada, involucrada en la adaptación hacia la fase estacionaria en diversas bacterias Gram positivas ³¹. Este regulador global es capaz de sensar el estado metabólico de la bacteria detectando los niveles de GTP y/o aminoácidos ramificados (isoleucina, leucina y valina). De este modo, CodY modula su actividad regulatoria sobre la expresión de diversos factores de virulencia en *S. aureus*. Además, de controlar la expresión de genes del metabolismo central como *sucAB* (2-oxoglutarato deshidrogenada), *ldh1* (lactato deshidrogenada), *pyc* (piruvato carboxilasa), CodY reprime la expresión de genes involucrados en la respuesta antioxidante de la bacteria tales como *sodA* (superóxido dismutasa) y *katA* (catalasa) así como también la de reguladores globales como *agr* y de genes de virulencia como *spa*, *cap* y *fnbA* en *S. aureus* ^{31 32}. La íntima relación que guardan el estado metabólico y la producción de factores de virulencia por este patógeno, requiere de una estricta regulación. Al respecto, CodY ha sido propuesto como un regulador metabólico debido a que liga el estado nutricional con la virulencia de *S. aureus* ³².

- **fur**

En muchas especies bacterianas la respuesta a cambios en la disponibilidad de hierro es mediada por el regulador global Fur (ferrum uptake regulator) ^{33 34}. Este factor transcripcional ha sido considerado durante mucho tiempo como un represor de los genes involucrados en la captura de hierro cuando este nutriente abunda. Entre estos genes encontramos los que codifican para pequeñas moléculas llamadas sideróforos, como la aureochelina, estafiloferrina A y B y los que codifican para sistemas captadores del hemo del hospedador (Isd y Hts) ³⁵. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que Fur puede además activar la expresión de ciertos genes tanto en condiciones de concentraciones bajas de hierro como en abundancia de este nutriente esencial ^{36 37}. Cabe destacar que la disponibilidad de hierro se encuentra en íntima relación con un correcto funcionamiento del metabolismo bacteriano, debido a que actúa como cofactor de varias enzimas. Al respecto, se señaló a Fur y al hierro como represores de la expresión de proteínas involucradas en la glucólisis, y activadores de la expresión de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA), aconitasa y succinato deshidrogenada (las

cuales poseen centros Fe-S). Además, Fur activó la expresión del regulador metabólico CodY³⁸. Por otra parte, Johnson y col. (2011) establecieron que Fur es necesario para la inducción de *agr* y de la expresión de factores de virulencia regulados por éste, tales como *hla*³⁴.

- ***agr***

El sistema regulatorio global *agr* consta de dos unidades transcripcionales que se encuentran bajo el control de dos promotores divergentes²⁴. El promotor P2 controla la transcripción de los genes *agrBDCA* (generando el transcripto RNAII) cuyos productos están involucrados en la regulación del sensado poblacional o quorum sensing (Figura 1).

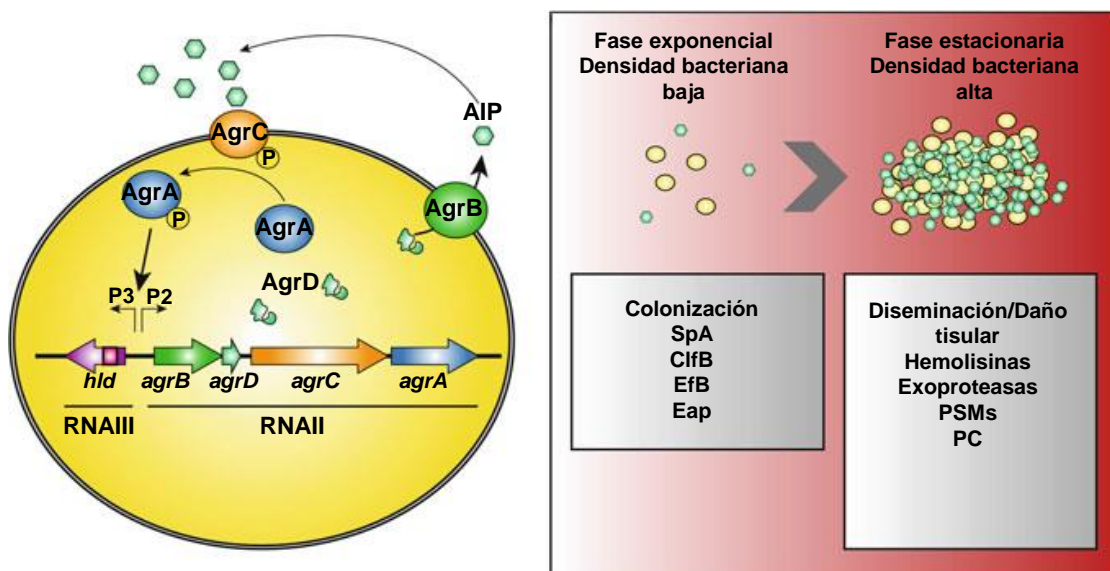


Figura 1. Esquema del locus *agr* y su regulación.

El locus *agr* posee dos promotores divergentes P3 y P2 a partir de los cuales se transcriben los genes *hld* y *agrB*, *agrD*, *agrC* y *agrA* originando los transcritos RNAIII y RNAII. Los genes *agrD* y *agrB* codifican para el precursor del péptido autoinductor (AIP) y para la proteína transmembrana AgrB, respectivamente, la cual procesa y transporta al AIP hacia el medio extracelular. AgrBDCA conforman un sistema de quorum sensing, en el que AgrC sensa la densidad poblacional mediante el AIP y se autofosforila para luego fosforilar a AgrA, la cual activa la transcripción a partir de ambos promotores (panel izquierdo). Factores de virulencia regulados por el sistema *agr*, producidos en fase exponencial involucrados en la colonización, y durante la fase estacionaria relacionados con la diseminación y el daño tisular (panel derecho). (Adaptado de Haag y col., 2016²⁵).

AgrC y AgrA son las proteínas histidín quinasa y la reguladora de respuesta, respectivamente, de un sistema de dos componentes típico. Mientras que AgrD es el precursor del péptido autoinductor (AIP) del sistema y AgrB una proteína transmembrana que procesa a AgrD convirtiéndolo en el AIP. Por otro lado, el promotor P3 controla la transcripción de una pequeña molécula de ARN llamada RNAIII que es el efector del sistema *agr* (Figura 1). Además, RNAIII contiene la secuencia codificante para la δ -hemolisina, la cual es un importante factor de virulencia de *S. aureus*. Por su parte, AgrA activa la transcripción del RNAII y RNAIII a partir de ambos promotores (P2 y P3) y también regula la expresión de las modulinas solubles en fenol (PSM)³⁹. Los residuos Cys 199 y Cys 228 de AgrA están involucrados en un proceso de óxido-reducción que sería esencial para la unión de AgrA a las secuencias consenso en el ADN. Así, AgrA en su estado reducido, se encuentra unido al ADN ejerciendo su acción regulatoria⁴⁰. Por otro lado, el efector del sistema RNAIII reprime, en fase estacionaria, la expresión de factores involucrados en la colonización como las adhesinas SpA, ClfB y activa la producción de factores dispersantes y causantes de daño como las hemolisinas y las exoproteasas²⁵.

- **sae**

El operón *sae* consta de cuatro genes *saePQRS* y dos promotores P_C y P_A⁴¹. Dentro del gen *saeQ* se encuentra el promotor P_A que dirige la transcripción de los genes *saeR* y *saeS* (transcripto A). Por otro lado, el promotor P_C se encuentra río arriba del gen *saeP* y a partir de éste se obtiene el transcripto C el cual es procesado obteniéndose los fragmentos D y B (Figura 2). El promotor P_C es el más fuerte y a diferencia de P_A no es constitutivo⁴². P_C es autoinducido por SaeRS, así la transcripción de *saeRS* se inicia primero a partir de P_A y luego de P_C. SaeR y SaeS conforman un sistema de dos componentes siendo SaeS la proteína encargada de sensar señales externas (ej. antibióticos β -lactámicos)⁴³ y activar a la proteína SaeR quien regula positivamente la expresión de varios genes involucrados tanto en la evasión inmune como en la adhesión a moléculas del hospedador. Entre ellos encontramos a *efb*, *sspA*, *fnbB*, *coa*, *hla*, *hly*, *eap*, *emp* entre otros, mientras que reprime la expresión del PC y del regulador Fur (Figura 2)²⁵. Cabe destacar que SaeS posee variantes como SaeS^P, la cual es originada por una mutación por sustitución que se manifiesta en un cambio de una Leu por una Pro en la posición

18 de la estructura primaria de la proteína. SaeS^P posee una alteración en su estructura que incrementa notablemente su actividad quinasa logrando una expresión constitutiva de *saeP* y *saeQ*, así como también la de otros genes bajo su control. SaeP y SaeQ forman un complejo ternario con SaeS que induciría su actividad fosfatasa responsable de desfosforilar a AgrA activada⁴².

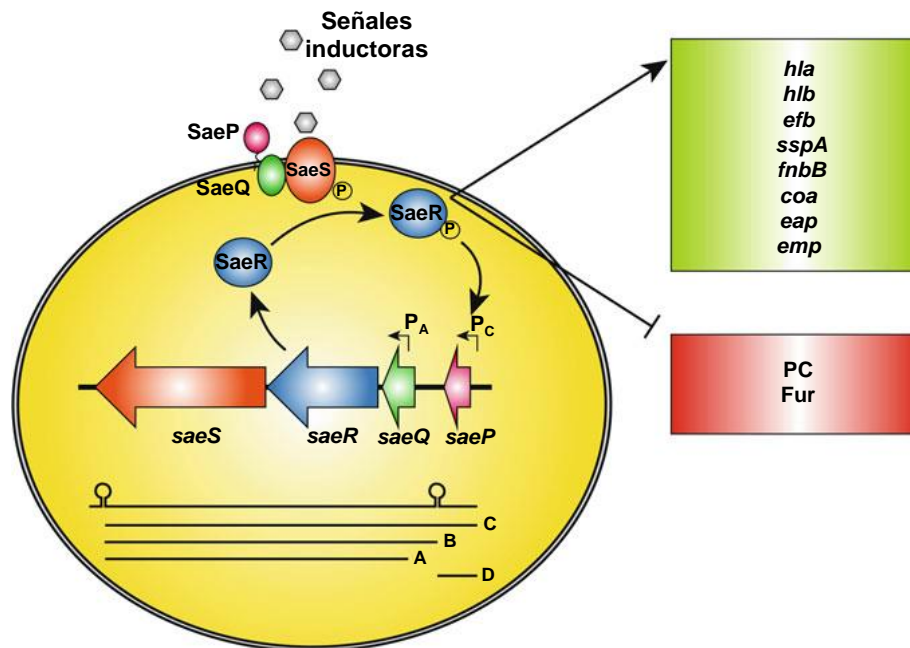


Figura 2. Esquema del locus *sae* y su regulación. El locus *sae* posee los promotores P_A y P_C, siendo el primero constitutivo y el segundo autoinducido. A partir de P_A se transcriben los genes *saeQ*, *saeR* y *saeS* originando el transcripto A, mientras que a partir de P_C se transcriben todos los genes del locus incluido *saeP* originando el transcripto C a partir del cual se obtienen los transcritos B y D. Los genes *saeR* y *saeS* codifican para la proteína reguladora de respuesta y la proteína sensora, respectivamente, del sistema de dos componentes SaeR/SaeS. Los genes *saeQ* y *saeP* son genes accesorios que codifican para la proteína de membrana SaeQ y para la lipoproteína SaeP, respectivamente, las cuales se asocian con SaeS e inducen su actividad fosfatasa. SaeS sensa señales inductoras externas y se autofosforila para luego fosforilar a SaeR, la cual se une a sus secuencias consenso en el ADN y activa la transcripción del locus *sae* a partir de P_C y regula la de diversos factores de virulencia y reguladores. (Adaptado de Haag y col., 2016²⁵).

6. Respuesta de *S. aureus* frente a señales del microambiente de la infección.

Las bacterias son capaces de sentir y responder a cambios originados en el medio en el que crecen gracias a que poseen numerosos sistemas que reconocen específicamente distintas señales. Entre las señales inherentes a las condiciones en

las que el microorganismo desarrolla su crecimiento, podemos mencionar como ejemplos los cambios en la osmolaridad, la temperatura, la disponibilidad de hierro, la densidad poblacional. Por otra parte, algunos fármacos o sus derivados constituyen en sí mismos una señal para la bacteria. Tales señales pueden estar presentes durante el proceso infeccioso promoviendo una serie de cambios regulatorios y de la expresión génica que permitirían la adaptación del patógeno en el hospedador.

Al respecto, los antibióticos en bajas concentraciones interfieren con los procesos de interacción entre el hospedador y la bacteria tales como fagocitosis, adherencia y producción de factores de virulencia ^{44 45}. Concentraciones subinhibitorias (C_{sub}) de tigeciclina modificaron la expresión de factores de virulencia de *S. aureus* formando biopelículas ⁴⁶. A continuación se detallan algunas características de las señales estudiadas en este trabajo de tesis y antecedentes de su influencia sobre la virulencia de *S. aureus*:

- **VAN**

La VAN es un antibiótico del tipo glucopéptido con efecto bactericida, que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular al impedir las etapas de transglicosilación y transpeptidación ¹⁷. Este antibiótico es frecuentemente prescrito a pacientes que padecen infecciones asociadas a dispositivos médicos implantados y endocarditis causadas por cepas SAMR.

Algunos de los efectos de este antibiótico sobre la virulencia bacteriana se han informado en los últimos años. Al respecto, la presencia de VAN incrementó la expresión de proteínas involucradas en la síntesis de pared celular y de aminoácidos esenciales requeridos para la formación del peptidoglicano en *S. aureus* ⁴⁷. Por otro lado, bajas concentraciones de VAN modularon la resistencia antibiótica mediante la producción de especies reactivas del oxígeno en *S. aureus* ⁴⁸. También, la acción de este antibiótico resultó en una activación del regulador *sigB* y un consecuente aumento en la citotoxicidad en *S. aureus* ⁴⁹. Respecto a la formación de biopelícula, C_{sub} de VAN afectaron diferencialmente su formación en cepas de *S. epidermidis* ⁵⁰ y aumentaron la autólisis bacteriana promoviendo la liberación de ADN extracelular (ADNe) y la formación de biopelícula en cepas VRSA

⁵¹.

- **CIP**

La CIP es una fluoroquinolona de amplio espectro con actividad bactericida, cuyo blanco de acción es la ADN girasa a la cual se une, inhibiendo de esta manera, la replicación del ADN bacteriano. El tratamiento con CIP es a menudo utilizado para tratar infecciones asociadas a pulmón en pacientes con fibrosis quística ⁵². Además, se utiliza como alternativa de la VAN para tratar infecciones por cepas SAMR ⁵³.

La CIP en Csub indujo la expresión de la adhesina de superficie FnBPB en *S. aureus* por un mecanismo que involucra a proteínas del sistema SOS ⁴⁵, aumentando así la adherencia de este patógeno. Por otra parte, Csub de CIP incrementaron la frecuencia de transposición de la secuencia de inserción IS256 y la inducción de profagos en *S. aureus* provocando cambios de expresión en algunos factores de virulencia ^{52 54}.

- **SAL**

La aspirina o ácido acetil salicílico es un agente antiinflamatorio del tipo no esteroideo perteneciente a la familia de los salicilatos. La Organización Mundial de la Salud ha designado a la aspirina como un medicamento esencial por su alto nivel de beneficio terapéutico en migraña, dolor y profilaxis de ataque cardíaco y accidente cardiovascular. Debido a la variedad de aplicaciones de este medicamento y a su fácil acceso, ya que se comercializa sin prescripción médica, la aspirina es consumida por millones de personas en el mundo entero ⁵⁵. Una vez ingerida, la aspirina es rápidamente convertida a SAL que es el metabolito responsable de las acciones antiinflamatorias, antipiréticas y antitrombóticas conocidas en humanos ⁵⁶. La cantidad de aspirina ingerida por una persona dependerá de la causa de su ingesta. De esta manera, la concentración de SAL alcanzada en suero puede variar entre concentraciones relativamente bajas como 0,36 mM (correspondientes a la ingesta de aspirina con fines antitrombóticos), hasta concentraciones más altas como 2 mM (correspondientes a tratamientos más severos como es el caso de pacientes reumáticos).

Además de ser el componente bioactivo de la aspirina, el SAL es producido por las plantas y actúa como una hormona involucrada en la inmunidad de los vegetales ⁵⁷. Cabe destacar que personas que consumen una dieta vegetariana estricta

alcanzaron niveles de SAL en sangre similares a aquellos detectados en individuos que ingieren aspirina en rangos terapéuticos^{58 59}.

También el SAL ejerce múltiples efectos sobre las células bacterianas. En particular, la producción de diversos factores de virulencia bacterianos es afectada en presencia de SAL⁶⁰. Al respecto, el SAL disminuyó la producción de la cápsula en *K. pneumoniae*⁶¹, así como también la virulencia de *S. aureus* al activar el regulador *sigB*⁶². Por su parte, la aspirina disminuyó la virulencia de *P. aeruginosa* al inhibir el quorum sensing y la producción de factores de virulencia tales como adhesinas, biopelícula y toxinas⁶³. Por otra parte, se ha descrito que el SAL aumentó la resistencia de *S. aureus* a fluoroquinolonas y a ácido fusídico^{60 64}. La exposición de *S. aureus* a bajas concentraciones de SAL redujo la producción de PC y aumentó la expresión de Eap bajo condiciones planctónicas^{65 66}. Por otro lado, el SAL puede formar complejos con cationes de hierro⁶⁷, el cual es un nutriente esencial para las bacterias y su disponibilidad afecta la expresión de factores de virulencia en *S. aureus*⁶⁸. Al respecto, la privación de hierro durante el crecimiento de *S. aureus*, indujo un incremento en la expresión de adhesinas involucradas en la formación de la biopelícula³⁷. Los numerosos efectos que tiene el SAL podrían actuar como un arma de doble filo, teniendo por un lado un efecto benéfico y por otro perjudicial según las circunstancias^{64 69}.

7. Formación y regulación de las biopelículas.

Una estrategia utilizada por *S. aureus* para responder a condiciones desfavorables es la formación de biopelículas. Estas estructuras complejas comprenden aglomeraciones de bacterias interrelacionadas en una red tridimensional, inmersas en una matriz extracelular secretada por las mismas bacterias que conforman la biopelícula (Figura 3). Las biopelículas juegan un rol preponderante en las infecciones asociadas a dispositivos médicos implantados y crónicas. Dicho factor de virulencia le confiere a las bacterias ciertas ventajas como la evasión del sistema inmune y la refractariedad a la terapia antibiótica.

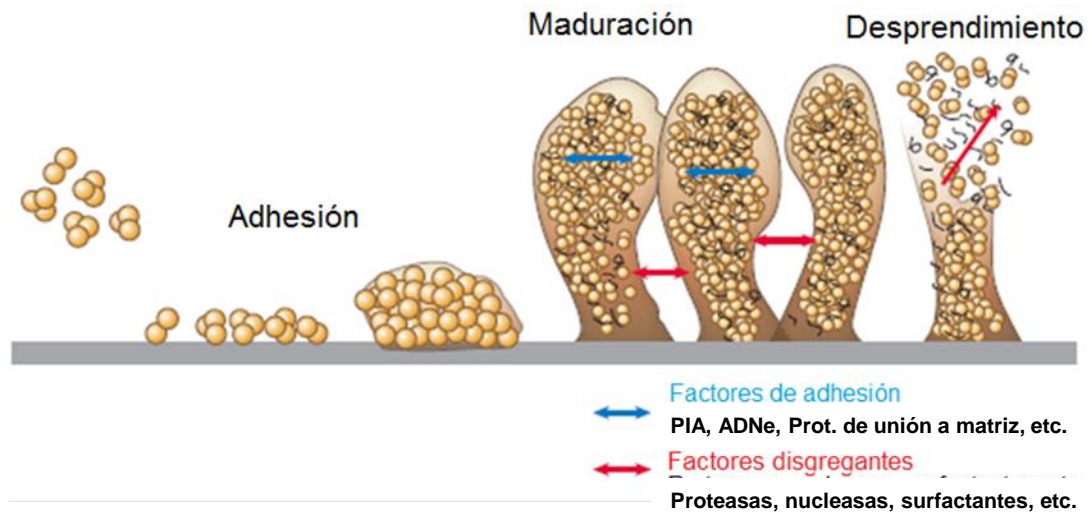


Figura 3. Mecanismo de formación de la biopelícula en *S. aureus*. El desarrollo de la biopelícula involucra una etapa inicial de adhesión a una superficie o a proteínas de la matriz del hospedador. Posteriormente, la maduración ocurre mediante la aglomeración bacteriana mediada por factores de adhesión (PIA, ADNe, adhesinas, etc.). La formación de canales en el interior de la biopelícula así como la liberación de algunas bacterias de la biopelícula en la etapa de desprendimiento, es facilitada por factores disgregantes (proteasas, nucleasas, surfactantes, etc.). (Adaptado de Otto y col., 2013¹²³).

La formación de biopelícula en *S. aureus* se inicia con una etapa de adhesión de algunas células bacterianas a una superficie, la cual es mediada por propiedades físico-químicas de la superficie celular y por factores específicos que median la adherencia a los componentes de la matriz extracelular derivada del hospedador (fibronectina, fibrinógeno, entre otros) que rápidamente cubren la superficie del biomaterial implantado o del tejido⁷⁰. Posteriormente, las bacterias se agrupan en multicapas embebidas en una matriz extracelular que ellas mismas producen. En esta etapa de maduración de la biopelícula, la mayoría de las bacterias no tienen contacto directo con la superficie por lo que las interacciones entre células llegan a ser esenciales para el desarrollo y mantenimiento de la biopelícula. Las bacterias dentro de la biopelícula despliegan niveles variables de actividad metabólica debido a la difusión heterogénea de agua y nutrientes. La matriz extracelular que encierra a la comunidad bacteriana está constituida por el PIA o poli-*N*-acetilglucosamina (PNAG), producido por las enzimas codificadas por el operon *icaADBC*⁷¹ (Figura 4). Alternativamente, un número de proteínas de superficie como Bap, SasG, Eap, FnBPs, entre otras, pueden reemplazar al PIA contribuyendo a la adhesión intercelular⁷². Además, el ADNe producto de la lisis bacteriana, aunque no sería suficiente para reemplazar al PIA, sería un importante componente de la matriz

extracelular de la biopelícula ⁷³. De esta manera, se diferencian dos mecanismos de formación de biopelícula, uno dependiente de PIA, cuando éste componente es mayoritario, y otro independiente de dicho polisacárido que involucra proteínas y ADNe. Por cierto, en los últimos años se vinculó la sensibilidad a meticilina con el mecanismo de formación de la biopelícula, sugiriendo que en cepas SAMR podría ser PIA-independiente e involucraría adhesina/s. Por el contrario, la biopelícula constituida por PIA jugaría un rol más importante en el desarrollo de la biopelícula por cepas de *S. aureus* meticilina sensibles (SAMS) ⁷⁴. Finalmente, factores disgregantes tales como proteasas, ADNasas y surfactantes promueven la liberación de algunas bacterias de la biopelícula. Esta etapa de desprendimiento contribuye con la dispersión bacteriana a nuevos sitios de infección, en donde comenzaría la formación de una nueva biopelícula.

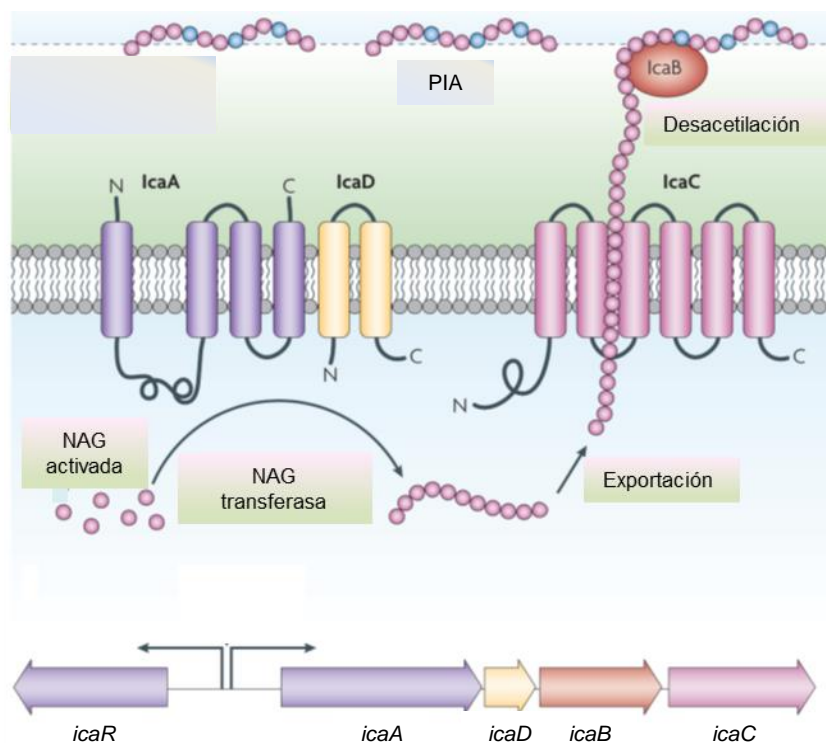


Figura 4. Esquema del locus *ica* y síntesis del PIA. El locus *ica* está formado por el operón *icaADBC* y el gen *icaR*. El homopolímero parcialmente desacetilado de *N*-acetilglucosamina (NAG) es sintetizado por la NAG transferasa localizada en la membrana (IcaA) con cooperación de la proteína accesoria de membrana (IcaD). La cadena creciente de PIA es exportada por la proteína de membrana IcaC. Luego, la desacetilasa IcaB localizada en la superficie, remueve algunos de los grupos *N*-acetilos confiriéndole al polímero un carácter catiónico esencial para la adhesión superficial. El gen *icaR* codifica para un regulador negativo del operón *icaADBC*. (Adaptado de Otto y col., 2009 ¹⁷⁶).

La formación de biopelícula por *S. aureus* está sujeta a una regulación compleja, cuyos mecanismos no han sido dilucidados aún en su totalidad. El mecanismo mejor entendido de desarrollo de biopelícula es el mediado por el operon *icaADBC* cuya expresión es, en parte, regulada por IcaR ya que reprime la expresión de *icaA* en fase exponencial temprana ⁷⁵. Por su parte, los reguladores globales SarA y SigB controlan la transcripción del locus *ica* en forma positiva ^{76 77}. Majerczyk y col. (2008) demostraron que mutantes *codY* de dos cepas de *S. aureus* aisladas del ambiente hospitalario presentaron una alta capacidad formadora de biopelícula, como resultado del aumento en la transcripción del gen *icaA* y del consecuente aumento en la producción del PIA ⁷⁸. Por otra parte, Trottonda y col. (2008) demostraron que MgrA reprime la formación de biopelícula *ica*-independiente en *S. aureus*, regulando negativamente la expresión de adhesinas de superficie y la liberación de ADNe proveniente de la autólisis bacteriana ⁷⁹. Por otro lado, la delección del gen *codY* en un aislamiento clínico de *S. aureus* alto formador de biopelícula resultó en baja producción de PIA, así como también de biopelícula formada ⁸⁰. Por cierto, la delección del gen *codY* en la cepa de *S. aureus* USA300 resultó en una incrementada producción de proteasas extracelulares que afectaron negativamente la formación de biopelícula ⁸¹. Por su parte, se ha involucrado al sistema *agr* en la etapa de dispersión de las biopelículas de *S. aureus* al controlar positivamente la expresión de factores disgregantes (surfactantes como las PSMs y la δ -hemolisina, proteasas, entre otros) de la matriz extracelular de las mismas ⁸². También, se ha relacionado al regulador *sae* con la formación de biopelículas dependiente de proteínas en *S. aureus* ⁸³.

8. Respuesta de *S. aureus* a condiciones deficientes de hierro.

El hierro es un nutriente esencial para el crecimiento bacteriano y es crucial para la producción de energía, síntesis de nucleótidos y regulación de la expresión de genes ⁸⁴. Sin embargo, la disponibilidad de hierro (Fe^{2+}) en el hospedador está limitada ya que al ser insoluble en agua forma complejos con proteínas que lo unen y movilizan (transferrina, hemoglobina, ferritina, lactoferrina). Por lo tanto, la bacteria debe competir con el hospedador para adquirirlo. Al respecto, *S. aureus* posee múltiples sistemas para transportar y extraer el hierro tanto del hemo como de las proteínas ligadoras del hospedador ⁶⁸. Esto demuestra la importancia del hierro para la supervivencia de este patógeno. Las bacterias sésiles responden a un rango de

concentración de hierro más estrecho que las bacterias planctónicas ⁸⁵. Para diferentes especies del género *Staphylococcus* se reportaron resultados contradictorios sobre la participación de hierro y la producción de biopelícula. Al respecto, la formación de biopelícula por *S. epidermidis* se observó estimulada cuando se utilizó un ionótrofo de catecolamina para extraer el hierro de las proteínas ligadoras plasmáticas ⁸⁶. Johnson y col. (2008) demostraron que en condiciones deficientes de hierro, *S. aureus* requirió la presencia de *ica* y de las adhesinas Eap y Emp para formar la biopelícula ³⁷. En condiciones de déficit de hierro, *S. aureus* desreprime los genes de los sistemas de captura de hierro, glucólisis y virulencia mediante la proteína de unión Fur ^{38 87}. Por lo tanto, la falta de hierro gatilla en *S. aureus* un cambio metabólico. Específicamente, en estas condiciones, la bacteria reduce la abundancia de varias enzimas del ciclo TCA y simultáneamente incrementa la cantidad de enzimas de la vía glucolítica. Esta activación de la glucólisis resulta en la producción de piruvato, el cual es luego utilizado como sustrato del metabolismo fermentativo debido a la baja actividad del ciclo TCA. Por lo tanto, esta redirección metabólica resulta en la acumulación del producto final fermentativo lactato, el cual disminuye el pH circundante e incrementa los niveles locales de hierro libre ⁶⁸. Cabe mencionar que las enzimas clave del ciclo TCA, aconitasa y succinato deshidrogenasa, poseen grupos prostéticos del tipo centro hierro-azufre en su estructura funcional, indicando la importancia de la disponibilidad de hierro para un óptimo funcionamiento del ciclo TCA. En *S. aureus*, la actividad del ciclo TCA es crítica para la elaboración del PC ⁸⁸. Por otro lado, cambios metabólicos afectaron la síntesis del PIA en *S. epidermidis*. Durante la fase exponencial del crecimiento bacteriano, cuando el ciclo TCA está reprimido, se produce la síntesis del PIA ⁸⁹.

Hipótesis de trabajo.

S. aureus fácilmente se adapta a diversos nichos del hospedador lo que se manifiesta en el amplio rango de infecciones que causa. Un coordinado y complejo mecanismo regulatorio que controla la expresión de sus factores de virulencia, es puesto en marcha, a fin de modificar su fenotipo en respuesta a las diferentes condiciones ambientales con las que se enfrenta durante el proceso infeccioso. Algunos antibióticos y el SAL afectarían a los sistemas regulatorios de este

patógeno^{45 49 60}. Sin embargo, no es bien entendido que señales del hospedador son detectadas por *S. aureus* durante la infección y como coordina la expresión de sus genes, a fin de expresar aquellos factores de virulencia que favorecen procesos adaptativos, como la formación de biopelícula, en respuesta a nuevas condiciones del ambiente que lo rodea. La hipótesis de este trabajo es que *S. aureus* en determinadas condiciones microambientales, como la presencia de fármacos, alteraría la expresión de los sistemas que integran la red regulatoria implicada en la formación de biopelículas, modificando así la composición de sus matrices extracelulares y favoreciendo esta estrategia adaptativa que posibilitaría la cronicidad y persistencia de la bacteria en el hospedador.

Objetivo general

S. aureus puede encontrarse colonizando asintóticamente en individuos sanos, como también ser responsable de diversas enfermedades con un amplio rango de severidad. Tal versatilidad se debe a la adaptación de *S. aureus* a vivir en un microambiente dinámico donde varía la disponibilidad de nutrientes y la presencia de varias moléculas. Diversos fármacos con los que *S. aureus* puede enfrentarse durante el proceso infeccioso actuarían como una señal de estrés presente en el entorno que circunda a la bacteria. La habilidad de *S. aureus* para detectar los diferentes cambios del microambiente y responder de manera rápida y proporcional a las señales del entorno se debe al delicado control regulatorio de la expresión génica que modifica la producción de sus factores de virulencia. Una estrategia utilizada por *S. aureus* para responder a las condiciones desfavorables es la formación de biopelículas. Por lo cual, el objetivo general de este trabajo de investigación fue estudiar el efecto de diversas señales del microambiente de la infección, como el SAL (señal I) y los antibióticos VAN y CIP en bajas concentraciones (señal II), sobre los principales factores y reguladores de *S. aureus* involucrados en la formación de biopelícula y su implicancia como estrategia adaptativa hacia la persistencia y cronicidad de la bacteria en el hospedador.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de las señales sobre la capacidad de *S. aureus* para formar biopelículas.
2. Establecer el impacto de las señales sobre los constituyentes de la matriz extracelular de las biopelículas de *S. aureus*.
3. Evaluar las consecuencias de la acción de las señales en las células bacterianas que integran la biopelícula, con principal atención en los cambios regulatorios y metabólicos.
4. Determinar *in vivo* el efecto del SAL sobre *S. aureus*.

1. Cepas bacterianas.

Las cepas de *S. aureus* y plásmidos usados en este trabajo se detallan en las Tablas 1 y 2. Todas las cepas bacterianas se conservaron a -80°C en caldo tripteína de soja (TSB) (Britania) con 20% de glicerol. Las bacterias se cultivaron a 37°C en diversos medios de cultivo según los requerimientos experimentales: agar tripteína de soja (TSA) (Britania), TSB suplementado con 0,25 % de glucosa (TSBg) y TSBg tratado con 3% de Chelex-100 (BioRad) (CTSBg). Los cultivos planctónicos se crecieron a 200 rpm durante 18 hs a 37°C y cuando se requirió se registró el crecimiento bacteriano espectrofotométricamente midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm a los tiempos indicados. Cuando fue necesario se adicionó al medio de cultivo Csub de VAN o CIP, SAL (0,36 ó 2 mM) y/o 50 μM de FeSO_4 (expresado en lo sucesivo como Fe^{2+}). Las cepas mutantes o cepas con plásmidos se cultivaron en medio de cultivo suplementado con el antibiótico de selección correspondiente. Todos los reactivos se adquirieron en Sigma-Aldrich salvo indicación.

2. Concentración inhibitoria mínima (CIM).

La determinación de la CIM de los antibióticos VAN y CIP para las cepas de *S. aureus* en estudio se realizó mediante el método de microdilución siguiendo los lineamientos del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). El rango de concentraciones evaluadas fue de 0,5 - 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para CIP y de 0,25 - 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para VAN. Para ello, 100 μl de una dilución en caldo (5×10^5 UFC/ml) de la suspensión bacteriana (ajustada en solución fisiológica a una turbidez 0,5 de la escala McFarland) se agregaron a los pocillos que contenían 100 μl de las diluciones seriadas de cada antibiótico en TSBg. Las microplacas se incubaron por 18 hs a 37°C . Para el registro del desarrollo bacteriano (DO a 595 nm) se utilizó un lector de microplacas (Multiskan EX). Para determinar el punto final de desarrollo, se comparó el valor de DO de cada pocillo con aquel del pocillo control de crecimiento (sin antibiótico). El ensayo se consideró válido si en el pocillo control de crecimiento se observó turbidez neta. La primera dilución en la que no se detectó crecimiento bacteriano se consideró como la CIM de ese antibiótico para la cepa ensayada.

Tabla 1. Cepas y plásmidos de *S. aureus*.

Cepas	Características relevantes	Fuente
JL278	Cepa Reynolds (PC5+)	90
JL801	Reynolds (Δcap); no expresa PC5	90
SA113	Cepa SAMS, alta productora de PIA	91
CBS	Cepa SAMR representativa del clon cordobés	92
BRZ	Cepa SAMR representativa del clon brasilero	92
Mu50	Cepa VISA representativa	93
Newman	Cepa ATCC 25904; (PC5+)	94
Newman <i>eap</i>	Newman <i>eap::ermB</i>	95
Newman <i>codY</i>	Newman <i>codY::ermC</i>	96
Newman <i>ica</i>	Newman <i>ica::tet</i>	97
Newman <i>agr</i>	Newman <i>agr::tet</i>	*
Newman <i>sae</i>	Newman $\Delta saeQPRS$	98
Newman <i>mgrA</i>	Newman <i>mgrA::ermC</i>	30
Newman _{P3agr}	Newman con pALC1743	99
Newman _{Psae}	Newman con pALC4991	98
Newman _{Pcap}	Newman con pALC1766	100
Newman _{Pspa}	Newman con pALC1741	*
Newman _{Pnulo}	Newman con pALC1484	101
Plásmidos	Características relevantes	Fuente
pALC1484	Derivado de pSK236 que contiene el gen reportero <i>gfp_{uvr}</i> (proteína verde fluorescente) sin promotor precedido por un sitio de unión al ribosoma de <i>S. aureus</i> , Cm ^R	101
pALC4991	Derivado de pALC1484 con promotor P _c de <i>sae</i> fusionado al gen <i>gfp_{uvr}</i>	98
pALC1741	Derivado de pALC1484 con promotor de <i>spa</i> fusionado al gen <i>gfp_{uvr}</i>	*
pALC1743	Derivado de pALC1484 con promotor P3 de <i>agr</i> fusionado al gen <i>gfp_{uvr}</i>	102
pALC1766	Derivado de pALC1484 con promotor de <i>cap5</i> fusionado al gen <i>gfp_{uvr}</i>	100

* Cepas provistas por nuestro colaborador Dr. Ambrose Cheung.

3. Formación de biopelículas.

Se colocaron 200 μ l/pocillo de la dilución 1:100 de los cultivos de *S. aureus* crecidos en TSBg durante 18 hs a 37°C en microplacas de poliestireno (Greiner Bio-

One). Cuando se requirió formar las biopelículas sobre un área mayor (extracción de ARN y proteínas) se utilizaron botellas de poliestireno de 75 cm² (Nunc™) que se inocularon con 30 ml de la dilución 1:100 del cultivo crecido previamente durante 18 hs. Cuando fue necesario se agregó SAL, SAL+Fe²⁺, o Csub de VAN o CIP en las concentraciones indicadas en cada experimento. Luego de 6, 24 o 48 hs de incubación estática a 37°C se procedió a cuantificar la biomasa, a extraer ARN o proteínas según el requerimiento experimental.

Previo a la cuantificación de la biomasa de la biopelícula se determinó el crecimiento bacteriano en cada pocillo espectrofotométricamente por medición de la DO a 595 nm (DO_C) usando un lector de microplacas. Luego se realizaron 2 lavados de los pocillos con PBS, se fijaron las biopelículas con metanol 100% durante 15 min y se tiñeron con violeta de genciana (VG) 0,5% durante 20 min. Tras eliminar el excedente de colorante, las biopelículas se suspendieron en ácido acético 30%. La biomasa de las biopelículas se cuantificó espectrofotométricamente midiendo la DO a 595 nm (DO_B) correspondiente al VG. Los niveles de VG (DO_B) se relativizaron a los correspondientes valores de crecimiento bacteriano (DO_C).

4. Ensayo de MTT.

La determinación de bacterias metabólicamente activas en las biopelículas maduras formadas en presencia o ausencia de SAL o SAL+Fe²⁺ se llevó a cabo mediante el método colorimétrico basado en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) acorde a Grare y col. (2008)¹⁰³. Tras adicionar 1 mg/ml de MTT a cada pocillo e incubar la microplaca durante 1 h a 37°C, se eliminaron los sobrenadantes, se lavaron con PBS, se secaron y se agregó DMSO. Posteriormente, se midió espectrofotométricamente la absorbancia a 570 nm (Abs₅₇₀) correspondiente al formazán.

5. Visualización de las biopelículas mediante microscopía.

Se formaron biopelículas maduras de *S. aureus* a partir de una alícuota de cultivos (DO₆₀₀=0,05) vertida sobre cubreobjetos circulares contenidos en placas de 24 pocillos (microscopía electrónica de barrido, SEM) o en cámaras de 8 pocillos montada sobre un portaobjeto (ThermoFisher Scientific) (microscopía de escaneo láser confocal, CLSM). Luego de la incubación estática a 37°C durante 24 hs, las biopelículas se procesaron como se describe a continuación.

Para SEM, las biopelículas se lavaron con PBS, se fijaron con formaldehído 2,5% a 4°C durante 2 hs y luego, se deshidrataron mediante incubaciones de 5 min en etanol en concentraciones crecientes. Posteriormente, los cubreobjetos en donde se formaron las biopelículas se montaron sobre soportes de aluminio, se cubrieron con una capa metálica de oro-paladio y se examinaron en un microscopio de escaneo láser Philips XL30 TMP.

Para CLSM, las biopelículas se lavaron con PBS, se tiñeron con los fluoróforos SYTO9 e ioduro de propidio del equipo comercial LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability (Molecular Probes) según las concentraciones recomendadas por el proveedor para determinar viabilidad bacteriana. Con éstos colorantes, las bacterias con la membrana intacta muestran fluorescencia verde mientras que bacterias con la membrana dañada exhiben fluorescencia roja. Para visualizar el PIA, las biopelículas se tiñeron con la aglutinina de germen de trigo (WGA) conjugada al colorante Oregon Green[®] 488 (OG) 90 µg/ml y el fluoróforo lipofílico FM4-64 5 µg/ml (MolecularProbes). En ambos casos, luego de una incubación de 15 min en la oscuridad, las biopelículas se fijaron con paraformaldehído 4%. Tras agregar PBS, las biopelículas se visualizaron con un microscopio de escaneo láser confocal Leica, modelo TCSSP5. Los fluoróforos SYTO9 e ioduro de propidio se excitaron a 498–565 nm y su emisión se monitoreó a 600–693 nm. Por otra parte, los fluoróforos OG y FM4-64 se excitaron a 508–549 nm y su emisión se monitoreó a 650–750 nm. En todos los casos, se recolectaron secciones de las biopelículas enteras cada 0,7 µm y las imágenes se analizaron con el programa Leica LAS AF Lite. Los parámetros de biomasa y espesor máximo se determinaron usando el programa Comstat2.

6. Disgregación de las biopelículas preformadas.

Las biopelículas formadas durante 24 hs en presencia o ausencia de las señales (SAL, VAN o CIP) se lavaron con PBS y posteriormente se incubaron a 37°C durante 2 hs con 100 µg/ml de proteinasa K (Genbiotech) (afecta al componente proteico); 140 U/ml de ADNasa I (Promega) en Tris buffer 20 mM (pH 7,5) (afecta al componente ADN); 20 µg/ml de Dispersina B (KaneBiotech) en PBS; o 20 mM de metaperiodato de sodio (NaIO₄) en acetato de sodio 50 mM (afectan al componente polisacárido). Luego del tratamiento, las biopelículas se fijaron, tiñeron y cuantificaron espectrofotométricamente.

7. Capacidad quelante del SAL.

El ensayo de ferrozina se llevó a cabo para determinar la capacidad quelante del SAL ¹⁰⁴. Para ello, 100 μ l de TSBg se incubó con 50 μ M de FeSO₄ y distintas concentraciones de SAL durante 5 min. Para evitar la oxidación del hierro, se agregó NH₂OH 1,25 mM a la mezcla. Luego, se adicionó ferrozina 1,25 mM (o H₂O_d para los blancos). La formación del complejo hierro-ferrozina se determinó midiendo la Abs a 540 nm (Abs₅₄₀).

8. Cuantificación del hierro intracelular en biopelículas.

Alícuotas de los lisados bacterianos obtenidos luego de incubar las biopelículas maduras con solución de lisis (100 μ l de Tris-EDTA 10:1, 40 μ l de lisostafina 1 mg/ml, 20 μ l de lisozima 50 mg/ml) se trataron con una solución de HCl/KMnO₄ (volúmenes iguales de HCl 1,4M y KMnO₄ 4,5 % p/v en H₂O_d) para promover la liberación del hierro unido a las proteínas bacterianas. La cantidad de hierro se determinó mediante el ensayo de la ferrozina. El contenido de hierro libre se normalizó a la concentración (μ g/ml) de proteínas de cada muestra determinada por el método de Bradford ¹⁰⁵.

9. Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR).

Las bacterias de las biopelículas formadas durante 24 hs sobre una gran área de superficie o de cultivos planctónicos crecidos hasta DO₆₀₀=1 se recuperaron mediante un paso de centrifugación a 10.000 x g durante 10 min. En ambos casos, las bacterias se suspendieron en H₂O desionizada y 30 μ l de las suspensiones bacterianas se depositaron sobre una placa óptica de ZnSe. Luego de secar las muestras durante 40 min a 40°C para obtener finas películas transparentes, las mismas se usaron directamente para su estudio mediante espectroscopía FTIR. Para ello se utilizó un adaptador de placa HTS-XT acoplado a un espectrómetro FTIR Tensor 27 (Bruker Optics GmbH). Los espectros infrarrojos se grabaron en el modo transmisión en el rango espectral entre 4.000 y 500 cm⁻¹. Se seleccionaron las segundas derivadas de los espectros normalizados de la ventana espectral entre 1.200 y 800 cm⁻¹ para el análisis de componentes principales utilizando el programa Unscrambler X (CAMO Software). Esta región espectral es dominada por las vibraciones de extensión C-O-C y C-O-P de distintos oligosacáridos y polisacáridos

y sus respectivos tipos de uniones glucosídicas. Esta región reconoce cambios en la composición de glucopolímeros superficiales de *S.aureus* incluyendo al PC^{106 107}.

10. Autólisis mediada por Tritón X-100.

Se crecieron cultivos de *S. aureus* en TSBg a 37°C y 200 rpm hasta fase exponencial en presencia o ausencia de la señal bajo estudio. Las células bacterianas se recuperaron por centrifugación a 10.000 x g y 4°C durante 10 min y se lavaron con H₂O_d estéril. Luego, se suspendieron en la solución de lisis formada por Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 y Tritón X-100 0,05% y se incubaron a 30°C y 200 rpm. La lisis bacteriana se determinó espectrofotométricamente midiendo la DO₆₀₀ de las suspensiones cada 15 min durante 3-5 hs. La capacidad autolítica se expresó como la relación $(DO_0 - DO_t)/DO_0$, donde DO₀ corresponde a la densidad inicial y DO_t refiere a la densidad registrada a un tiempo particular.

11. Extracción de ARN de las biopelículas.

Se removió el medio de las biopelículas formadas durante 6 hs (inmaduras) o 24 hs (maduras) sobre una gran área de superficie. Luego del lavado de las biopelículas con PBS, éstas se removieron con un raspador estéril y se transfirieron a un tubo Eppendorff conteniendo 1 ml de PBS. Luego de recuperar las células bacterianas mediante centrifugación a 10.000 x g durante 10 min, las mismas se lisaron al agregar 100 µl de la solución de lisis [Tris-EDTA 10:1 (Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM), 40 µl de lisostafina 1 mg/ml y 20 µl de lisozima 50 mg/ml] e incubación a 37°C durante 20 min. Posteriormente, se agregó a los lisados el reactivo Trizol[®] (Invitrogen Life Technologies) y el ARN bacteriano se extrajo por el método del tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo siguiendo las instrucciones del fabricante. El ácido nucleico extraído se trató con ADNasa RQ1 libre de ARNasas (Promega). La cuantificación del ARN extraído se realizó espectrofotométricamente mediante lectura de la Abs a 260 nm.

12. Transcripción reversa seguida por PCR de tiempo real (qRT-PCR).

La síntesis de ADNc se llevó a cabo con la enzima transcriptasa reversa ImProm-II[™] (Promega) usando cebadores al azar. Para la PCR de tiempo real se utilizó el equipo Applied Biosystems 7500, los reactivos de la mezcla HOT FIREPol EvaGreen[®] qPCR Mix Plus (ROX) (Solis Biodyne) y los pares de cebadores

específicos detallados en el Anexo I. Las condiciones de ciclado fueron: 50°C por 2 min, 95°C por 15 min seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 seg, 50-55°C (según la temperatura de hibridación de los cebadores usados) por 30 seg y 72°C por 45 seg; seguido de una etapa de disociación (95°C por 15 seg, 60°C por 1 min, 95°C por 30 seg y 60°C por 15 seg). El análisis de los datos se realizó con el programa 7500 system SDS software (Applied Biosystems). La cuantificación relativa de los transcritos se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando el gen *gyrB* como normalizador¹⁰⁸. El valor $-\Delta\Delta Ct$ representa la diferencia del ciclo umbral (Ct) entre el gen de interés y *gyrB* tratados, menos la diferencia de Ct entre el gen de interés y *gyrB* en medio TSBg no tratado con la señal. $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$ representa una expresión incrementada y $2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$ indica la expresión disminuida.

13. Actividad promotora por fusión transcripcional a GFP.

Cuando se estudió la actividad promotora en biopelículas, se sembraron 100 μ l/pocillo de diluciones ($DO_{600}=0,05$) de cultivos de *S. aureus* en microplacas y se incubaron estáticamente a 37°C durante 24 hs. Tras medir el crecimiento a DO_{595} se detectó la fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP) (F) ($\lambda_{exc}= 485$ nm, $\lambda_{em}= 516$ nm) por medio de un fluorómetro (FLx800 BioTek). Los cultivos planctónicos ajustados a DO_{600} de 0,05 se crecieron a 37°C y 200 rpm para medir la actividad promotora por F cada 2 hs luego de registrar la DO_{595} . Los niveles de actividad de los promotores se expresaron relativos al crecimiento bacteriano (F/ DO) para minimizar las variaciones por cambios en la densidad óptica entre experimentos.

14. Extracción de proteínas.

Se extrajeron proteínas de pared de las biopelículas maduras, así como también las proteínas de superficie de los cultivos sésiles (biopelículas) y planctónicos ($DO_{600}=1$) según se detalla a continuación.

Los sobrenadantes de las biopelículas se descartaron y las bacterias de las biopelículas maduras suspendidas en 1 ml de PBS se recuperaron por centrifugación a 10.000 x g y 4°C durante 20 min para extraer las proteínas de pared celular. Para ello, el precipitado bacteriano se trató con 600 μ l de la solución de lisis (rafinosa 30%; Tris-HCl 0,05M pH 7,5 y NaCl 0,145 M suplementado con 100 μ g/ml de lisostafina y 1 mM de PMSF). Luego se incubó a 37°C y 200 rpm durante 1 h, se

centrifugó a 8.000 x g y 4°C durante 15 min y se recuperaron los sobrenadantes conteniendo las proteínas de pared y se conservaron a -20°C hasta su uso.

De los precipitados de bacterias de las biopelículas obtenidos por centrifugación se extrajeron, también, las proteínas de superficie. Ésta fracción proteica se obtuvo además de cultivos planctónicos crecidos hasta fase post-exponencial ($DO_{600}=1$) tratados o no con C_{sub} de CIP. Para ello, las proteínas de superficie se solubilizaron al suspender el precipitado bacteriano (de la biopelícula o del cultivo planctónico) en 1,25 ml de Tris-HCl 1M pH 7; 2 ml de SDS 10% y 6,75 ml de H_2O_d e incubar durante 3 min a 100°C. Posteriormente, las proteínas así solubilizadas se recuperaron por centrifugación a 10.000 x g y 4°C durante 3 min. Los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos y se conservaron a -20°C hasta su uso. La concentración proteica de cada muestra se determinó mediante el método de Bradford.

15. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

Todas las muestras proteicas (proteínas de pared o de superficie) se separaron en un gel de poliacrilamida al 10%. El gel separador al 10% se compuso de 4 ml de acrilamida 30% / bisacrilamida 8%; 2,5 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 3,3 ml de H_2O_d ; 0,1 ml de SDS 10%; 0,1 ml de persulfato de amonio 10%; 4 μ l de tetrametiletilendiamina (TEMED). El gel concentrador al 4% se compuso de 1,3 ml de acrilamida 30% / bisacrilamida 8%; 2,5 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 6,1 ml de H_2O_d ; 0,1 ml de SDS 10%; 50 μ l de persulfato de amonio 10%; 10 μ l de TEMED. Concentraciones iguales de cada muestra se suspendieron en buffer de Laemmli 5X (SDS 10%; glicerol 50%; azul de bromofenol 0,3%; Tris-HCl 50mM; β -mercaptoetanol 5%), se hirvieron durante 3 min y se sembraron en los pocillos del gel. El gel se sumergió en buffer de corrida 1X y se corrió a 60 V durante 30 min y a 120 V durante 90 min. Luego, los geles se tiñieron con azul de Coomassie 0,25% durante 15 min y se decoloraron con 3 cambios de solución de desteñido (metanol 30%, ácido acético 10% y H_2O_d 60%).

16. Identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF.

Las proteínas de los perfiles obtenidos por SDS-PAGE se fijaron al gel mediante la incubación del mismo en solución fijadora (etanol 30% v/v y H_3PO_4 2% v/v) durante 3 hs. Luego de realizar 3 lavados con H_2O_d de 30 min cada uno, el gel se sumergió en solución de tinción (metanol 18% v/v; $(NH_4)_2SO_4$ 17% p/v y H_3PO_4 2%

v/v) durante 1 h en agitación. Luego, se adicionó azul de Coomassie coloidal 0,5 g/l y se incubó durante 24 hs en agitación. Posteriormente, se realizó un lavado con H₂O_d y se escindieron las bandas proteicas seleccionadas con un bisturí estéril para su posterior identificación por MALDI-TOF/TOF. Las muestras proteicas se destiñeron con una solución de HCO₃NH₄ 50 mM y HCO₃NH₄ 25mM que contenía acetonitrilo 50% y posteriormente acetonitrilo 100%. Luego de lavar con H₂O_d, las muestras se redujeron, alquilaron y digirieron con tripsina. Los péptidos obtenidos se extrajeron del gel con acetonitrilo 50%/TFA 0,5%, se concentraron hasta sequedad en una centrífuga de vacío SpeedVac y se diluyeron a un volumen final de 5 ml con 50%/TFA 0,5%. Las muestras se mezclaron 1:1 con ácido hidroxicinámico 3 mg/ml en 50%/TFA 0,5%. Las muestras se analizaron con un espectrómetro MALDI-TOF/TOF, Ultraflex II (Bruker Daltonics), en el servicio brindado en el CEQUIBIEM (Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Buenos Aires, Argentina). Se consideró significativo un valor de *score* mayor que 81 ($p < 0,05$).

17. Extracción de polisacárido capsular e inmunoprecipitación doble.

La cepa Newman de *S. aureus* se cultivó a 37°C durante 24 hs en placas de agar Columbia (Difco) suplementado con NaCl 2% para favorecer la producción de PC. Se agregó al medio C_{sub} de CIP cuando fue necesario. Las cepas de *S. aureus* Reynolds PC5+ y PC- (Tabla 1) se utilizaron como controles positivo y negativo de expresión capsular, respectivamente. Se cosecharon todas las colonias de una placa en 1 ml de PBS 10 mM (NaCl 0,15 M; pH 7,2) y las suspensiones bacterianas se autoclavaron por 1 h a 121°C. Las bacterias se precipitaron por centrifugación a 10.000 x g y los sobrenadantes se filtraron a través de una membrana de poliétersulfona con poros de 0,45 nm. Los extractos capsulares así obtenidos se conservaron a -20°C.

La expresión semicuantitativa del PC se determinó mediante un ensayo de inmunoprecipitación doble. Para ello, sobre un portaobjetos se preparó un gel delgado de agarosa al 1% y se realizaron ocho orificios circulares alrededor de un orificio central. En el orificio central se adicionaron 30 µl de antisuero capsular tipo 5 absorbido y sobre los demás orificios se agregaron 30 µl de diluciones seriadas al medio de los extractos bacterianos, incluyendo los controles positivo y negativo. El portaobjetos se colocó en una cámara húmeda a temperatura ambiente para permitir la inmunodifusión de los antígenos capsulares y del antisuero. Luego de 24

hs las líneas de precipitación se fijaron por sucesivos lavados con NaCl 0,3 y 0,15 M y se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie.

18. Cuantificación del PIA y del PC.

Para la cuantificación del PIA se utilizaron dos métodos de detección diferentes: espectrofotométrico y fluorométrico. En el primer caso, luego de fijar las biopelículas maduras según lo detallado en el ensayo de formación de biopelículas, se agregó 100 μ l/pocillo de solución de bloqueo [BSA 1% p/v en PBST (Tween 20 0,05% en PBS)] y se incubó a 37°C durante 1h. Luego, la solución de bloqueo se reemplazó por una nueva solución de bloqueo conteniendo 75 ng/ml de la aglutinina WGA conjugada a peroxidasa y la microplaca se incubó a 37°C durante 30 min. Tras el lavado de la placa con PBST, se agregó 100 μ l/pocillo de solución sustrato (1 ml de o-fenilendiamina 10 mg/ml; 9 ml de citrato 0,1 M; 10 μ l de H₂O₂ 30V). Luego de 5 min se detuvo la reacción mediante el agregado de 50 μ l de H₂SO₄ 12,5% y se midió la Abs a 492 nm (Abs₄₉₂) utilizando un lector de microplacas. Para la cuantificación fluorométrica del PIA, se agregó 100 μ l/pocillo de una solución de WGA conjugada a OG (Molecular Probes) 90 μ g/ml a las microplacas de las biopelículas maduras previamente fijadas. Transcurridos 15 min de incubación a temperatura ambiente y en la oscuridad, se eliminó el colorante y se lavó la placa con PBS para eliminar el colorante remanente. Finalmente, se agregaron 100 μ l/pocillo de PBS y se midió la emisión de fluorescencia en un fluorómetro. El fluoróforo OG se excitó a 485 nm y su emisión se detectó a 528 nm. Los niveles del PIA se expresaron relativos al crecimiento bacteriano medido al inicio del procedimiento (F/DO_C).

El PC se cuantificó por un procedimiento similar al descrito arriba pero la solución de bloqueo se reemplazó por una solución de antisuero capsular tipo 5 absorbido (dilución 1:3000) y la placa se incubó a 37°C durante 30 min. Tras lavar la placa, se agregó 100 μ l/pocillo de una solución de proteína A conjugada a peroxidasa (dilución 1:3000) y se la incubó a 37°C durante 30 min. Se agregó solución sustrato, luego de lavar la placa y se procedió de igual manera que lo descrito para la cuantificación del PIA. Los niveles de PC se determinaron midiendo la Abs₄₉₂. Los niveles del PIA y del PC se expresaron relativos al crecimiento bacteriano medidos al comienzo del ensayo (Abs₄₉₂/DO_C).

19. Actividad hemolítica y proteolítica.

Un volumen de 10 μ l de los sobrenadantes correspondientes a las biopelículas maduras se sembraron en placas de TSA suplementadas con sangre de carnero o de conejo al 5%, las cuales permiten evidenciar la actividad hemolítica de las δ - y α -hemolisinas, respectivamente. También, se sembraron 10 μ l de los mismos sobrenadantes en placas de TSA suplementadas con leche (10%) para evidenciar la actividad proteolítica. Transcurridas 18 hs de incubación a 37°C se midió el diámetro de los halos hemolíticos y proteolíticos en las placas correspondientes.

20. Actividad aconitasa.

La actividad de la enzima aconitasa de las bacterias de las biopelículas maduras crecidas en botellas de 75 cm² se cuantificó acorde al método de Kennedy y col. (1983) ¹⁰⁹. Para ello, las células bacterianas de las biopelículas se suspendieron en una solución que contiene Tris-HCl 90mM, pH 8; fluorocitrato 100 μ M y 100 μ g/ml de lisostafina. Las suspensiones se incubaron a 37°C durante 15 min y se centrifugaron a 21.000 \times g y 4°C durante 30 min. Alícuotas de 20 μ l de los lisados se adicionaron a 180 μ l de solución de ensayo (Tris-HCl 100 mM, pH8; citrato de trisodio 50 mM) y se incubaron a 37°C durante 5 min. La cantidad de aconitato producido se cuantificó midiendo la Abs a 240 nm (Abs₂₄₀). Se utilizó un coeficiente de absorción molar de 3,6 mM⁻¹ cm⁻¹ y se definió 1 unidad (U) aconitasa como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de aconitato por min. La actividad enzimática se expresó como U/mg de proteínas totales. La concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo de Bradford.

21. Medición del pH y liberación del hierro unido a transferrina.

El pH de los sobrenadantes obtenidos por centrifugación a 10.000 \times g durante 10 min de los cultivos planctónicos (DO₆₀₀=4) se midió con un pHmetro Adwa AD12. La liberación de hierro unido a la transferrina humana se llevó a cabo según Friedman y col. (2006) ³⁸. Luego del agregado de 40 μ M de transferrina humana a los sobrenadantes obtenidos se midió la Abs a 450 nm (Abs₄₅₀) correspondiente al complejo Fe-transferrina cada 1 min durante 15 min.

22. Cuantificación de glucosa, lactato y acetato.

Los sobrenadantes de las biopelículas maduras se transfirieron a tubos Falcon de 15 ml y se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min para descartar cualquier resto bacteriano. La concentración de glucosa, lactato y acetato presente en los mismos se determinó utilizando los equipos comerciales Glucose Assay, Lactate Assay y Acetate Colorimetric Assay (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. El índice de lactato (IL) producido por consumo de glucosa se definió como $IL = nm \text{ lactato}_{\text{TSBg}} / mg \text{ glucosa}_{\text{TSBg}}$. La concentración de lactato producido por las biopelículas tratadas con SAL o SAL+Fe²⁺ se estableció como:

$$[\text{lactato}]_{\text{Tratado}} = IL \times [\text{glucosa}]_{\text{Tratado}}$$

23. Estudio *in silico* de acoplamiento y simulación de dinámica molecular.

La estructura del dominio LytR de la proteína AgrA se obtuvo de la base de datos Protein Data Bank (PDB) siendo su ID 3BS1. Para el estudio de acoplamiento molecular entre AgrA y el SAL se utilizaron los programas AutoDock4 (ADK4) (versión 4.2.6) y AutoDock Vina (ADV). La posición del centro de la grilla se obtuvo a partir del cálculo del centro de masa de la proteína. La forma de la grilla se definió como un hexaedro rectangular de 52,5 Å de lado y 67,5 Å de alto, con el fin de abarcar la totalidad de la proteína y permitir que el SAL pueda adoptar cualquier conformación. Se obtuvieron los mapas de energía para cada tipo de átomo del SAL con una resolución de 0,375 Å. Se realizaron 100 experimentos de acoplamiento diferentes con cada uno de los programas y los resultados se agruparon utilizando un valor de desviación de la media cuadrática (RMSD) de 2 Å. Los parámetros para la búsqueda global con el algoritmo genético Lamarckiano (LGA) empleados con el programa ADK4 se fijaron en 350 para el tamaño de la población inicial, 10×10^6 para el número de evaluaciones de energía y de $2,7 \times 10^4$ para el número máximo de generaciones. Para el programa ADV se emplearon las opciones por defecto. Los parámetros para la búsqueda local del LGA mantuvieron sus valores por defecto para ambos programas.

Para las simulaciones de dinámica molecular, las estructuras de AgrA y la del complejo con el SAL (en una concentración saturante de 260 mM) obtenida mediante el ensayo de acoplamiento, se solvataron con una caja de moléculas de H₂O TIP3P con forma de un octaedro truncado. Estas estructuras solvatadas se

parametrizaron con el campo de fuerzas ff14SB y AM1. Para ello se utilizó el módulo LEaP del paquete AMBER. Todas las etapas de la simulación se realizaron con el módulo PMEMD.CUDA del paquete AMBER, que corresponde a la implementación en GPU (Graphics Processor Unit) del módulo PMEMD (Particle Mesh Ewald Molecular Dynamics). El protocolo general consistió de 4 etapas: optimización, termalización, equilibración a número de partículas, temperatura y presión constante (NTP), y producción a número de partículas, volumen y temperatura constante (NVT). Durante el proceso de optimización, la estructura solvatada y parametrizada se optimizó utilizando 10 ciclos del algoritmo Steepest Descent y luego 4990 ciclos del algoritmo Conjugate Gradient. El proceso de termalización consistió en una primera etapa de calentamiento de 0 a 10 K durante 10 pseg con una constante de fuerza de 50 kcal/mol aplicada a todos los átomos de la proteína y una segunda etapa de calentamiento de 10 a 300 K durante 90 pseg con una constante de fuerza de 10 kcal/mol. Durante todo el proceso de termalización, el volumen del sistema se mantuvo constante y se utilizó el termostato de Berendsen. La equilibración se realizó mediante una simulación de 5 nseg a 300 K utilizando el termostato de Langevin y sometiendo al sistema a una presión de 1atm mediante el barostato de Berendsen. Se aplicó una fuerza de 1 kcal/mol para limitar la movilidad de los átomos de la proteína durante el proceso. Finalmente para la producción se empleó el termostato Berendsen manteniendo la temperatura en 300 K y se apagó el barostato para generar las condiciones que aproximan a un ensamble NVT, eliminando todo tipo de restricciones sobre los átomos de la proteína. El tiempo de simulación fue de 100 nseg y las coordenadas para cada uno de los átomos del sistema se registraron cada 2 fseg. En las 4 etapas se utilizaron condiciones periódicas de contorno, el método de sumas de Ewald y un valor de corte de 10 Å para las interacciones de no unión. En todos los casos donde se empleó el termostato Berendsen, se utilizó una constante de acoplamiento de 5, mientras que en los que se empleó el termostato Langevin se usó una constante de 1.

24. Modelo murino de colonización nasal.

Grupos de ratones CF1 machos de 8 semanas (aprox. 25 g de peso) se dividieron al azar en 2 grupos de 5-6 ratones cada uno. El procedimiento experimental fue evaluado por el CICUAL y aprobado por resolución N° 901/16 de la Facultad de Medicina (UBA). Treinta min antes del desafío los ratones se inyectaron

por vía intravenosa con 200 µl de SAL 2mM o PBS (control). Luego, 10 µl de una suspensión que contenía un inóculo de $1,6 \times 10^7$ UFC de la cepa Newman de *S. aureus* se depositaron lentamente en las narinas de los ratones con una micropipeta. Transcurridas 4 hs, los ratones se sacrificaron con CO₂ y el área que rodea la región nasal de los mismos se trató con etanol 70%. Posteriormente, se extrajeron las narinas y se homogeneizaron en 400 µl de TSB utilizando un homogeinizador de tejidos (Ultra Turrax). Finalmente, diluciones de los homogenatos se sembraron en placas de TSA y se incubaron a 37°C durante 18 hs para el posterior recuento de las UFC⁹⁹.

25. Análisis estadístico.

Los datos no paramétricos se analizaron con el test de Mann-Whitney, mientras que los datos con distribución normal se compararon con un *t*-test no pareado usando el programa Graphpad (version 5.0; GraphPad Prism). Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

Anexo I. Oligonucleótidos utilizados para qRT-PCR.

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Fuente
<i>gyrB</i>	F: GGTGCTGGGCAAATACAAGT R: TGGGATACCACGTCCGTTAT	65
<i>icaA</i>	F: GCCATGTGTTGGATGTTGGT R: AACCTTTTCGTTTTTCATTGTGCT	Este trabajo
<i>icaR</i>	F: TCGAACTATTCAATTGATGCTTTA R: CAGAAAATTCCTCAGGCGTA	Este trabajo
<i>cap5K</i>	F: CCAGTGAATTGTTTGCAACG R: CATTTCCTCAATAAATGTTGAAAG	65
<i>pykA</i>	F: TGCAGCAAGTTTCGTACGTC R: GGGATTTCAACACCCATGTC	110
<i>gapB-Fw</i>	F: GCATTATTCCTACTTCTACTGG R: GCTTGGTTTACTTCTTCTGC	Este trabajo
<i>ldh1</i>	F: TTCGAGGAGATGTTATGG R: ACAGATGACAACCTAGATCC	Este trabajo
<i>citB</i>	F: TCAAAATCCATCATTCTTCC R: TCACCGAATTTACCCATAAC	111
<i>glmM</i>	F: CTAGTGATGATGTTGAACC R: CAAGAAAACCCAGAATTACC	Este trabajo
<i>fur</i>	F: GACAGTATACAGAACGTTAGAG R: GACCACATTCCATACATAC	Este trabajo
<i>codY</i>	F: TAGCACAAACGATTAGTAGC R: CAGCATATTCACCTAGTACC	Este trabajo
RNAIII	F: TTCACTGTGTCGATAATCCA R: TGATTTCAATGGCACAAGAT	Este trabajo
<i>agrA</i>	F: CATTGCGAAGACGATCC R: GATTATCAGTTGCGAGGG	Este trabajo
<i>agrC</i>	F: CTGGCCTACGTGATTA R: GCTACTTACTTCATCGGG	Este trabajo
<i>psmA</i> ₁₋₂	F: TGGGTATCATCGCTGGCATC R: TACTTACCAGTGAATTTCTC	112
<i>psmA</i> ₃₋₄	F: ATGGAATTCGTAGCAAATTATTC R: GCGAAAATGTCGATAATTGCTT	112
<i>psmβ</i> ₂	F: CTGCACAACAACATGATAG R: TTACCTAGTAAACCCACAC	Este trabajo
<i>sae</i>	F: ATGCTAATACCGTGAATGTCCA R: TGGCCGTTAAACCACATTTAA	65
<i>eap</i>	F: TAGAGGTATCGGGGAACGTG R: TTGGTGTTGATGTGCCATTT	66
<i>emp</i>	F: CAGAATCGCCTAGATATACACATCCA R: CCATGCCCTGGTGTAAACAAAATT	66

<i>sdrC</i>	F: AAAAGGCATGATACCAAATCGA R: AATTCTCCATTCGTATGTTCTG	66
<i>fnbA</i>	F: ACAAGTTGAAGTGGCACAGCC R: CCGCTACATCTGCTGATCTTGTC	66
<i>clfA</i>	F: ATGTGACAGTTGTGATTGACTCTGG R: TAGGCACTGAAAAACCATAATTCAGT	66

Señal I: SAL

Obj. 1. Determinar el efecto de las señales sobre la capacidad de *S. aureus* para formar biopelículas.

1.1. Efecto del SAL sobre la biodisponibilidad de hierro.

La molécula de SAL tiene la particularidad de poder capturar iones de hierro según las condiciones del medio en el que se encuentre ¹¹³ ¹¹⁴. Con el objetivo de conocer la capacidad del SAL para acomplejar Fe^{2+} en el medio de cultivo utilizado se cuantificaron espectrofotométricamente los complejos ferrozina- Fe^{2+} formados en TSBg tratado con concentraciones crecientes de SAL y $50 \mu\text{M}$ de FeSO_4 . Por cierto, una concentración de 2 mM de SAL depletó el 23% del hierro libre (Figura 5). Concentraciones crecientes de SAL provocaron una disminución constante (aprox. 80%) del hierro libre disponible alcanzando una meseta alrededor de los 12,5 mM. A pesar de que la concentración de 5 mM de SAL depletó el 49% del Fe^{2+} libre, se eligió para continuar el estudio la concentración de 2 mM debido a que ésta es la concentración alcanzada en suero habitualmente después de la ingestión de aspirina en dosis terapéuticas. Resultados similares se obtuvieron al medir el hierro libre total en el medio TSBg ($39,3 \pm 7,1 \mu\text{M}$) y TSBg con 5 mM de SAL ($21,4 \pm 5,3 \mu\text{M}$) por espectroscopía de absorción atómica (Departamento de Química Analítica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA).

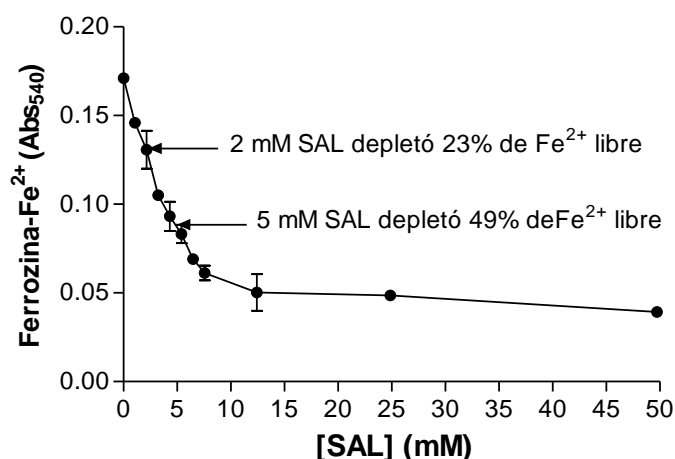


Figura 5. Capacidad quelante del SAL de iones Fe^{2+} . Cuantificación de complejos ferrozina- Fe^{2+} en TSBg tratado con diferentes concentraciones de SAL mezclado con $50 \mu\text{M}$ Fe^{2+} . La cantidad de complejo ferrozina- Fe^{2+} se determinó midiendo la absorbancia a 540nm (Abs_{540}). La concentración de hierro basal en el medio TSBg fue $39,3 \mu\text{M}$. Se realizaron 3 experimentos independientes.

Además, se cuantificó la concentración de hierro en el interior de las bacterias que constituyen las biopelículas. La concentración intracelular de Fe^{2+} libre determinada en presencia de 2 mM fue 27% más baja que aquella obtenida en las bacterias de las biopelículas control, sin agregado de SAL, y similar a la registrada en las biopelículas formadas en TSBg tratado con Chelex-100 (Figura 6).

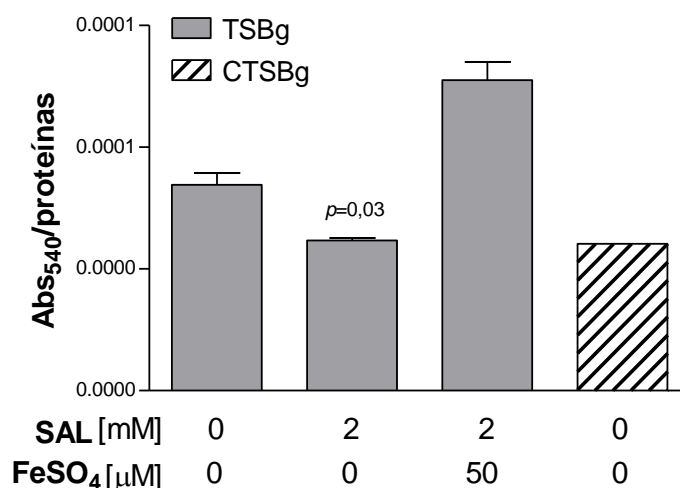


Figura 6. Contenido intracelular de hierro luego del tratamiento con SAL de biopelículas de *S. aureus*. Cada barra representa la media \pm SEM de la Abs₅₄₀ relativa a la concentración de proteínas de la muestra en $\mu\text{g}/\text{ml}$, medida por triplicado de 3 experimentos independientes. El grupo tratado con SAL y el no tratado fue significativamente diferente ($p = 0,03$) (Mann-Whitney test). El medio CTSBg fue usado como valor de referencia.

1.2. Influencia del SAL sobre la formación de la biopelícula.

Inicialmente, el efecto del SAL sobre la formación de la biopelícula se determinó utilizando las cepas Newman y CBS de *S. aureus* (Tabla 1 y 2). Para ello, las biopelículas se crecieron en presencia de diferentes concentraciones de SAL y a distintos tiempos. Las biopelículas de ambas cepas formadas en presencia de 0,36 ó 2 mM de SAL se observaron significativamente aumentadas a los tiempos estudiados (24 y 48 hs) respecto de aquellas del grupo control (Figura 7).

Para los posteriores experimentos se seleccionó 24 hs de incubación para la formación de las biopelículas debido a que se observaron resultados similares a los determinados a las 48 hs en las condiciones estudiadas.

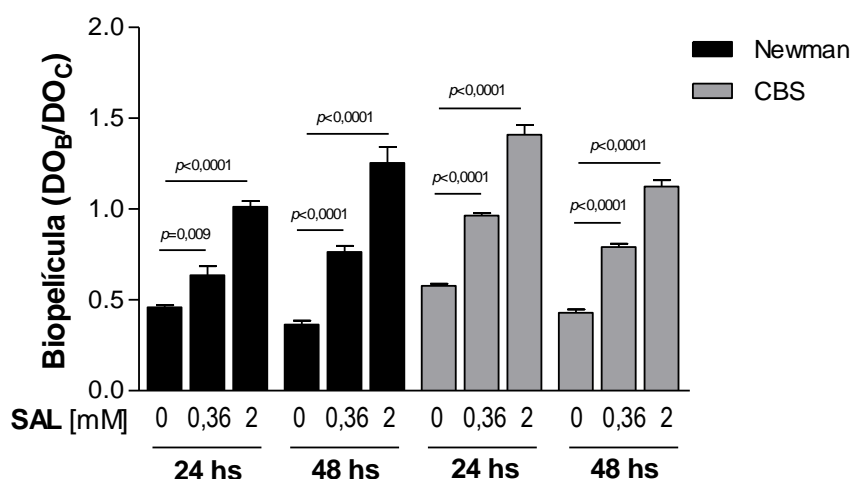


Figura 6. Formación de biopelícula por *S. aureus* expuesta al SAL. Biopelículas de las cepas Newman y CBS formadas en TSBg en presencia o ausencia de distintas concentraciones de SAL durante 24 y 48 hs. Cada barra representa la media \pm SEM de 6–8 pocillos de 3 a 4 experimentos independientes. Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos para las comparaciones representadas por una línea horizontal (Mann-Whitney test).

Teniendo en cuenta que diversas cepas de *S. aureus* podrían responder de modo diferente al Fe^{2+} disponible, se seleccionaron aislamientos clínicos relacionados a los clones USA100 y USA300 (Tabla 2) para determinar el efecto quelante del SAL sobre la formación de biopelícula. Tanto en las cepas SAMR como en las SAMS se observó una producción aumentada de la biopelícula en presencia de 2 mM de SAL que fue significativamente disminuida con el agregado de hierro exógeno (Figura 7).

Tabla 2. Características de las cepas estudiadas.

Cepa	spa tipo	MLST		SCCmec	Infección
		CC	ST		
Mu50	t002	5	5	II	-
CBS	t149	5	5	I	-
BRZ	t138	8	239	II	-
AR48	t149	5	5	I	crónica
AR66	t002	5	100	IV	aguda
AR94	t008	8	8	IV	crónica
AR71	t166	ST10	10	I	crónica
AR56	t149	5	5	-	crónica
AR70	t002	5	5	-	aguda
AR83	t002	5	5	-	crónica
Newman	t008	8	8	-	-

Cepas de *S. aureus* relacionadas a los clones USA300 (CC8) o USA100 (CC5). Las cepas AR provinieron de diferentes hospitales de Buenos Aires. Los secuenciotipos multilocus (MLST), los complejos clonales (CC), los secuenciotipos (ST), el tipo de SCCmec y el spa tipo se determinaron previamente⁹².

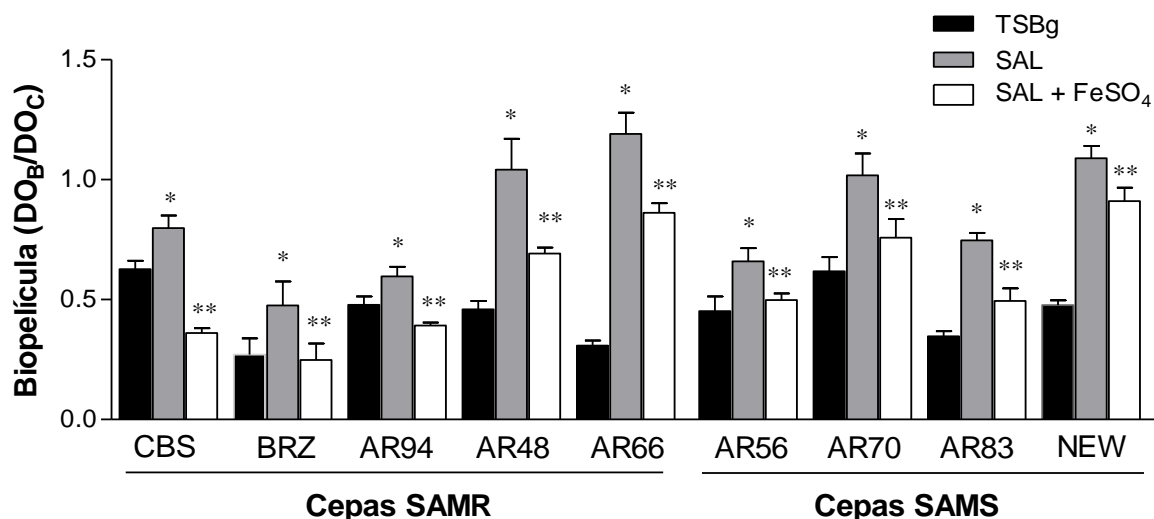


Figura 7. Efecto del SAL sobre la biopelícula de cepas SAMR y SAMS. Las biopelículas se formaron en TSBg por 24 hs en presencia o no de 2 mM de SAL o SAL + 50 μ M de FeSO₄. Cada barra representa la media \pm SEM de 6 pocillos de 4 experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos: (*) grupos tratados con SAL vs grupos no tratados; (**) grupos tratados con SAL + Fe²⁺ vs grupos tratados con SAL. Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos (Mann-Whitney test).

Los valores de biopelícula inducida por el SAL oscilaron desde 1,25 (AR94) a 3,87 (AR66) para las cepas estudiadas. Los valores de biomasa relativos a la cepa Newman tratada con SAL fueron los siguientes: CBS (73%), BRZ (43%), AR94 (54%), AR48 (95%), AR66 (109%), AR56 (60%), AR70 (93%), y AR83 (68%).

Cabe destacar que el agregado de hierro al medio TSBg no afectó la formación de la biopelícula de la cepa Newman (DO_B/DO_C TSBg: $0,35 \pm 0,03$ vs TSBg+Fe²⁺: $0,28 \pm 0,02$; NS).

Por otro lado, las biopelículas de la cepa Newman formadas en presencia de SAL o SAL+Fe²⁺ se tiñeron con dos colorantes fluorescentes y visualizaron por CLSM. El análisis con el programa COMSTAT de las imágenes con las bacterias viables (fluorescencia verde) estableció que la exposición al SAL indujo el aumento de la biomasa ($1,308 \mu m^3/\mu m^2$) y del grosor máximo de la biopelícula ($3,356 \mu m$) cuando se los comparó con aquellos del control (biomasa: $0,636 \mu m^3/\mu m^2$ y grosor máximo: $2,666 \mu m$). El agregado de hierro al medio conteniendo SAL disminuyó ambos parámetros (biomasa: $0,688 \mu m^3/\mu m^2$ y grosor máximo: $2,112 \mu m$). Los valores de biomasa de las bacterias muertas (fluorescencia roja) fueron similares entre las condiciones estudiadas (control: $0,540 \mu m^3/\mu m^2$; SAL: $0,529 \mu m^3/\mu m^2$; SAL+Fe²⁺: $0,485 \mu m^3/\mu m^2$) (Figura 8). En la Figura 9 se muestra que los

tratamientos con SAL y SAL+Fe²⁺ no modificaron los niveles de bacterias metabólicamente activas que constituyen las biopelículas. El conjunto de estos resultados sugiere que la disminución de Fe²⁺ causada por acción del SAL indujo un incremento en la formación de la biopelícula de *S. aureus* independientemente de la sensibilidad a la meticilina o de las características clonales.

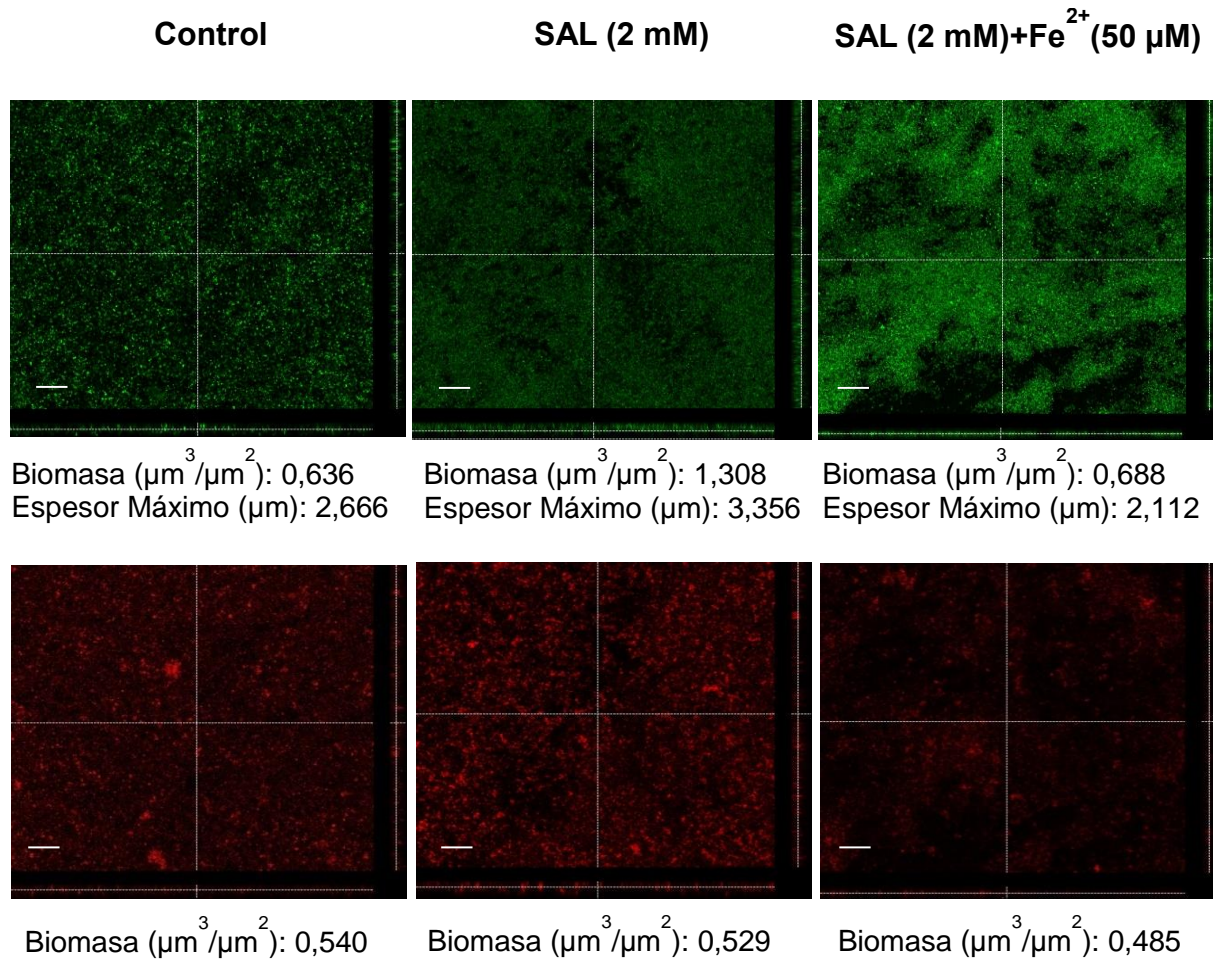


Figura 8. Imágenes de CLSM de la biopelícula de la cepa Newman. Las biopelículas formadas en TSBg con o sin SAL o SAL+Fe²⁺ por 24 hs se tiñeron con los fluoróforos del kit LIVE/DEAD BacLight. Los paneles superior e inferior muestran células fluorescentes verdes (vivas) y rojas (muertas), respectivamente. Secciones sagitales de las biopelículas se muestran debajo y a la derecha de cada imagen. Barra de escala: 10 µm. Los resultados son representativos de 2 experimentos. La biomasa es la cantidad de material biológico (en volumen) presente en un área dada.

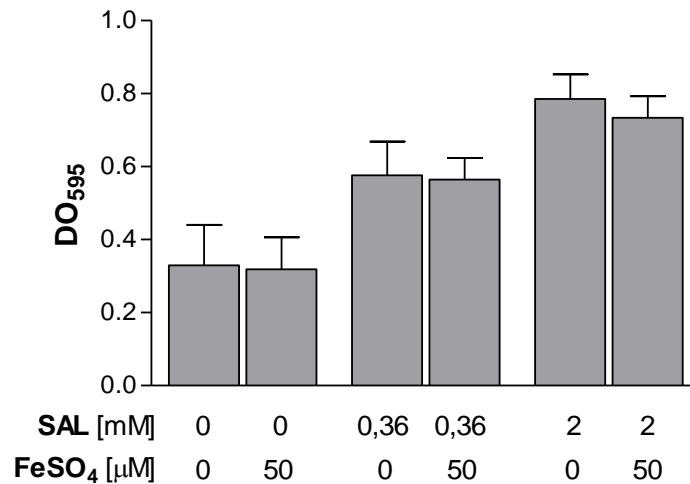


Figura 9. Células de *S. aureus* metabólicamente activas en la biopelícula. Las biopelículas se formaron en TSBg por 24 hs bajo las condiciones indicadas. La actividad metabólica se determinó mediante el ensayo de MTT¹⁰³. Se midió la DO de los pocillos a 595 nm (DO₅₉₅) correspondiente a los cristales de formazán formados. Cada barra representa la media ± DS de 3 experimentos independientes. Las comparaciones entre grupos (sin Fe²⁺ vs con Fe²⁺) no fueron estadísticamente significativas (Mann-Whitney test).

Obj. 2. Establecer el impacto de las señales sobre los constituyentes de la matriz extracelular de las biopelículas de *S. aureus*.

2.1. Efecto del SAL sobre la composición polisacáridica de las biopelículas.

S. aureus produce dos polisacáridos principales, el PC y el PIA, los cuales poseen como precursor común a la molécula UDP-*N*-acetilglucosamina. Trabajos previos demostraron que el SAL es capaz de reducir la producción del PC en cultivos planctónicos⁶⁵. Entonces, con el fin de estudiar el efecto de la quelación de Fe²⁺ por el SAL sobre las características de los polisacáridos de superficie de *S. aureus*, se realizaron mediciones de FTIR de cultivos planctónicos y de biopelículas.

El análisis se llevó a cabo en la región del espectro entre 1.200 cm⁻¹ y 800 cm⁻¹ utilizando un método estadístico multivariado no supervisado. Los gráficos así obtenidos revelaron un claro agrupamiento de los datos espectrales según los diferentes tratamientos (control; SAL; SAL+Fe²⁺). El tratamiento con SAL de los cultivos planctónicos de la cepa Newman causó una perturbación en la composición de los polisacáridos de superficie que no revirtió con el agregado exógeno de hierro (Figura 10A). Por lo tanto, se puede sugerir que la deficiencia nutricional de hierro

ocasionada por el SAL afectaría la expresión del PC en vez del PIA debido a que el SAL limita la producción de PC en cultivos planctónicos⁶⁵. Por el contrario, el análisis de los espectros de las biopelículas reveló que el agregado de hierro revirtió parcialmente las alteraciones polisacáridicas producidas en presencia del SAL (Figura 10B).

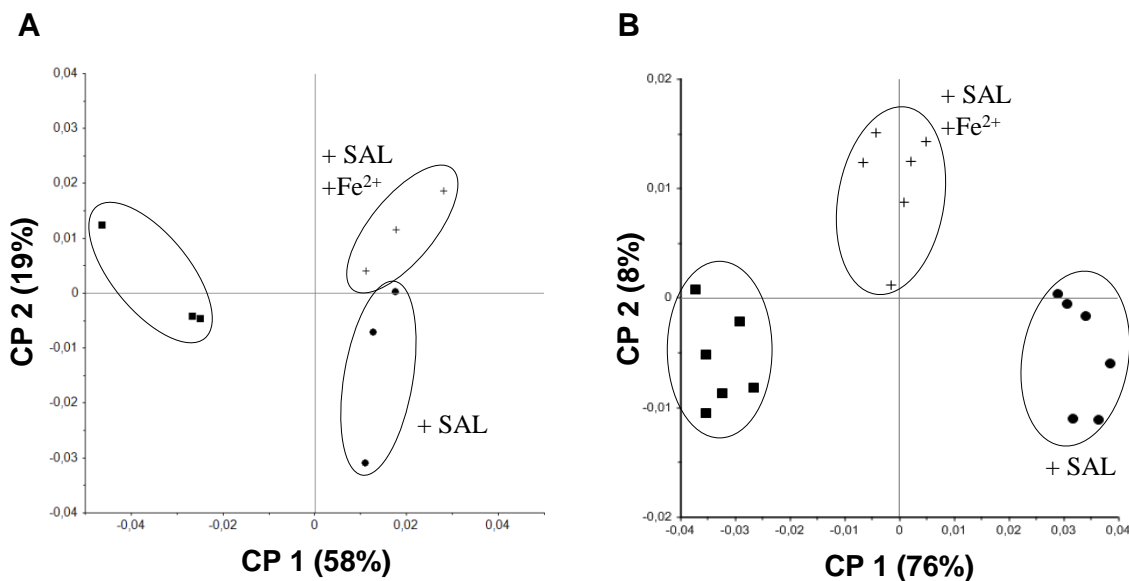


Figura 10. Impacto del SAL sobre polisacáridos superficiales de *S. aureus* monitoreado por espectroscopía FTIR. El análisis de componentes principales (CP) se llevó a cabo sobre la segunda derivada de los espectros vectorialmente normalizados en el rango espectral de los glicopolímeros ($1.200\text{--}800\text{cm}^{-1}$). **(A)** Cultivos planctónicos de la cepa Newman. **(B)** Biopelículas maduras de la cepa Newman. En ambos casos las bacterias se crecieron en TSBg con o sin 2 mM de SAL o SAL+Fe²⁺. Los diferentes grupos se indican con elipses y los símbolos son definidos en la figura. La contribución relativa de cada componente principal está indicada entre paréntesis.

La producción de PC se cuantificó en biopelículas de la cepa Newman mediante un ensayo de ELISA, observándose que dicho polisacárido no sería producido en las condiciones estudiadas (Figura 11).

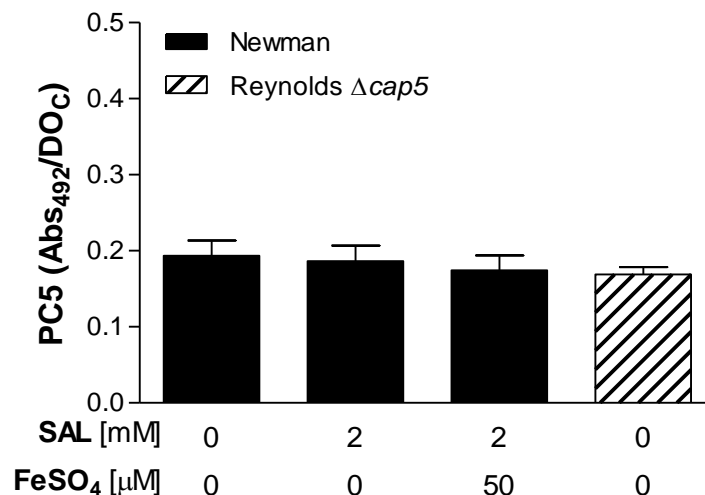


Figura 11. Expresión del polisacárido capsular (PC) en biopelículas de la cepa Newman. Las biopelículas se formaron por 24 hs en TSBg suplementado con SAL o SAL+Fe²⁺. El PC serotipo 5 se cuantificó por ELISA. Cada barra representa la media \pm SEM de la Abs₄₉₂ relativa a la densidad del cultivo final (DO_c). Control negativo: cepa Reynolds de *S. aureus* que no produce PC5.

La formación de las biopelículas crecidas en presencia de SAL se visualizó por SEM. Las imágenes mostraron que el SAL causó mayor agregación de las células bacterianas y estas células produjeron más sustancia extracelular respecto de lo observado en las biopelículas control, las cuales exhibieron imágenes de bacterias con contornos nítidos. El agregado de hierro al medio con SAL disminuyó el material que rodea a las células bacterianas (Figura 12).

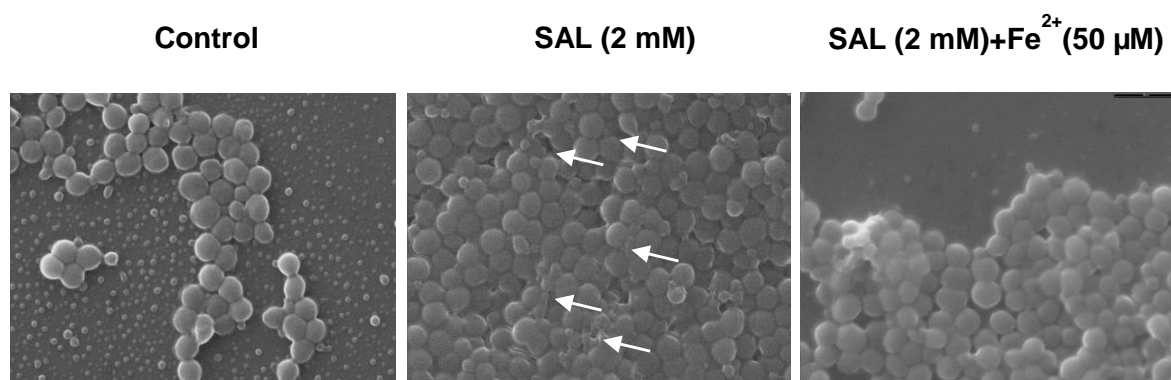


Figura 12. Visualización por SEM de la matriz exopolisacáridica de biopelículas. Las biopelículas de la cepa Newman se crecieron por 24 hs en TSBg suplementado con SAL o SAL+Fe²⁺. El aumento de las imágenes es 10.000x. Las flechas muestran las sustancias extracelulares entre células adyacentes. Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes.

A fin de obtener información adicional sobre la sustancia extracelular presente en las biopelículas expuestas al SAL, éstas se visualizaron por CLSM luego de teñirlas con una aglutinina (WGA) fluorescente y un colorante lipofílico de membrana. La Figura 13 muestra que la presencia del SAL induciría la producción de PIA según el alto contenido de tinción verde (PIA) y amarilla (colocalización de PIA y la célula). Llamativamente, en las biopelículas crecidas en medio conteniendo SAL y Fe^{2+} exógeno se observaron menos sectores coloreados de verde y amarillo sugiriendo una menor presencia de PIA en las matrices extracelulares. Más aún, bajo estas condiciones, las biomásas producidas no difirieron de aquellas observadas en las biopelículas control.

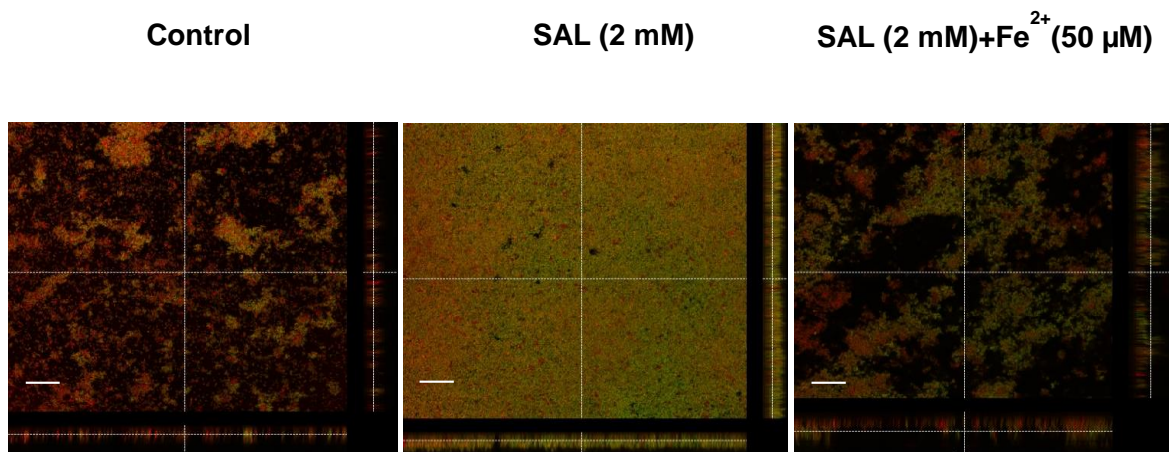


Figura 13. Visualización del PIA en biopelículas de la cepa Newman por CLSM. Las biopelículas se crecieron por 24 hs en TSBg suplementado con SAL o SAL+ Fe^{2+} . El PIA se visualiza verde debido a la tinción con la lectina WGA conjugada al fluoróforo Oregon Green 488 y las células bacterianas de color rojo debido a la tinción con el fluoróforo lipofílico FM 4-64. Secciones sagitales de las biopelículas se muestran debajo y a la derecha de cada imagen. Barra de escala: 10 μm . Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes.

A fin de respaldar estas evidencias, las biopelículas de *S aureus* se trataron con dispersina B, una hexosaminidasa que degrada carbohidratos como el PIA. La cepa SA113 de *S. aureus* se utilizó como referente debido a que PIA es el principal constituyente extracelular cuando adopta la forma de vida sésil⁹¹. El tratamiento enzimático provocó un desprendimiento significativo de las biopelículas producidas por las cepas Newman y CBS cuando se crecieron en presencia de SAL (Figura 14).

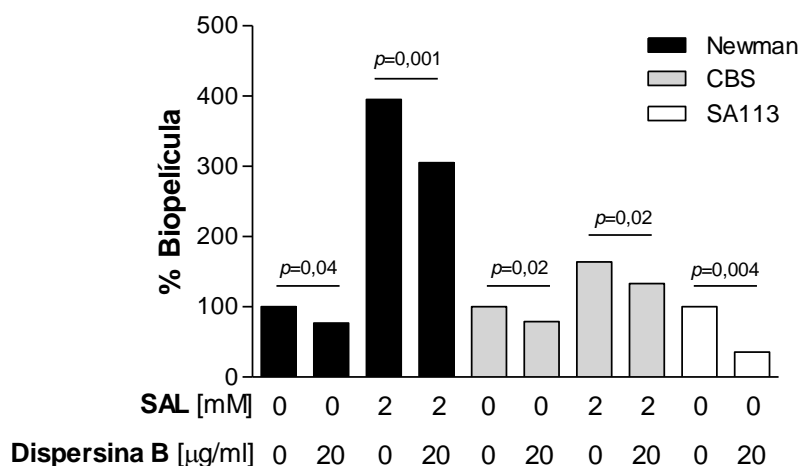


Figura 14. Efecto de la Dispersina B sobre la biopelícula de *S. aureus*. Las biopelículas de las cepas Newman y CBS formadas por 24 hs en TSBg en presencia o ausencia de SAL, se trataron con Dispersina B o PBS. Cada barra representa el porcentaje de la biopelícula cuantificada luego del tratamiento enzimático de 3 experimentos independientes. Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos para las comparaciones representadas por una línea horizontal (Mann-Whitney test). La cepa SA113 de *S. aureus* se utilizó como control positivo de PIA.

Además, la cantidad de PIA expresado en las biopelículas formadas por las cepas Newman, CBS y BRZ aumentó con la exposición al SAL y el agregado de hierro la disminuyó significativamente (Figura 15 A y B). Estos resultados indican que la deficiencia de hierro provocada por el SAL indujo la formación de biopelícula de manera PIA dependiente por cepas SAMS y SAMR.

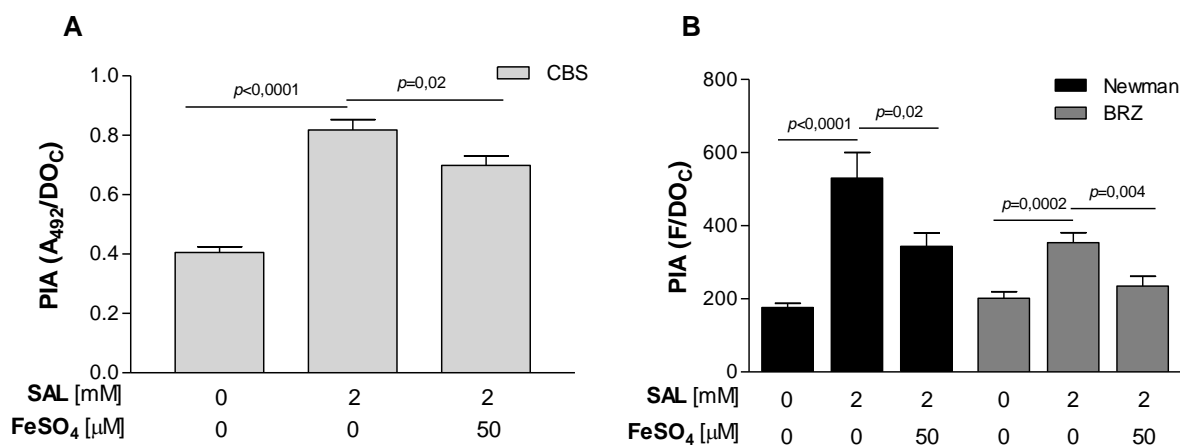


Figura 15. Cuantificación del PIA producido en biopelículas de *S. aureus* inducidas por SAL. Las biopelículas se formaron por 24 hs en TSBg suplementado con SAL o SAL+ Fe^{2+} . (A) PIA producido en biopelículas de la cepa CBS determinado por ELISA. (B) PIA expresado en biopelículas de las cepas BRZ y Newman cuantificado fluorométricamente. Cada barra representa la media \pm SEM de mediciones por cuadruplicado de 3 experimentos independientes. Los valores de Abs_{492} o fluorescencia (F) se relativizaron a la densidad del cultivo final (DO_C). Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos para las comparaciones representadas por una línea horizontal (Mann-Whitney test).

Obj. 3. Evaluar las consecuencias de la acción de las señales en las células bacterianas que integran la biopelícula, con principal atención en los cambios regulatorios y metabólicos.

3.1. Impacto del SAL sobre el metabolismo central en biopelículas.

La limitación de hierro impacta profundamente en el metabolismo bacteriano. Debido a que ciertas enzimas del ciclo TCA, como la aconitasa (*citB*), poseen centros de hierro-azufre y que una baja actividad del ciclo se ha vinculado con un incremento en los niveles del PIA en *S. epidermidis*¹¹⁵, se puede especular que la elevada producción del PIA en las biopelículas de *S. aureus* expuestas al SAL se debería a una baja actividad del ciclo TCA promovida por la limitación del hierro intracelular. Mediante PCR de tiempo real, se determinó que el SAL disminuyó los niveles de transcritos *citB* en las biopelículas de 24 hs y que éstos aumentaron en las biopelículas maduras formadas en presencia de hierro (Figura 16). Más aún, el SAL disminuyó la transcripción de *fur* en biopelículas inmaduras, cuyo producto génico regula positivamente la expresión de *citB*. Si bien el agregado de hierro no revirtió significativamente los niveles transcripcionales de *fur*, la represión mediada por SAL no se observó en biopelículas maduras (Figura 16).

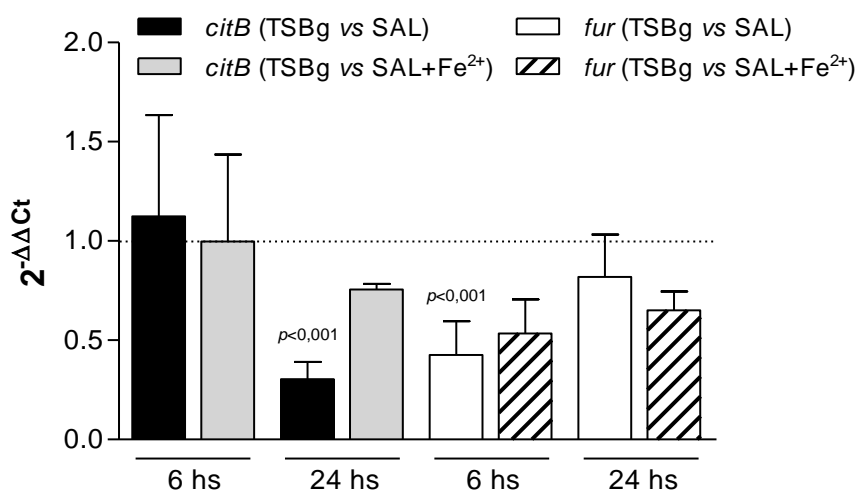


Figura 16. Efecto del SAL sobre la transcripción de *citB* y *fur* en biopelículas de *S. aureus*. Los niveles transcripcionales se evaluaron mediante qRT-PCR a partir de biopelículas inmaduras (6 hs) y maduras (24 hs) de la cepa Newman formadas en presencia de 2 mM de SAL o SAL + 50 μM de Fe²⁺. Los cambios en la expresión génica se mostraron como las veces de cambio ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Los datos se relativizaron a los niveles de expresión del gen *gyrB*. Cada barra representa la media ± SEM de mediciones por duplicado de 3 experimentos independientes. El valor de $p < 0,05$ indica la significancia estadística (Mann-Whitney test).

Los estudios de expresión del gen *citB* se reforzaron con ensayos funcionales. Se cuantificó la actividad de la enzima aconitasa en biopelículas maduras de la cepa Newman, determinándose que el SAL redujo significativamente la actividad enzimática y que el hierro revirtió dicho efecto hacia valores similares al del control (Figura 17). Así, estos resultados sugieren que la limitación de hierro mediada por SAL, afecta negativamente la actividad del ciclo TCA de las células bacterianas de la biopelícula de *S. aureus*.

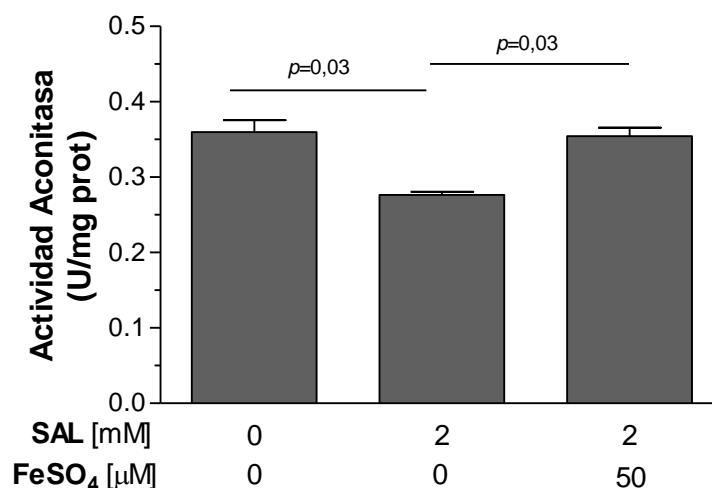


Figura 17. Cuantificación de la actividad aconitasa en biopelículas. Las biopelículas de la cepa Newman se formaron por 24 hs en TSBg suplementado con SAL o SAL+Fe²⁺. La actividad aconitasa se relativizó a la correspondiente cantidad de proteínas totales en cada muestra. Cada barra representa la media \pm SEM de mediciones por duplicado de 3 experimentos independientes. Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos para las comparaciones representadas por una línea horizontal (Mann-Whitney test).

Teniendo en cuenta que la producción de polisacáridos requiere un alto gasto energético y que el SAL disminuyó la actividad del ciclo TCA, hipotetizamos que las bacterias de la biopelícula adoptarían preferencialmente un metabolismo fermentativo en presencia del SAL. Por tal motivo, se analizó mediante PCR de tiempo real el efecto del SAL sobre la transcripción de genes metabólicos indicadores de glucólisis (*pyrA*, piruvato quinasa), gluconeogénesis (*gapB*, gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa), fermentación láctica (*ldh1*, lactato deshidrogenasa) y de la síntesis del precursor de la UDP-*N*-acetilglucosamina (*glmM*, P-glucosamina mutasa). Así, se determinó que el SAL aumentó significativamente los niveles de transcritos *glmM* en biopelículas inmaduras,

mientras que los mismos se encontraron disminuidos en biopelículas maduras (Figura 18). La presencia del SAL no incrementó en forma significativa la transcripción de ninguno de los otros genes analizados a los tiempos estudiados. Sin embargo, el SAL reforzó los niveles bajos de *gapB* y contribuyó a elevar los de *pyrA* en las biopelículas maduras.

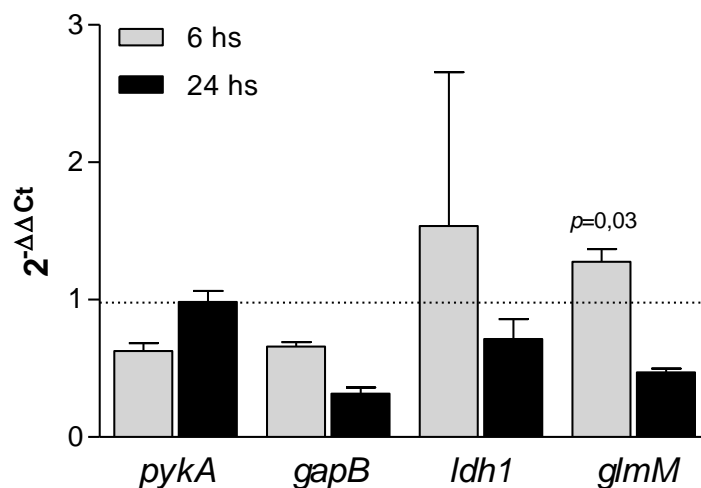


Figura 18. Efecto del SAL sobre la transcripción de *pykA*, *gapB*, *ldh1* y *glmM* en biopelículas. Mediante qRT-PCR se cuantificaron los transcritos de biopelículas inmaduras (6 hs) y maduras (24 hs) de la cepa Newman formadas en presencia o ausencia de 2 mM de SAL. Los cambios en la expresión génica se mostraron como las veces de cambio ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Los datos se relativizaron a los niveles de expresión del gen *gyrB*. Cada barra representa la media \pm SEM de mediciones por duplicado de 3 experimentos independientes. El valor de $p < 0,05$ indica la significancia estadística (Mann-Whitney test).

Por otra parte, mediante SDS-PAGE de las proteínas de pared celular extraídas de las biopelículas maduras, se observó que el SAL incrementó la intensidad de algunas bandas. El análisis de éstas bandas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF permitió identificar las proteínas L- y D- lactato deshidrogenada (Ldh) (score: 134 y 253, respectivamente; $p < 0,05$) y acetoína reductasa (ButA) (score: 86, $p < 0,05$) (Figura 19).

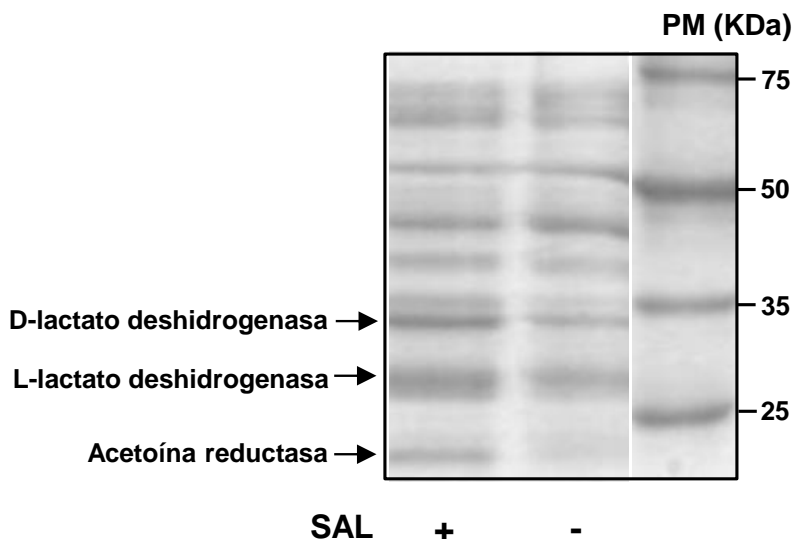


Figura 19. Efecto del SAL sobre la expresión de proteínas en biopelículas de *S. aureus*. SDS-PAGE de proteínas de pared extraídas de biopelículas de 24 hs de la cepa Newman formadas en TSBg suplementado o no con 2 mM de SAL. Se sembraron cantidades iguales de extractos proteicos en cada calle. Las flechas indican los polipéptidos D- y L-lactato deshidrogenasa y acetoína reductasa identificados por MALDI-TOF. La calle de la derecha corresponde al marcador de peso molecular (PM).

Posteriormente, se cuantificaron las concentraciones de acetato, glucosa y L-lactato en sobrenadantes obtenidos a partir de biopelículas de 24 hs de la cepa Newman. No se detectó la presencia de acetato en dichos sobrenadantes en ninguna de las condiciones ensayadas. Debido al ligero retraso en el crecimiento mediado por el SAL (Figura 20), los niveles de L-lactato se expresaron en función del índice de producción de L-lactato por consumo de glucosa en condiciones control ($IL = \text{nmol L-lactato}_{\text{TSBg}} / \text{mg glucosa}_{\text{TSBg}}$). La concentración de L-lactato determinada en los sobrenadantes obtenidos de las biopelículas de la cepa Newman fue de 855 nmoles/mg en la condición control. El SAL indujo el aumento en los niveles de L-lactato a 1.393,6 nmoles/mg y el agregado de hierro revirtió parcialmente dichos niveles (1.308 nmoles/mg).

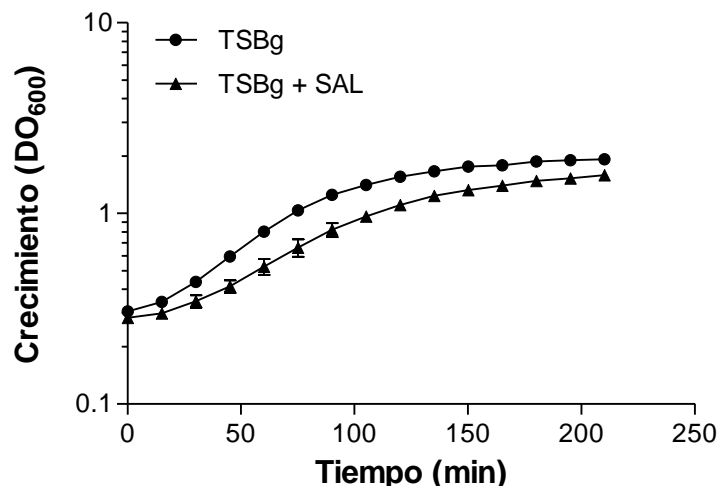


Figura 20. Curva de crecimiento de la cepa Newman en presencia de SAL.

Se monitoreó la DO_{600} de cultivos de la cepa Newman crecidos en TSBg en presencia o ausencia de 2 mM de SAL en función del tiempo. Cada punto representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes.

Además, la exposición de cultivos de *S. aureus* al SAL disminuyó los valores de pH del medio de cultivo (Figura 21A), promoviendo así la liberación del hierro unido a la transferrina humana (Figura 21B). Estos resultados sugieren que el SAL sólo estimularía la fermentación láctica ya que los niveles de acetato fueron indetectables y la expresión de Ldh se encontró aumentada por el SAL.

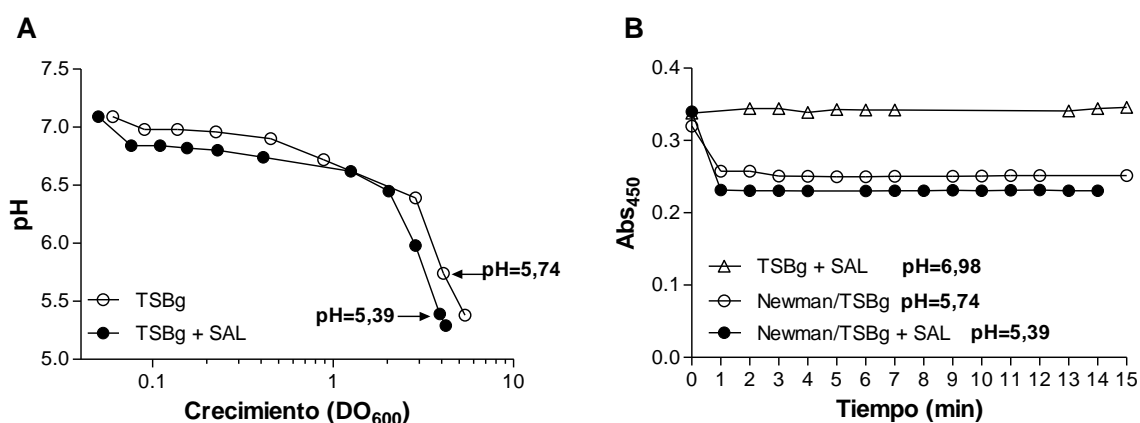


Figura 21. Efecto del SAL sobre el pH extracelular y la liberación del hierro unido a la transferrina humana. (A) Las curvas describen el pH extracelular vs el crecimiento (DO_{600}) de la cepa Newman expuesta o no a 2 mM de SAL. **(B)** Determinación espectrofotométrica de la liberación de hierro unido a la transferrina humana en cultivos en fase exponencial tardía ($DO_{600} = 4$) con o sin SAL. Los gráficos corresponden a un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

3.2. Efecto del SAL sobre el regulador CodY de *S. aureus*.

La transcripción de los operones *ica* y *cap* puede ser reprimida por CodY^{31 78 116}. Por este motivo, se investigó el efecto del SAL sobre CodY. Para ello, se obtuvieron y analizaron los espectros FTIR en el rango espectral que abarca las longitudes de onda 1.200 cm^{-1} y 800 cm^{-1} (región correspondiente a polisacáridos) de biopelículas de 24 hs formadas o no en presencia de SAL o SAL+Fe²⁺ de las cepas Newman y su mutante *codY*. El análisis de componentes principales reveló diferencias espectrales cualitativas y cuantitativas en dicha región entre ambas cepas crecidas en presencia de SAL (Figura 22). El efecto de la mutación *codY* sobre los polisacáridos superficiales se revirtió por acción del SAL así como también por SAL+Fe²⁺. Dicho resultado se confirmó mediante la obtención de distancias espectrales (medidas cuantitativas de disimilitud correspondientes a las áreas no solapantes entre los espectros relativos al de la cepa Newman sin tratamiento). Dichos valores fueron: Newman+SAL, 0,76; Newman+SAL+Fe²⁺, 0,35; Newman *codY*, 0,35; Newman *codY*+SAL, 0,18; Newman *codY*+SAL+Fe²⁺, 0,21. Por lo tanto, los polisacáridos fueron afectados por el SAL en una forma dependiente de *codY*.

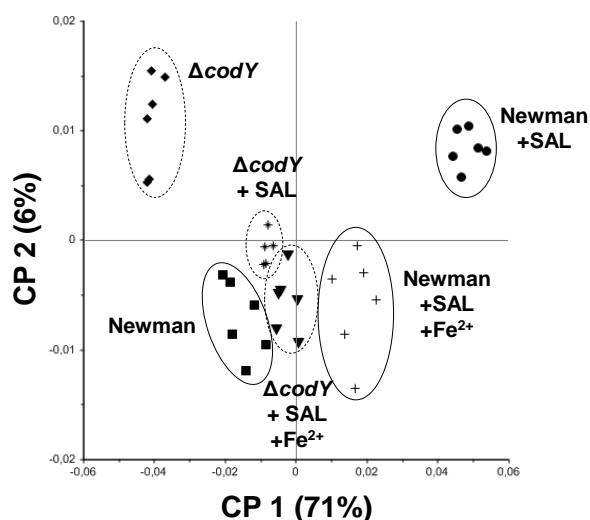


Figura 22. Interrelación entre *codY* y SAL en biopelículas de *S. aureus* monitoreada por espectroscopía FTIR. El análisis de componentes principales (CP) se llevó a cabo sobre la segunda derivada de los espectros vectorialmente normalizados en el rango espectral de los glicopolímeros ($1.200\text{--}800\text{cm}^{-1}$), de biopelículas de la cepa Newman y su mutante *codY*. Las biopelículas de 24 hs se formaron en TSBg en presencia o ausencia de 2 mM de SAL o SAL + 50 μM de Fe²⁺. Los diferentes grupos se indican con elipses y los símbolos son definidos en la figura. La contribución relativa de cada componente principal se indica entre paréntesis.

Por otra parte, se determinó que el SAL incrementó la producción del PIA en la biopelícula de la mutante Newman *codY* (Figura 23). Sin embargo, dicho incremento (1,7 veces) fue menor al mediado por el SAL en la cepa Newman (3 veces). El agregado de Fe^{2+} al medio de cultivo que contenía SAL, no afectó significativamente la producción del PIA en la biopelícula de la cepa mutante respecto a la condición en la que sólo el SAL estaba presente. Llamativamente, la cantidad de PIA en la biopelícula de la cepa parental formada con SAL disminuyó con la presencia de Fe^{2+} .

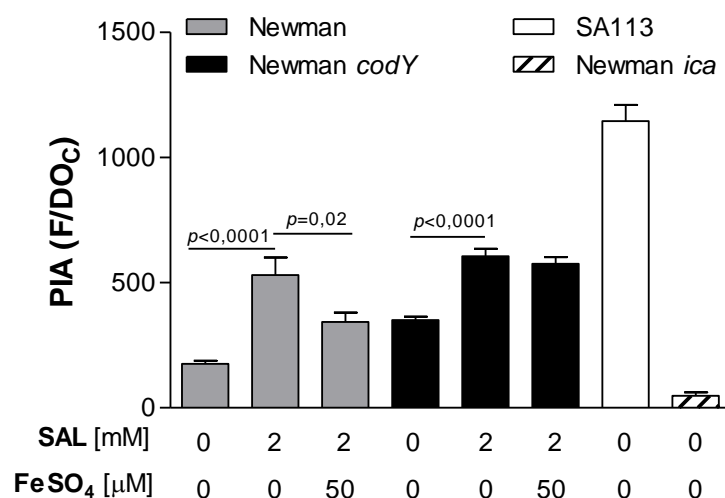


Figura 23. Cuantificación del PIA producido en biopelículas de la mutante Newman *codY*.

Las biopelículas de las cepas Newman y Newman *codY* se formaron por 24 hs en TSBg suplementado con SAL o SAL+ Fe^{2+} . El PIA producido en las biopelículas se cuantificó fluorométricamente. Cada barra representa la media \pm SEM de mediciones por cuadruplicado de 3 experimentos independientes. Los valores de fluorescencia (F) se relativizaron a la densidad del cultivo final (DO_c). Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos para las comparaciones representadas por una línea horizontal (Mann-Whitney test). Las cepas SA113 y Newman *ica* se utilizaron como controles positivo y negativo de la producción del PIA, respectivamente.

Además, se investigó el rol de CodY en la formación de biopelícula mediado por SAL. Si bien la mutante Newman *codY* produjo una baja cantidad de biopelícula respecto a la cepa parental, la presencia del SAL indujo un incremento significativo en la cepa mutante (Figura 24). A diferencia de lo observado para la cepa Newman, el agregado Fe^{2+} al medio de cultivo que contenía SAL incrementó la producción de la biopelícula de la mutante Newman *codY*, respecto a la condición en la que sólo el SAL se encuentra presente (Figura 24).

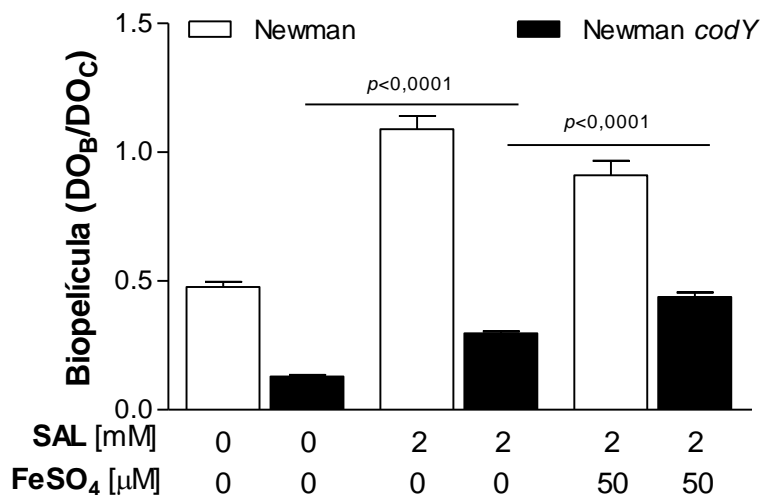


Figura 24. Formación de biopelícula por las cepas Newman y Newman *codY* expuestas al SAL. Las biopelículas de la cepa Newman y su mutante isogénica *codY* se crecieron por 24 hs en presencia o ausencia de SAL o SAL+Fe²⁺. Cada barra representa la media ± SEM de 6–8 pocillos de 3 a 4 experimentos independientes. Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos para las comparaciones representadas por una línea horizontal (Mann-Whitney test).

Por otra parte, con el objetivo de estudiar la interrelación entre *codY* y el SAL, se analizó la expresión de los transcritos *codY*, *icaA* y *cap5K* en biopelículas de la cepa Newman mediante PCR de tiempo real (Figura 25). Como era de esperar, el SAL disminuyó los niveles de transcritos *cap5k* tanto en biopelículas maduras como inmaduras y el agregado de hierro no revirtió dicho efecto. Por otra parte, la presencia del SAL en biopelículas maduras promovió niveles de transcritos de *icaA* superiores a los observados en biopelículas de 6 hs formadas en presencia de dicha señal. Consistente con este hallazgo, la transcripción de *codY* se encontró disminuida en biopelículas maduras expuestas al SAL, mientras que el agregado de hierro mantuvo a los valores de expresión relativa de *icaA* y *codY* en biopelículas maduras por debajo de los valores de los controles. Por lo tanto, la exposición al SAL pareciera liberar la represión de *icaA* ejercida por CodY, al disminuir los niveles transcripcionales de *codY* en las biopelículas maduras.

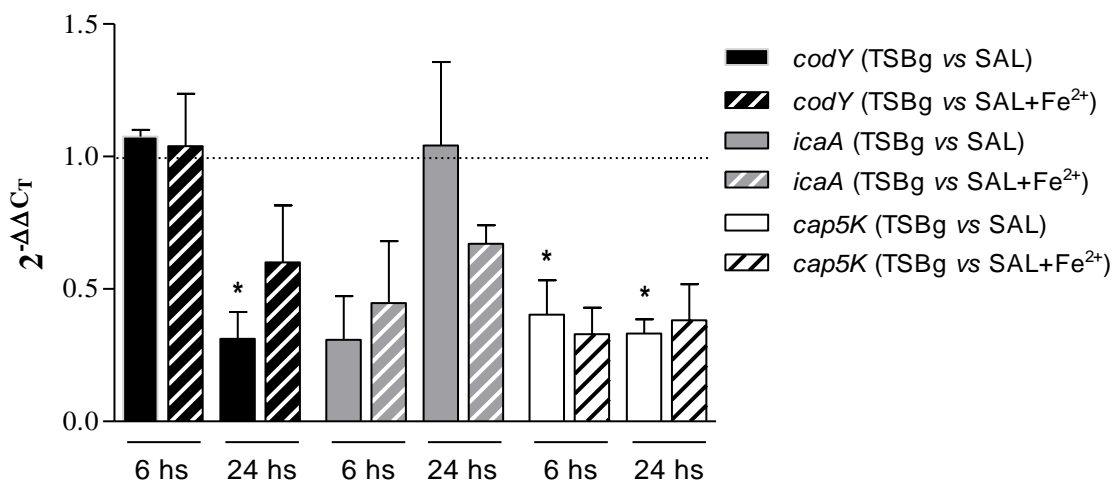


Figura 25. Efecto del SAL sobre la transcripción de *codY*, *icaA* y *cap5K* en biopelículas. Mediante qRT-PCR se cuantificaron los transcritos de biopelículas inmaduras (6 hs) y maduras (24 hs) de la cepa Newman formadas en presencia de 2 mM de SAL o SAL + 50 μ M de Fe²⁺. Los cambios en la expresión génica se mostraron como las veces de cambio ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Los datos se relativizaron a los niveles de expresión del gen *gyrB*. Cada barra representa la media \pm SEM de mediciones por duplicado de 3 experimentos independientes. El * denota la significancia estadística, $p < 0,05$ (Mann-Whitney test).

3.3. Influencia del SAL sobre el sistema regulador *agr* en biopelículas de *S. aureus*.

La presencia de un sistema *agr* funcional sería fundamental para la producción del PC en cultivos planctónicos de *S. aureus*¹¹⁷. Por otro lado, la activación del sistema *agr* requiere de Fur cuando el hierro está limitado³⁴. Teniendo en cuenta que en presencia del SAL se encontró disminuida la transcripción de los genes *fur* (Figura 16) y *cap5K* (Figura 25) y que no se detectó inducción del PC en las biopelículas de *S. aureus* (Figura 11) se postuló que la funcionalidad del sistema *agr* podría verse afectada en presencia de SAL. Cabe mencionar que la expresión de la α -hemolisina es regulada positivamente por el sistema *agr* mediante RNAIII. Además, esta molécula efectora codifica para la δ -hemolisina, siendo su detección una evidencia de la expresión de RNAIII y por ende de la funcionalidad del sistema *agr*¹¹⁸.

En principio, se estudió la capacidad hemolítica de los sobrenadantes obtenidos de biopelículas maduras de *S. aureus*. Para ello, se sembraron dichos sobrenadantes en placas agar sangre de conejo y de carnero para determinar la actividad hemolítica de las α - y δ -hemolisinas, respectivamente. Así, se estableció

que los sobrenadantes de las biopelículas crecidas en presencia de SAL generaron halos de hemólisis menores a los controles en ambos tipos de placas de cultivo. Entonces se puede sugerir que la producción y liberación de α -hemolisina y δ -hemolisina al medio extracelular de las biopelículas estaría disminuida en presencia de SAL (Tabla 3). La mutante Newman *agr* deficiente se utilizó como control negativo de hemólisis.

Tabla 3. Actividad hemolítica de los sobrenadantes de biopelículas.

Sobrenadantes de biopelículas de 24 hs	Diámetro del halo de hemólisis (mm)	
	α -hemólisis	δ -hemólisis
Newman	3,00 \pm 0,06	3,33 \pm 0,17
Newman+2mM SAL	2,50 \pm 0,06	2,17 \pm 0,17
Newman <i>agr</i>	0	0

La capacidad de formar biopelículas en *S. aureus* se ha vinculado con una baja actividad del sistema *agr*. Este sistema regula la etapa de dispersión de la biopelícula mediante el control positivo de la expresión de proteasas y de moléculas con propiedades surfactantes, como la δ -hemolisina y las PSMs, que desestructuran la biopelícula madura promoviendo así la liberación de algunas bacterias^{82 119}. Al respecto, la dispersión de la biopelícula madura (24 hs) de la cepa Newman determinada a las 48 hs (DO_B/DO_C 24 hs: 0,46 \pm 0,01 vs 48 hs: 0,36 \pm 0,02; $p=0,0004$), no se observó en presencia del SAL (DO_B/DO_C TSBg+2 mM SAL, 24 hs: 1,01 \pm 0,03 vs TSBg+2 mM SAL, 48 hs: 1,25 \pm 0,09; NS) (Figura 6). Por todo esto, se analizó la capacidad de la mutante Newman *agr* para formar biopelículas en presencia de SAL. Al respecto, la biomasa de la biopelícula de la mutante Newman *agr* se observó significativamente mayor respecto a aquella de la cepa parental. Por el contrario, el tratamiento con SAL no afectó en forma significativa la producción de biopelícula de la cepa mutante (Figura 26). Por otra parte, la visualización mediante SEM de las biopelículas maduras de la cepa Newman y de su mutante *agr*, mostró resultados semejantes a los obtenidos espectrofotométricamente (Figura 27).

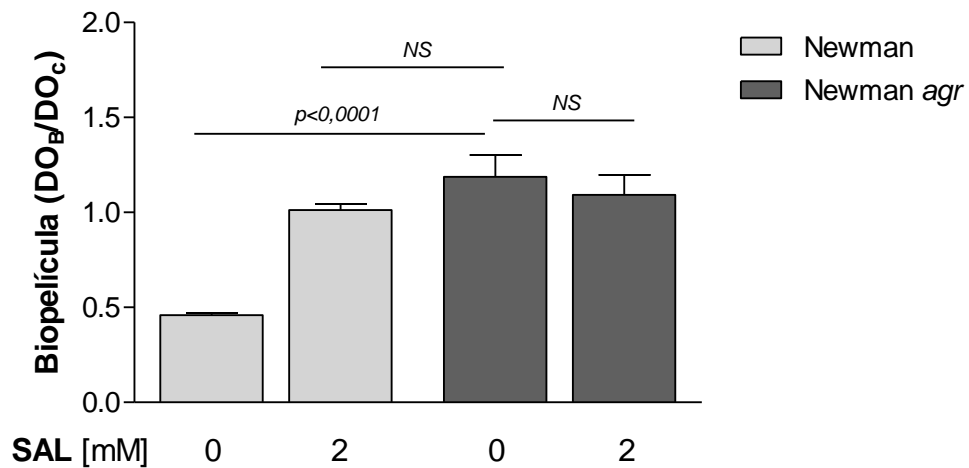


Figura 26. Formación de biopelícula por las cepas Newman y Newman *agr* expuestas al SAL. Las biopelículas de la cepa Newman y su mutante isogénica *agr* se crecieron por 24 hs en presencia o no de 2 mM de SAL. Cada barra representa la media \pm SEM de 6–8 pocillos de 3 a 4 experimentos independientes. Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos para las comparaciones representadas por una línea horizontal (Mann-Whitney test). *NS* (no significativo estadísticamente).

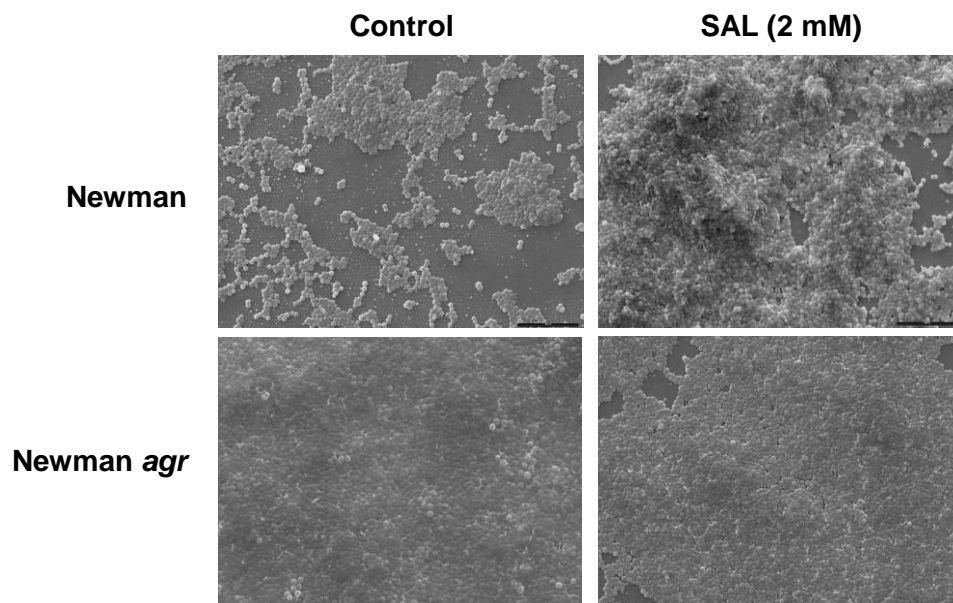


Figura 27. Visualización de las biopelículas por SEM. Las biopelículas de la cepa Newman y de su mutante *agr* se crecieron por 24 hs en TSBg suplementado con 2 mM de SAL. El aumento de las imágenes obtenidas es 2.000x. Las imágenes corresponden a un experimento representativo de 2 experimentos independientes.

En conjunto, estos resultados indican que el SAL disminuyó la producción de α - y δ -hemolisinas, lo que sugeriría una disminución de la expresión del sistema *agr* en la biopelícula madura.

3.3.1. Interacción *in silico* del SAL con el regulador AgrA.

La proteína reguladora de respuesta AgrA posee un rol activador sobre el propio sistema de quorum sensing así como también sobre el RNAlII (Figura 1), lo cual pone de manifiesto la importancia de esta proteína en la funcionalidad del sistema *agr*³⁹. Por su parte, el SAL es un ácido débil capaz de ingresar al citoplasma bacteriano e interactuar con proteínas y con el ADN^{120 121}. Por lo tanto, se llevó a cabo un estudio *in silico* de acoplamiento molecular entre el SAL y la proteína AgrA (PDB ID: 3BS1) con el objetivo de analizar su posible interacción. Mediante el empleo de dos programas diferentes (AutoDock4 y AutoDock Vina), se identificaron 4 sitios en el regulador AgrA con los que el SAL podría interactuar (Figura 28A). Los sitios 1 y 2 coincidieron con regiones de interacción entre AgrA y el ADN. Estos sitios poseen residuos de Arg (aminoácido con carga positiva) y de Leu (aminoácido apolar) que podrían interactuar con las regiones polar y apolar del SAL, respectivamente. Además, en ambos casos se formaron pequeños bolsillos capaces de albergar al SAL. También, se analizaron los aminoácidos del regulador AgrA involucrados en la posible interacción con el SAL en el sitio 1 (Figura 28B), el cual según los experimentos de acoplamiento, sería el de mayor probabilidad de albergar al SAL con una energía de unión de -4,30 kcal/mol. Interesantemente, el residuo Arg 198 se encuentra contiguo al residuo Cys 199 involucrado en el mecanismo de óxido-reducción que dirige la unión de AgrA al ADN⁴⁰. La presencia del SAL en las posiciones de los sitios 3 y 4 pareció no interferir activamente con la unión de AgrA al ADN. Particularmente, el SAL en el sitio 3 se ubicó sobre la única α -hélice de AgrA muy expuesto al solvente y alejado del sitio de unión al ADN.

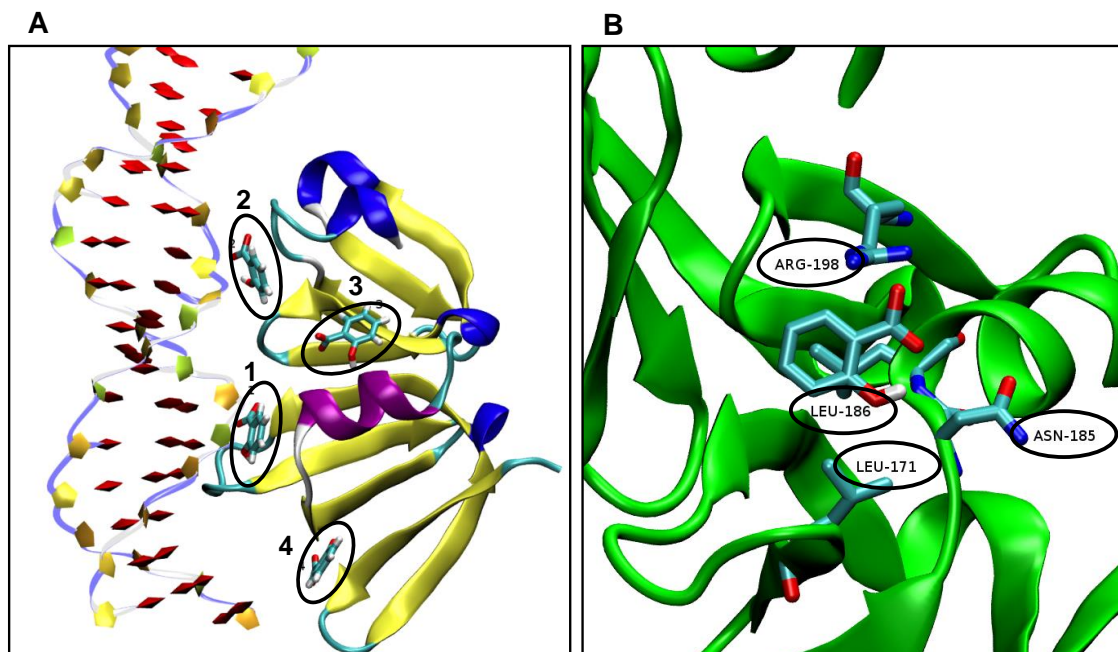


Figura 28. Sitios en AgrA involucrados en la interacción con el SAL, determinados *in silico*. (A) Se muestran los 4 sitios de interacción entre el SAL y AgrA en superposición con un fragmento de ADN. El regulador AgrA se muestra con una representación de “New Cartoon” en donde las alfa hélices, las láminas beta y los “loops” se colorearon en magenta, amarillo y azul, respectivamente. El fragmento de ADN se muestra con una representación de “PapeChain” en donde los grupos fosfatos unidos entre sí, los azúcares y las bases nitrogenadas se muestran de color azul, amarillo y rojo respectivamente. El SAL ubicado en los sitios 1 al 4 se destaca con elipses y se muestra con una representación de “Licorice” con los átomos de C, O e H en cian, rojo y blanco, respectivamente. (B) Complejo predicho para ArgA con el SAL en el sitio 1, junto a los principales aminoácidos responsables de la interacción denotados con elipses (Leu 186, Leu 171, Arg 198 y Asn 185).

Con el fin de evaluar la estabilidad del SAL en cada uno de los sitios identificados a partir de los experimentos de acoplamiento molecular, se llevó a cabo una simulación de dinámica molecular. Como control, se realizó una simulación del regulador AgrA en ausencia del SAL, observándose fluctuaciones debidas al esqueleto proteico a través del tiempo (Figura 29A). Estos valores indicaron que el regulador AgrA, en ausencia del SAL, se estabiliza cerca de los 50 nseg de simulación, luego de dos fluctuaciones poco significativas, las cuales son previsibles si se tiene en cuenta que la estructura de partida provino de un experimento de difracción de rayos X. No se encontraron diferencias significativas en la conformación de la proteína debido a la presencia del SAL, por lo que sólo se muestran los valores correspondientes a la proteína. Por otro lado, el SAL permaneció sin variaciones significativas durante toda la simulación únicamente

cuando se encontraba presente en el sitio 4, observándose una inversión de 180° respecto al eje menor de la molécula a partir del nanosegundo 65 de la simulación (Figura 29B).

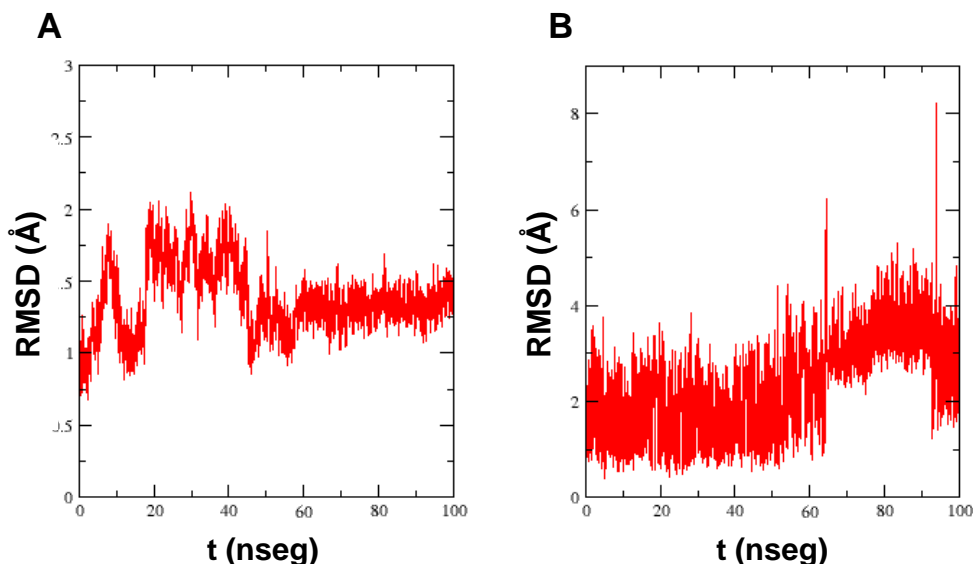


Figura 29. Simulación de dinámica molecular para el complejo AgrA-SAL. Se muestran los valores de desviación de la media cuadrática (RMSD) en función del tiempo. **(A)** Se muestran las fluctuaciones correspondientes al esqueleto proteico, observándose una estabilización a partir de los 50 nseg. **(B)** Se muestran las fluctuaciones debidas al SAL en el sitio 4 de AgrA, observándose una estabilización a partir de los 65 nseg.

Esta fluctuación no afectó de forma significativa la interacción de AgrA con el SAL ya que la misma ocurre principalmente entre los anillos aromáticos del SAL y del residuo Tyr 183. Dicha interacción se observó en una secuencia de imágenes capturadas cada 15 nseg superpuestas entre sí, en donde la mitad del tiempo el SAL adoptó una conformación en la que el grupo hidroxilo se orientó hacia arriba y la otra mitad en una conformación opuesta (según su eje medio) (Figura 30).

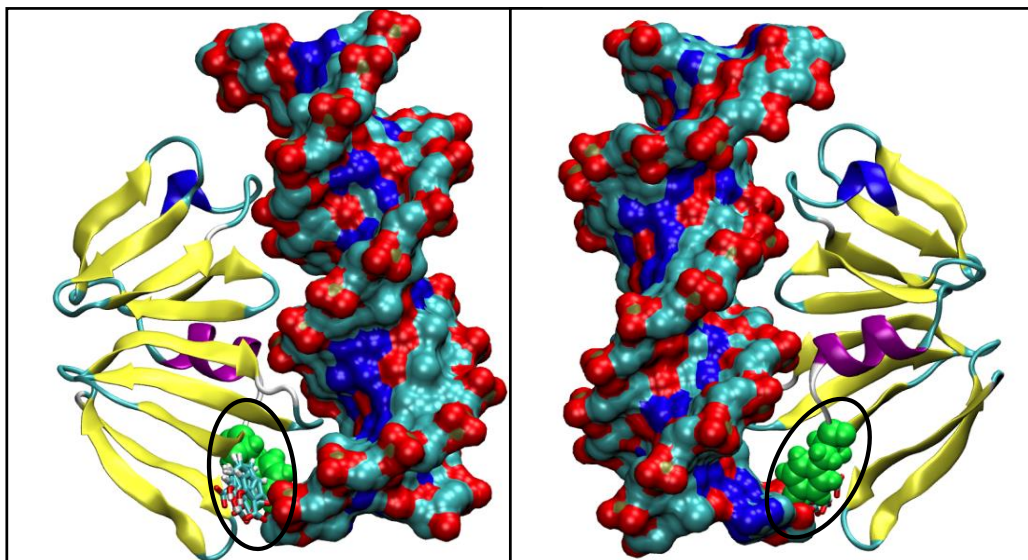


Figura 30. Interacción del SAL con el sitio 4 de AgrA. Se muestra a AgrA albergando al SAL en el sitio 4 (destacado con elipses) en superposición con una doble hélice de ADN de frente (panel derecho) e invertido (panel izquierdo). El residuo de Tyr se muestra con una representación de “van der Waals” de color verde y la doble hélice con una representación de “Surface Accessibility Solvent Area” coloreado por tipo de átomos (N, O, C, P en azul, rojo, cian y dorado, respectivamente).

Por lo tanto, los resultados de acoplamiento y dinámica molecular sugieren que el SAL podría interactuar con 4 sitios de AgrA, uno de los cuales está involucrado en el proceso de unión del regulador al ADN. Si bien dicho sitio es el de mayor afinidad por el SAL, no sería en el que dicho ligando se encontraría más frecuentemente. Sin embargo, se puede especular que el posicionamiento del SAL en los diferentes sitios en distintos tiempos, podría ejercer un efecto estérico que estaría interfiriendo con la correcta unión de AgrA al ADN.

3.3.2. Modulación transcripcional de genes regulados por AgrA en las biopelículas inducidas por SAL.

Teniendo en cuenta que el SAL podría interferir con la unión entre AgrA y sus secuencias consenso en el ADN alterando su acción activadora, se analizó la transcripción de genes regulados por AgrA. Además de regular su propia transcripción y la de los otros genes del locus, AgrA es el único activador de la expresión de PSMs conocido en la actualidad. Mediante PCR de tiempo real se determinó que el SAL disminuyó significativamente los niveles de los transcriptos *psma*₁₋₂, *psma*₃₋₄ y *psm*β₂ en biopelículas inmaduras y maduras de la cepa Newman

(Figura 31). Además, los niveles de transcritos *agrA* y *agrC* también se encontraron significativamente disminuidos en las biopelículas de 6 y 24 hs por acción del SAL (Figura 31). Por otra parte, se analizó el efecto del SAL sobre la transcripción del efector del sistema *agr*, RNAIII (Figura 1). Para ello, se cuantificaron mediante PCR de tiempo real los transcritos RNAIII de las biopelículas de la cepa Newman. Así, se determinó que el SAL redujo significativamente los niveles de dicho transcrito tanto en biopelículas inmaduras como maduras (Figura 31).

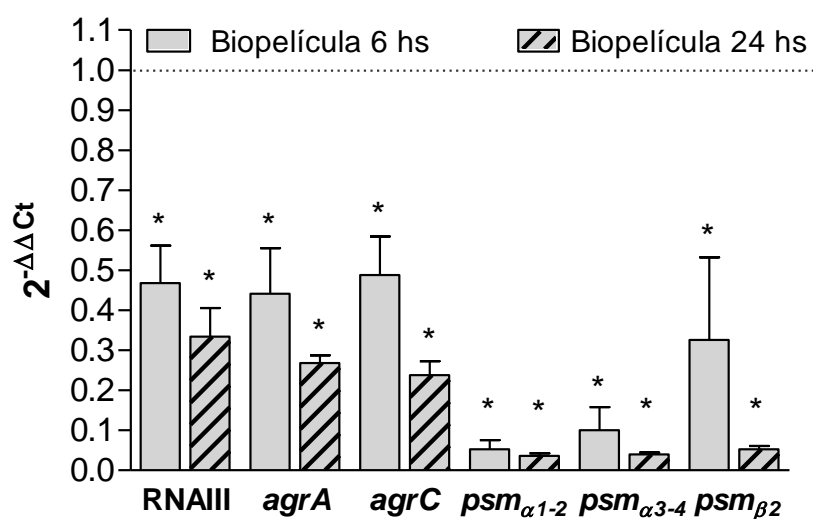


Figura 31. Efecto del SAL sobre la transcripción de genes regulados por AgrA en biopelículas. Mediante qRT-PCR se cuantificaron los transcritos RNAIII, *agrA*, *agrC*, *psm*_{α1-2}, *psm*_{α3-4} y *psm*_{β2} en biopelículas inmaduras (6 hs) y maduras (24 hs) de la cepa Newman formadas en presencia de 2 mM de SAL. Los cambios en la expresión génica se mostraron como las veces de cambio ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Los datos se relativizaron a los niveles de expresión del gen *gyrB*. Cada barra representa la media \pm SEM de mediciones por duplicado de 3 experimentos independientes. El * denota la significancia estadística, $p < 0,05$ (*t* test).

Considerando que la expresión de *spa* es regulada negativamente por el sistema *agr*¹²², se evaluó el efecto del SAL sobre la actividad promotora de los promotores *spa* y P3 de *agr* fusionados al gen reportero GFP (Figura 32). La presencia del SAL disminuyó la actividad del promotor P3 en las biopelículas maduras de la cepa Newman. Por el contrario, la actividad promotora del gen *spa* se observó aumentada por el tratamiento con SAL (Figura 32).

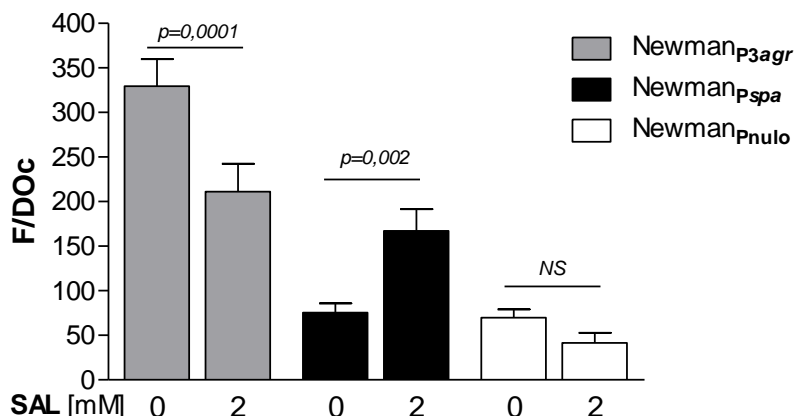


Figura 32. Actividad promotora *agr* y *spa* en bacterias de la biopelícula de la cepa Newman expuestas al SAL. Las biopelículas de las cepas Newman_{P3agr}, Newman_{Pspa} (Tabla 1) se crecieron por 24 hs en presencia o ausencia de SAL. Las actividades promotoras P3*agr* y *spa* se determinaron por fusión a GFP y medición de la emisión de fluorescencia (F) correspondiente a la proteína verde fluorescente. Los valores de F se relativizaron a la densidad del cultivo final (DO_c). Cada barra representa la media ± SEM de 6–8 pocillos de 3 a 4 experimentos independientes. La cepa Newman_{Pnulo} se usó como control negativo. Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos para las comparaciones representadas por una línea horizontal (Mann-Whitney test). NS (no significativo).

Estos resultados demuestran que el SAL disminuyó la transcripción del gen *agrA*, tanto en biopelículas maduras como inmaduras de la cepa Newman. La reducción en la transcripción del gen activador del sistema *agr*, conduciría a una disminución de los niveles de transcriptos *agrC*, *psma*₁₋₂, *psma*₃₋₄, *psm* β ₂ y RNAIII, así como también a una caída de la actividad promotora P3 *agr* y aumento de la del gen *spa* en biopelículas maduras. Además se puede sugerir que la baja cantidad de AgrA que se produciría en presencia del SAL no podría interaccionar correctamente con el ADN debido a la interferencia estérica que ejercería ésta señal.

3.3.3. Consecuencias en la dispersión por acción del SAL sobre *agr*.

Considerando que el sistema *agr* regula positivamente la expresión de proteasas extracelulares y que éstas participan en la etapa de dispersión de la biopelícula, se estudió el efecto del SAL sobre las proteasas liberadas al medio de cultivo de las biopelículas de *S. aureus*. Así, se determinó que la capacidad proteolítica de los sobrenadantes de las biopelículas de la cepa Newman disminuyó por la exposición al SAL, no observándose proteólisis por los sobrenadantes de la mutante *agr* deficiente (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad proteolítica de los sobrenadantes de biopelículas.

Sobrenadantes de biopelículas de 24 hs	Diámetro del halo de proteólisis (mm)
Newman	7,7±0,2
Newman + 2mM SAL	4,5±1,2
Newman <i>agr</i>	0

El sistema *agr* regula negativamente la expresión de adhesinas (por ej. Spa) requeridas para la adherencia a las superficies y para mantener el contacto intercelular de las bacterias en la biopelícula^{123 124}. Considerando que la actividad proteolítica disminuyó en las biopelículas tratadas con SAL (Tabla 4), se estudió el efecto de esta señal sobre el componente proteico de las matrices extracelulares. El tratamiento con proteinasa K disgregó el 63% y 32% de las biopelículas de las cepas Newman y CBS preformadas en presencia de SAL, respectivamente (Figura 33).

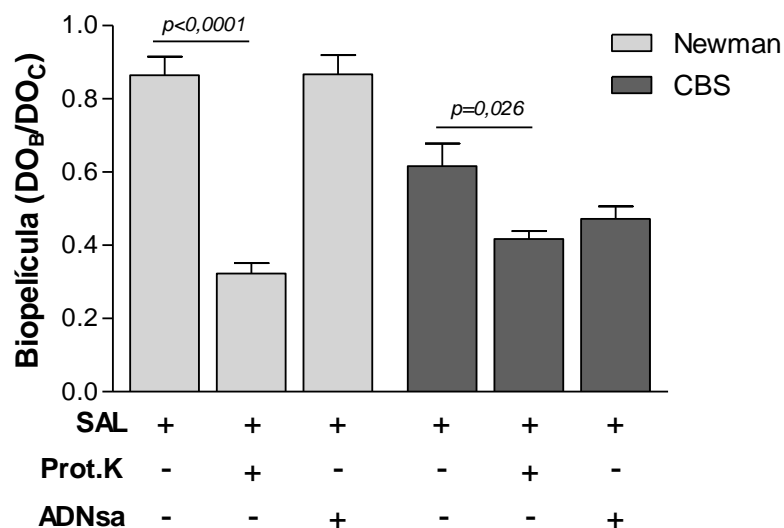


Figura 33. Tratamiento enzimático sobre la biopelícula de *S. aureus* expuesta al SAL. Las biopelículas de las cepas Newman y CBS formadas por 24 hs en TSBg en presencia de 2 mM de SAL, se trataron con 100 µg/ml de proteinasa K (Prot.K) o 140 U/ml ADNasa. Cada barra representa la media ± SEM de la biomasa de la biopelícula cuantificada luego del tratamiento enzimático, de 3 experimentos independientes. Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos para las comparaciones representadas por una línea horizontal (Mann-Whitney test).

Debido a la escasa actividad proteolítica en las biopelículas expuestas al SAL y al notorio constituyente proteico en sus matrices extracelulares, se analizaron los perfiles de proteínas de superficie de las biopelículas de la cepa Newman formadas en presencia de SAL (Figura 34). Se determinó que el SAL no modificó el patrón de bandas pero incrementó la expresión de algunas proteínas de superficie. Mediante espectrometría de masas MALDI-TOF se identificaron aquellas dos más notorias, las cuales correspondieron a las adhesinas Eap y Emp.

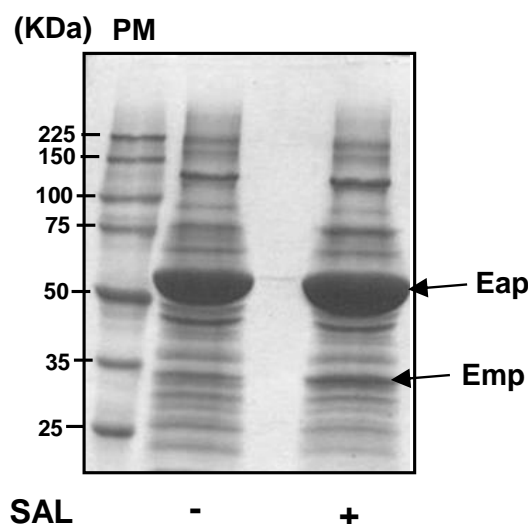


Figura 34. Efecto del SAL sobre la expresión de proteínas de superficie en biopelículas de *S. aureus*. SDS-PAGE de proteínas de superficie extraídas de biopelículas de 24 hs de la cepa Newman formadas en TSBg suplementado o no con 2 mM de SAL. Se sembraron cantidades iguales de extractos proteicos en cada calle. Las flechas indican los polipéptidos Eap y Emp identificados por MALDI-TOF. La calle de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular (PM).

El ADNe es otro componente de la matriz extracelular de las biopelículas de *S. aureus*. Debido a que el SAL indujo un aumento tanto en la producción del PIA como de proteínas, se estudió su efecto sobre la liberación de ADNe. La acción enzimática de la ADNasa no tuvo un efecto significativo sobre las biopelículas preformadas por las cepas Newman y CBS en ausencia o presencia del SAL (Figura 33).

El sistema *agr* ha sido involucrado en el proceso de autólisis en *S. aureus* como un regulador positivo¹²⁵. Por tal motivo y debido a que el SAL no indujo la liberación de ADNe en biopelículas de *S. aureus*, se analizó si el proceso de autólisis bacteriana es afectado por acción del SAL. Al respecto, se determinó en cultivos planctónicos que el SAL retrasó la capacidad autolítica mediada por Tritón X-100

tanto de la cepa Newman como de la cepa CBS (Figura 35A y B). Por su parte, la capacidad autolítica de la mutante Newman *agr* se observó disminuida respecto a la cepa parental, confirmando el rol positivo del sistema *agr* en la regulación de la autólisis en las condiciones de estudio (Figura 35C).

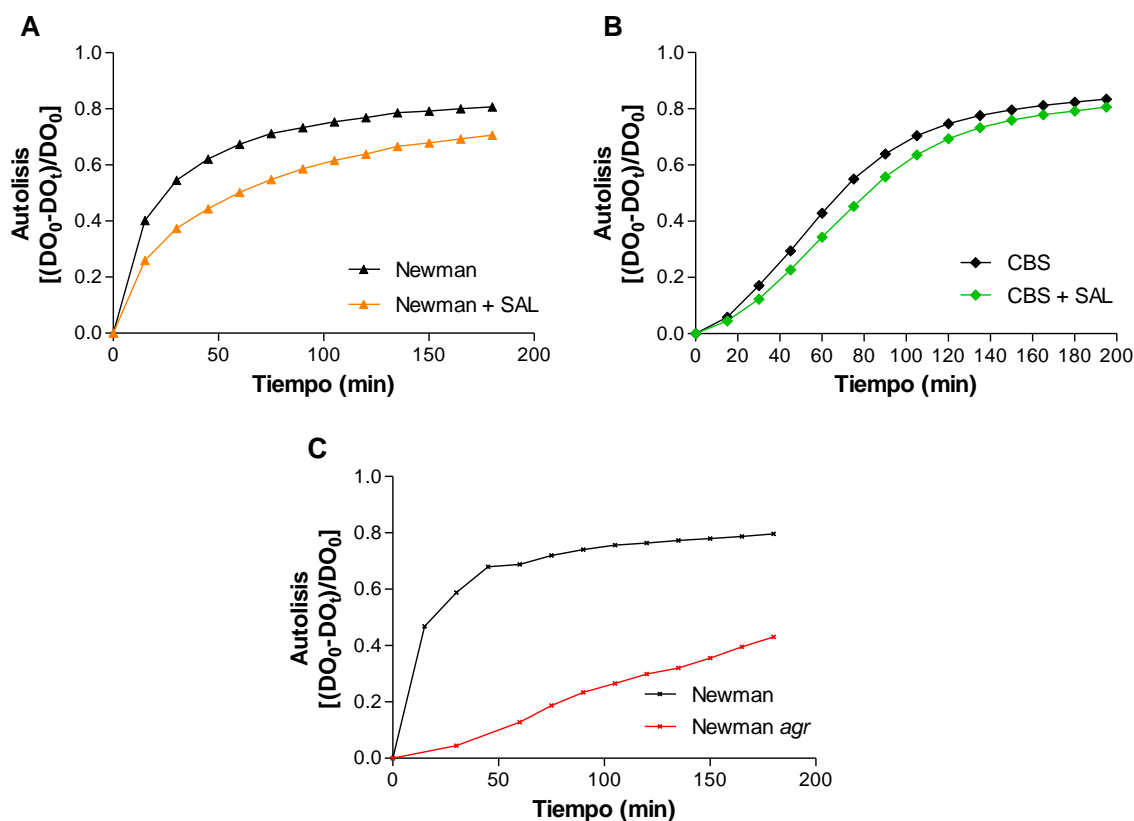


Figura 35. Autólisis mediada por Tritón X-100 de cultivos de *S. aureus* expuestos al SAL. Cultivos de las cepas (A) Newman, (B) CBS y (C) Newman *agr* se crecieron en TSBg en presencia o ausencia de 2 mM de SAL hasta fase exponencial tardía. La lisis bacteriana mediada por Tritón X-100 se monitoreó espectrofotométricamente midiendo la disminución de la DO_{600} a distintos tiempos. La autólisis se expresó como $[(DO_0 - DO_t)/DO_0]$, donde DO_0 corresponde a la densidad inicial y DO_t refiere a la densidad registrada a un tiempo particular. Los gráficos corresponden a un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

En conjunto, estos resultados sugieren que el SAL ejerce un efecto inhibitorio sobre el sistema *agr* y consecuentemente sobre la producción de moléculas implicadas en la disgregación de la biopelícula (proteasas extracelulares, surfactantes, entre otras) que conlleva a mantener la biomasa elevada por adhesinas de superficie.

Obj. 4. Determinar *in vivo* el efecto del SAL sobre *S. aureus*.

4.1. Efecto del SAL sobre la colonización nasal de *S. aureus* en ratón.

Debido a que el SAL indujo un aumento en la formación de biopelícula mediado por el aumento del PIA y de proteínas, generando un fenotipo más adherente, se analizó la influencia del SAL sobre la colonización nasal de la cepa Newman en ratones. Para ello, grupos de ratones CF-1 se inyectaron con 2 mM de SAL por vía intravenosa y posteriormente se inocularon con $1,6 \times 10^7$ UFC de la cepa Newman por vía intranasal. Luego, se extrajeron las narinas, y los homogenatos obtenidos se sembraron en placas de TSA para la posterior cuantificación de las UFC. De esta manera, se determinó una mayor recuperación bacteriana en las narinas de los ratones pre-tratados con SAL comparado con las UFC/narina registrada en los ratones control que recibieron PBS (Figura 36).

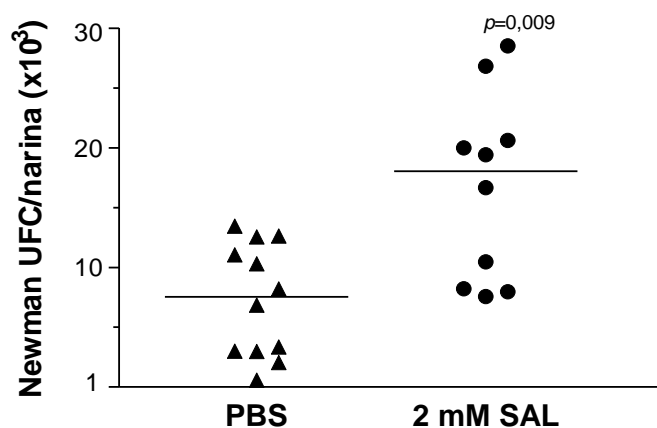


Figura 36. Efecto del SAL sobre la colonización nasal de *S. aureus*. Grupos de ratones CF-1 se inocularon por vía intravenosa con 2 mM de SAL o PBS, 30 min antes de la inoculación bacteriana ($1,6 \times 10^7$ UFC/narina) de la cepa Newman. El estado de colonización se determinó luego de la excisión nasal a las 4 hs. Cada punto representa un ratón individual. Las líneas horizontales representan el valor de la mediana (PBS: $7,5 \times 10^3$ UFC/narina; SAL: $1,8 \times 10^4$ UFC/narina). Las comparaciones entre grupos fue significativa ($p = 0,009$) (Mann-Whitney test).

La totalidad de los hallazgos sugieren que el SAL induce el aumento en la biomasa de las biopelículas formadas por cepas SAMS y SAMR mediante dos mecanismos. Al disminuir la biodisponibilidad de hierro, la actividad del ciclo TCA y la transcripción de *codY*, el SAL contribuye al incremento de la síntesis del PIA. En

el segundo mecanismo, disminuyendo la expresión del sistema *agr* y consecuentemente la actividad de proteasas extracelulares y surfactantes (PSMs y δ -hemolisina), lo que afectaría negativamente la etapa de dispersión de la biopelícula. Por lo tanto, si bien el SAL aumenta la biomasa de las biopelículas de *S. aureus*, podría evitar la dispersión de las bacterias de la biopelícula y consecuentemente la generación de nuevos focos de infección.

La generación de un fenotipo más adherente en presencia del SAL contribuiría con el aumento de la colonización de este patógeno en el hospedador.

Señal II: VAN y CIP en concentraciones bajas

Obj. 1. Determinar el efecto de las señales sobre la capacidad de *S. aureus* para formar biopelículas.

1.1. Formación de biopelículas por *S. aureus* en presencia de VAN o CIP.

Con el objetivo de estudiar el efecto de la VAN y la CIP en C_{sub} sobre la capacidad formadora de biopelículas de *S. aureus*, se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de ambos antibióticos para cada cepa en estudio mediante el método de dilución (Tabla 5). Posteriormente, se cuantificaron espectrofotométricamente las biomásas de las biopelículas formadas sobre una superficie de poliestireno en presencia o no de tales señales. Transcurridas 24 hs de incubación, se observó que la VAN indujo un aumento del 19% en la biopelícula de la cepa Newman mientras que la CIP provocó un incremento del 40%. Por otro lado, se determinó que ninguno de los antibióticos tuvo un efecto significativo sobre las biopelículas formadas por el aislamiento SAMR AR71 (Tabla 2). Además, dichas señales actuaron diferencialmente sobre la biopelícula de la cepa VISA Mu50 (Tabla 1), no afectando su formación en el caso de la VAN y disminuyéndola en un 20% en el caso de CIP en C_{sub} (Figura 37).

Tabla 5. CIM y C_{sub} de CIP y VAN para las cepas Newman, AR71 y Mu50.

Cepa	CIP ($\mu\text{g/ml}$)		VAN ($\mu\text{g/ml}$)	
	CIM	C_{sub}	CIM	C_{sub}
Newman	0,12	0,06	1,2	0,6
AR71	0,5	0,25	1	0,5
Mu50	8	4	8	2,5

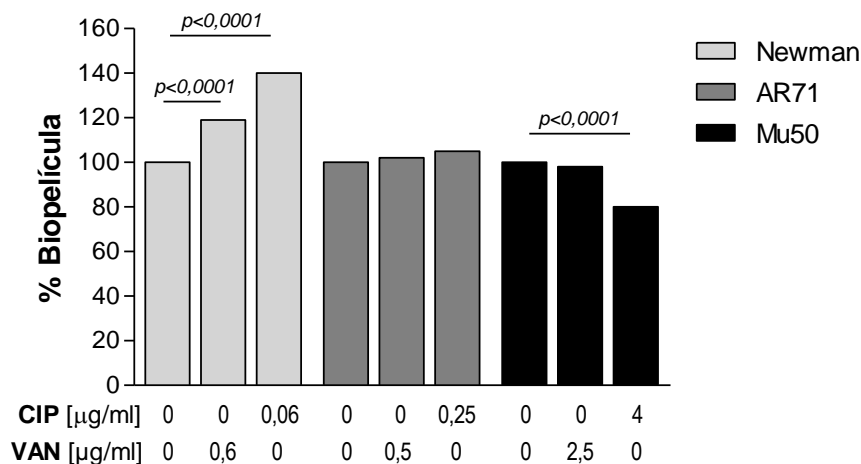


Figura 37. Efecto de Csub de CIP y VAN sobre la biopelícula de *S. aureus*. Las biopelículas se formaron en TSBg por 24 hs en presencia o ausencia de Csub de VAN o CIP (Tabla 5). Cada barra representa el porcentaje de biopelícula formado respecto a la condición control (considerada el 100%), de 3 experimentos independientes. Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos para las comparaciones representadas por una línea horizontal (Mann-Whitney test).

Los resultados indican que ambas señales afectaron la formación de la biopelícula en forma cepa dependiente, determinándose una inducción de la misma mediada por ambos antibióticos en la cepa Newman. No se observaron cambios significativos en la producción de biopelícula en presencia de VAN o CIP en la cepa SAMR (AR71), mientras que en el caso de la cepa VISA (Mu50), la CIP actuó como un inductor de la formación de biopelícula y la VAN no tuvo efecto alguno.

Obj. 2. Establecer el impacto de las señales sobre los constituyentes de la matriz extracelular de las biopelículas de *S. aureus*.

2.1. Influencia de VAN y CIP sobre la composición de la matriz extracelular de biopelículas.

Debido a que ambos antibióticos aumentaron la biomasa de la biopelícula formada por la cepa Newman, se analizó la naturaleza de los componentes de las matrices extracelulares. Para ello, las biopelículas preformadas en presencia o no de Csub de VAN, se trataron con proteinasa K, ADNasa o NaIO_4 , con el fin de determinar el aporte proteico, del ADNe y de los polisacáridos, respectivamente, a la constitución de la matriz extracelular. Luego de cuantificar las biomásas, se evidenció que los tratamientos con proteinasa K y ADNasa promovieron la disgregación de las biopelículas inducidas por Csub de VAN (58% y 45%, respectivamente), mientras que el tratamiento con NaIO_4 no tuvo efecto alguno

(Figura 38). A fin de profundizar en el estudio de los constituyentes de la matriz extracelular, se utilizó la mutante Newman *ica*, la cual no puede sintetizar PIA (Figura 23). Dicha mutante, incrementó la biopelícula un 28% en presencia de Csub de VAN sugiriendo que el aumento de la biomasa inducido por este antibiótico tendría una composición polisacarídica escasa o nula. El tratamiento de estas biopelículas con proteinasa K, disminuyó el 66% de la biomasa, indicando que las proteínas son el componente mayoritario de las matrices extracelulares formadas bajo las condiciones en estudio.

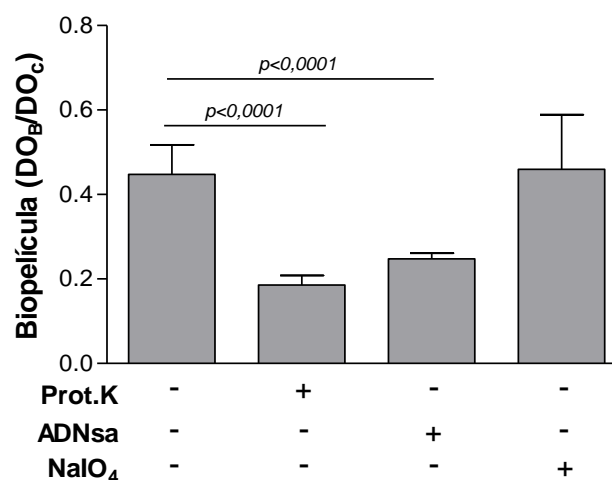


Figura 38. Efecto de la proteinasa K, la ADNasa y NaIO₄ sobre la biopelícula de *S. aureus* formada con VAN. Las biopelículas de las cepa Newman formadas por 24 hs en TSBg en presencia de 0,6 µg/ml de VAN, se trataron con 100 µg/ml de proteinasa K (Prot.K) o 140 U/ml ADNasa o 20 mM de NaIO₄. Cada barra representa la media ± SEM de la biomasa de la biopelícula cuantificada luego del tratamiento, de 3 experimentos independientes. Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos para las comparaciones representadas por una línea horizontal (Mann-Whitney test).

Por su parte, el tratamiento con proteinasa K de la biopelícula de la cepa Newman preformada en presencia de CIP, logró disminuir la biomasa en un 47%. Similarmente, la CIP en Csub indujo la formación de biopelícula en un 68% en la cepa mutante Newman *ica* y el tratamiento de la misma con proteinasa K logró un 75% de reducción de la biomasa. Más aún, mediante PCR de tiempo real se determinó que la CIP incrementó aproximadamente 4 veces la transcripción del gen *icaR* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: $4,62 \pm 0,08$), el cual codifica para el represor del operón *ica*. Sin embargo, no afectó los niveles de transcritos *icaA* significativamente en biopelículas de la cepa Newman (Figura 39).

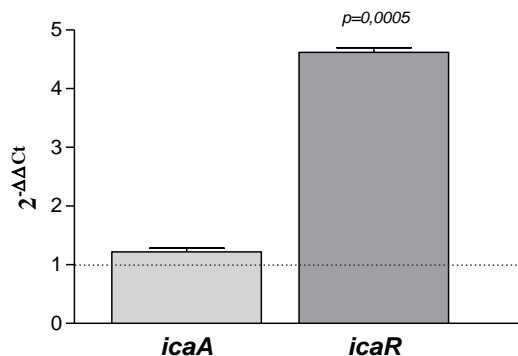


Figura 39. Efecto de Csub de CIP sobre la transcripción de *icaA* e *icaR* en biopelículas. Mediante qRT-PCR se cuantificaron los transcritos de biopelículas maduras (24 hs) de la cepa Newman formadas en presencia de 0,06 $\mu\text{g/ml}$ de CIP. Los cambios en la expresión génica se mostraron como las veces de cambio ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$). Los datos se relativizaron a los niveles de expresión del gen *gyrB*. Cada barra representa la media \pm SEM de mediciones por duplicado de 3 experimentos independientes. El valor de $p < 0,05$ indica la significancia estadística (*t* test).

Teniendo en cuenta que tanto la VAN como la CIP indujeron una biomasa de naturaleza proteica, se estudió el nivel de transcritos correspondientes a distintas proteínas de superficie mediante PCR de tiempo real. De este modo, se determinó que el tratamiento con Csub de VAN aumentó significativamente los niveles de los transcritos *eap*, *emp* y *sdrC* en las biopelículas de *S. aureus*. En cambio, el tratamiento con VAN no provocó cambios en la cantidad de transcritos de *clfA* y *fnbA* (Figura 40). Por su parte, la CIP indujo un incremento de 27 veces la transcripción del gen *sdrC* ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$: $27,21 \pm 1,13$), pero no generó cambios en los niveles de transcritos *eap*.

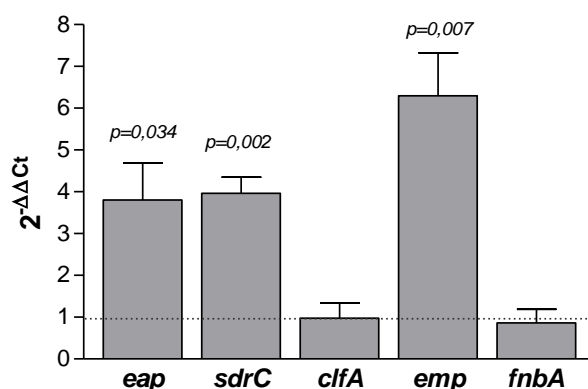


Figura 40. Efecto de Csub de VAN sobre la transcripción de genes de adhesinas en biopelículas. Mediante qRT-PCR se cuantificaron los transcritos *eap*, *sdrC*, *clfA*, *emp* y *fnbA* de biopelículas maduras (24 hs) de la cepa Newman formadas en presencia de 0,6 $\mu\text{g/ml}$ de VAN. Los cambios en la expresión génica se mostraron como las veces de cambio ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$). Los datos se relativizaron a los niveles de expresión del gen *gyrB*. Cada barra representa la media \pm SEM de mediciones por duplicado de 3 experimentos independientes. El valor de $p < 0,05$ indica la significancia estadística (*t* test).

Posteriormente, se analizaron los perfiles de proteínas de superficie extraídas de las biopelículas inmaduras (6 hs) y maduras (24 hs) de la cepa Newman formadas en presencia o no de Csub de VAN. Mediante SDS-PAGE, se observó una mayor cantidad de bandas correspondientes a proteínas de superficie expresadas en las biopelículas inmaduras comparada con aquellas de las biopelículas maduras independientemente de la presencia de la señal (Figura 41). Por cierto, la VAN indujo la expresión de una proteína de aproximadamente 60 kDa en las biopelículas maduras. Posteriormente, se determinó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, que la banda aumentada en intensidad correspondió a la proteína Eap. No se observaron diferencias inducidas por Csub de VAN en la expresión de proteínas de superficie en biopelículas inmaduras (Figura 41).

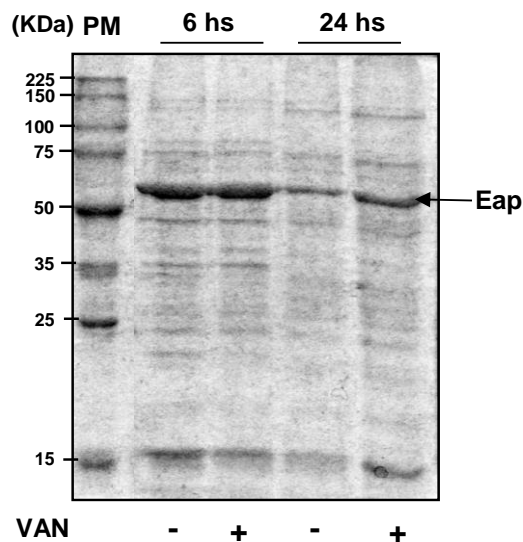


Figura 41. Efecto de Csub de VAN sobre la expresión de proteínas de superficie en biopelículas de *S. aureus*. SDS-PAGE de proteínas de superficie extraídas de biopelículas de 6 y 24 hs de la cepa Newman formadas en TSBg suplementado o no con 0,6 µg/ml de VAN. En cada calle se sembraron cantidades iguales de extractos proteicos. La flecha indica el polipéptido Eap identificado por MALDI-TOF. La calle de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular (PM).

La proteína Eap ha sido propuesta como necesaria para la formación de biopelícula por *S. aureus*^{37 126}. Por lo tanto se estudió la participación de dicha adhesina en la formación de biopelícula de *S. aureus* en presencia de Csub de VAN. Espectrofotométricamente se determinó la presencia del antibiótico no indujo un aumento en la formación de biopelícula (Newman *eap*: 2,76±0,07 vs Newman *eap*+VAN: 2,32±0,08; NS) en las condiciones experimentales ensayadas.

Por lo tanto, ambos antibióticos incrementaron la producción de la biopelícula en la cepa Newman, principalmente por mecanismos *ica*-independientes que involucran el aumento de proteínas en la matriz extracelular. Particularmente, la adhesina Eap estaría involucrada en el incremento de la biopelícula mediado por Csub de VAN. Por su parte, el incremento transcripcional del gen *sdrC* mediado por Csub de CIP, permitiría sugerir que la adhesina SdrC contribuye con el aumento de la biopelícula inducido por dicha señal.

Obj. 3. Evaluar las consecuencias de la acción de las señales en las células bacterianas que integran la biopelícula, con principal atención en los cambios regulatorios y metabólicos.

3.1. Efecto de Csub de VAN y CIP sobre los reguladores Sae y MgrA.

El sistema de transducción de señales de dos componentes SaeRS responde a señales sensadas en el microambiente que rodea a las bacterias controlando positivamente la expresión de numerosas proteínas involucradas en el proceso de formación de la biopelícula, como la adhesina Eap^{66 127}. Por lo tanto, se investigó el impacto de las señales VAN o CIP sobre el regulador *sae*. Para ello, se cuantificó fluorométricamente la actividad del promotor principal (P_C) de *sae* en las biopelículas maduras crecidas en presencia o no de Csub de VAN. El antibiótico aumentó la actividad promotora de *sae* significativamente (Figura 42).

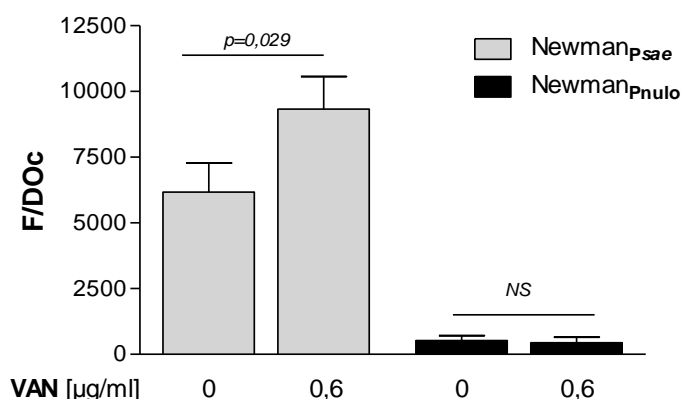


Figura 42. Actividad promotora *sae* en bacterias de la biopelícula expuestas a Csub de VAN. La biopelícula de la cepa Newman_{P_{sae}} (Tabla 1) se creció por 24 hs en TSBg en presencia o no de 0,6 µg/ml de VAN. La actividad promotora P_{sae} se determinó por fusión a GFP y medición de la emisión de fluorescencia (F) correspondiente a la proteína verde fluorescente. Los valores de F se relativizaron a la densidad del cultivo final (DO_C). Cada barra representa la media \pm SEM de 6–8 pocillos de 3 a 4 experimentos independientes. La cepa Newman_{P_{nulo}} se usó como control negativo. Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos para las comparaciones representadas por una línea horizontal, NS (no significativo) (Mann-Whitney test).

Para profundizar el estudio, se cuantificaron los niveles de transcriptos *sae* en biopelículas maduras de la cepa Newman tratadas o no con Csub de VAN. La presencia de VAN durante la formación de biopelícula en la cepa Newman indujo un aumento en la transcripción de *sae* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: $2,17\pm 0,79$). Al estudiar el efecto de la CIP sobre la transcripción de *sae*, se determinó que dicha señal incrementó su nivel transcripcional en la biopelícula de la cepa Newman ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: $3,91\pm 0,09$), siendo dicho aumento mayor al ocasionado por VAN. Así mismo, la CIP en Csub incrementó la transcripción de *sae* ($3,58\pm 0,99$) en cultivos planctónicos de la misma cepa. Debido a que *sae* controla negativamente la expresión del PC, se analizó la actividad del promotor *cap* de las bacterias crecidas en modo de vida planctónico en presencia de Csub de CIP. Así, se determinó que la señal indujo una disminución de la actividad promotora *cap* (Figura 43A). Por otro lado, mediante el ensayo de inmunodifusión doble utilizando un antisuero enriquecido con anticuerpos anti-PC5, se estableció que el tratamiento con CIP disminuyó la producción del PC en la cepa Newman (Figura 43B).

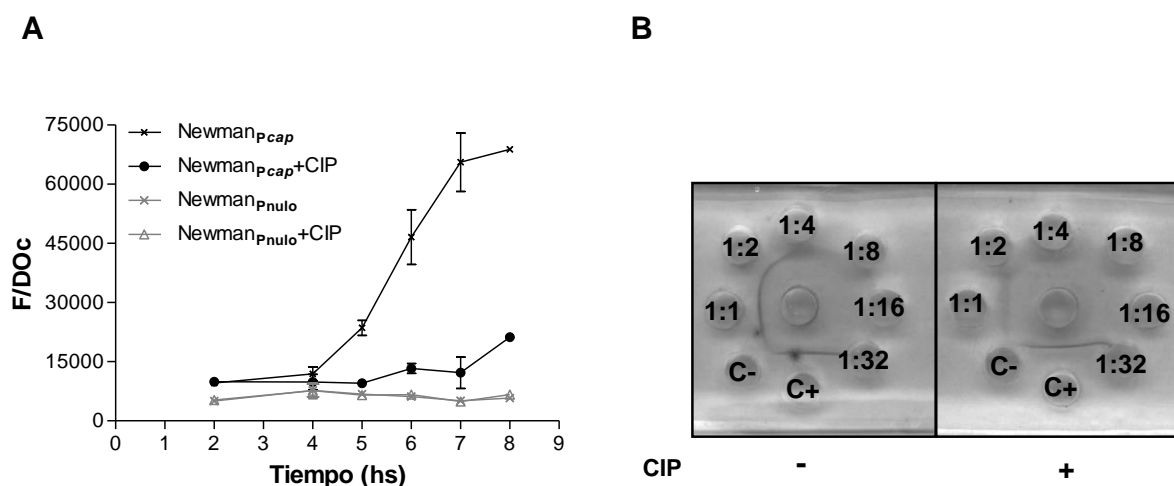


Figura 43. Efecto de Csub de CIP sobre la expresión del PC en cultivos de *S. aureus*. (A) La actividad promotora *cap* se determinó en cultivos planctónicos de la cepa Newman_{Pcap} (Tabla 1) expuestos o no a 0,06 $\mu\text{g/ml}$ de CIP. La actividad promotora *Pcap* se determinó por fusión a GFP y medición de la emisión de fluorescencia (F) correspondiente a la proteína verde fluorescente en función del tiempo. Los valores de F se relativizaron a la densidad del cultivo final (DO_c). La cepa Newman_{Pnulo} se usó como control negativo. (B) La expresión de PC5 se determinó mediante inmunoprecipitación doble de diluciones seriadas de los extractos capsulares de la cepa Newman previamente incubada o no con 0,06 $\mu\text{g/ml}$ de CIP. El antisuero se sembró en el pocillo central. Controles: C+: Extracto capsular de la cepa Reynolds PC5+; C-: Extracto capsular de la cepa Reynolds PC5-. Para ambos ensayos se realizaron 3 experimentos independientes.

También, la CIP en Csub indujo la expresión de algunas proteínas de superficie en los cultivos planctónicos (Figura 44).

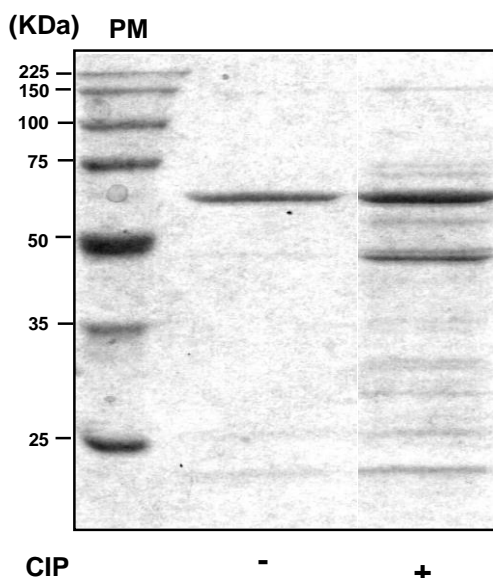


Figura 44. Efecto de Csub de CIP sobre la expresión de proteínas de superficie en cultivos de *S. aureus*. SDS-PAGE de proteínas de superficie extraídas de cultivos planctónicos de la cepa Newman crecidos hasta fase post-exponencial en TSBg suplementado o no con 0,06 µg/ml de CIP. En cada calle se sembraron cantidades iguales de extractos proteicos. La calle de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular (PM).

Por lo tanto, ambos antibióticos incrementaron la transcripción de *sae* en biopelículas de la cepa Newman, lo que podría contribuir con el aumento de la formación de biopelícula por un mecanismo *ica*-independiente.

Diversas proteínas de superficie son reguladas negativamente por el factor transcripcional MgrA por lo que se lo ha considerado como un regulador negativo de la formación de biopelículas dependiente de proteínas en *S. aureus*⁷⁹. Por tal motivo se estudió el efecto que tiene la VAN en Csub sobre la biopelícula formada por la mutante Newman *mgrA*. En concordancia a lo descrito por otros autores, la mutante *mgrA* produjo una biopelícula aumentada respecto a la observada en la cepa parental (Figura 45). Interesantemente, la VAN indujo una disminución significativa de la biopelícula formada por la mutante *mgrA* (Figura 45).

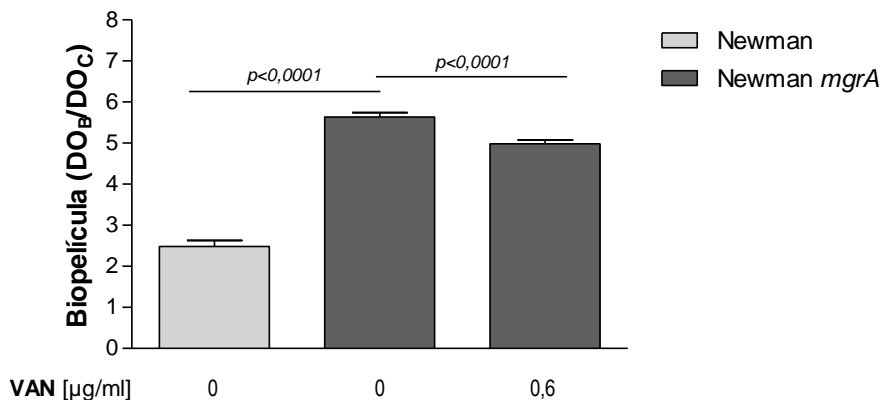


Figura 45. Efecto de Csub de VAN sobre la formación de biopelícula en la cepa Newman *mgrA*. Las biopelículas de la cepa Newman y su mutante isogénica *mgrA* se crecieron por 24 hs en presencia o no de 0,6 µg/ml de VAN. Cada barra representa la media \pm SEM de 6–8 pocillos de 3 a 4 experimentos independientes. Valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos para las comparaciones representadas por una línea horizontal (Mann-Whitney test).

Debido a que el efecto inductor de la VAN sobre la biopelícula de la cepa Newman no se observó en su mutante *mgrA*, se cuantificaron los transcritos correspondientes a ciertas adhesinas en biopelículas de la cepa mutante. Así, se determinó que la VAN incrementó significativamente los niveles de los transcritos *sdrC*, mientras que no se observaron cambios significativos en los de *eap*, *emp*, *clfA* y *fnbA* en biopelículas maduras de la mutante *mgrA* (Figura 46). Sin embargo, los niveles transcripcionales observados en la mutante fueron menores que los encontrados en la cepa salvaje (Figura 40).

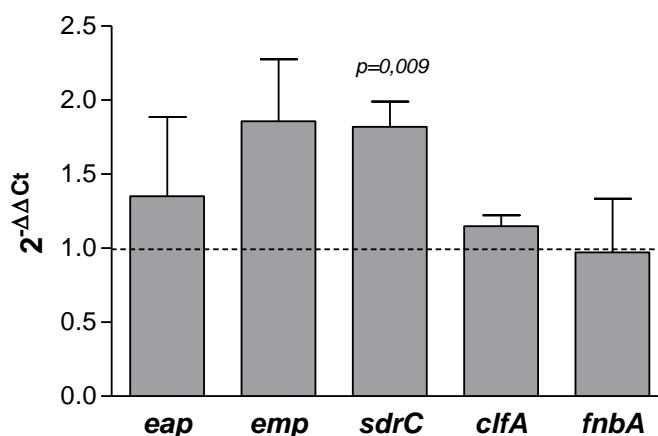


Figura 46. Efecto de Csub de VAN sobre la transcripción de genes de adhesinas en biopelículas de la mutante Newman *mgrA*. Mediante qRT-PCR se cuantificaron los transcritos *eap*, *emp*, *sdrC*, *clfA* y *fnbA* de biopelículas maduras (24 hs) de la mutante Newman *mgrA* formadas en presencia o no de 0,6 µg/ml de VAN. Los cambios en la expresión génica se mostraron como las veces de cambio ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Los datos se relativizaron a los niveles de expresión del gen *gyrB*. Cada barra representa la media \pm SEM de mediciones por duplicado de 3 experimentos independientes. El valor de $p < 0,05$ indica la significancia estadística (*t* test).

Posteriormente, se extrajeron proteínas de superficie de las biopelículas maduras de la mutante *mgrA* y se analizaron los patrones de bandas obtenidos por SDS-PAGE. Así, se determinó que las biopelículas maduras de la mutante *mgrA* expresaron mayor cantidad de bandas respecto a la cepa parental y a diferencia de lo observado en esta última, la VAN en Csub no indujo un aumento en la expresión de las proteínas de superficie (Figura 47). Más aún, el antibiótico causó una leve disminución en la expresión de Eap. Cabe destacar que a diferencia de lo observado en la cepa parental, la falta de inducción de transcritos *eap* y de la expresión de Eap en la biopelícula de la mutante *mgrA* formada con VAN, sugieren que la inducción de Eap mediado por dicha señal ocurriría a través de un efecto negativo sobre el regulador MgrA, el cual estaría reprimiendo su expresión. Al respecto, los niveles de transcritos *eap* se encontraron incrementados en la mutante Newman *mgrA* respecto a la cepa Newman ($6,22 \pm 1,89$).

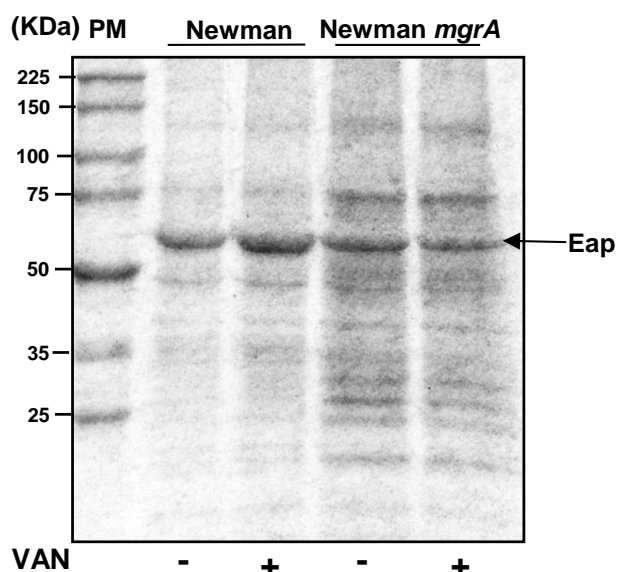


Figura 47. Efecto de Csub de VAN sobre la expresión de proteínas de superficie en biopelículas de la mutante Newman *mgrA*. SDS-PAGE de proteínas de superficie extraídas de biopelículas de 24 hs de la mutante Newman *mgrA* formadas en TSBg suplementado o no con 0,6 µg/ml de VAN. En cada calle se sembraron cantidades iguales de extractos proteicos. La flecha indica el polipéptido Eap identificado por MALDI-TOF. La calle de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular (PM).

Teniendo en cuenta que la VAN indujo un aumento en la producción de biopelícula dependiente también de ADNe en la cepa Newman y que bajas concentraciones de VAN afectan la lisis de *S. aureus* inducida por Tritón X-100¹²⁸,

se estudió el efecto de Csub de VAN sobre la capacidad autolítica de la cepa Newman y sus mutantes Newman *sae* y *mgrA*. En ausencia de señal, la mutante Newman *sae* presentó una capacidad autolítica aumentada respecto a la cepa parental, mientras que en la mutante Newman *mgrA* se observó una disminución de la autólisis comparada a aquella de la cepa salvaje (Figura 48). Estos resultados indican un rol negativo de Sae y positivo de MgrA sobre la capacidad autolítica de la cepa Newman. Por otra parte, la presencia del antibiótico provocó una disminución de la autólisis de la cepa Newman. Además, la capacidad autolítica de la mutante Newman *mgrA* no se observó alterada por Csub de VAN, mientras que dicho antibiótico generó un leve retraso en la autólisis de la mutante *sae* (Figura 48).

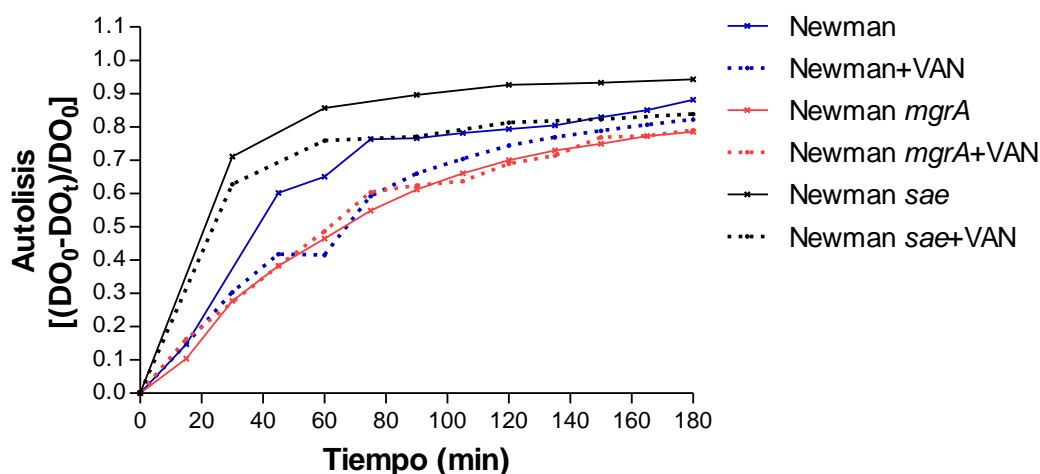


Figura 48. Autólisis mediada por Tritón X-100 de cultivos de *S. aureus* expuestos a VAN. Cultivos de la cepa Newman y sus mutantes Newman *mgrA* y Newman *sae* se crecieron en TSBg con o sin 0,6 $\mu\text{g/ml}$ de VAN hasta fase exponencial tardía. La lisis bacteriana mediada por Tritón X-100 se monitoreó espectrofotométricamente midiendo la disminución de la DO_{600} a distintos tiempos. La autólisis se expresó como $[(\text{DO}_0 - \text{DO}_t)/\text{DO}_0]$, donde DO_0 corresponde a la densidad inicial y DO_t refiere a la densidad registrada a un tiempo particular. Los gráficos corresponden a un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que los reguladores MgrA y Sae afectaron en forma positiva y negativa, respectivamente, la autólisis de *S. aureus*. La presencia de VAN en Csub retrasó la capacidad autolítica de la cepa Newman así como también la de su mutante *sae*. Sin embargo, el antibiótico no afectó la capacidad autolítica de la mutante *mgrA*. Estos resultados sugerirían que la disminución de la autólisis mediada por VAN en la cepa salvaje, podría deberse a un efecto negativo del antibiótico sobre el regulador MgrA y a la activación de *sae*. Además, la VAN indujo un menor incremento transcripcional de adhesinas en la

mutante *mgrA* respecto a la cepa parental y sólo aumentó la expresión de proteínas de superficie en la cepa Newman. En particular, el incremento en la expresión de Eap mediado por VAN en la cepa salvaje, involucra un efecto negativo del antibiótico sobre MgrA.

Los principales hallazgos de esta tesis doctoral en cuanto al efecto de las diferentes señales microambientales sobre la biopelícula de *S. aureus*, se resumen en las Figuras 49 y 50. En la Figura 49 se representa una visión comparativa entre los efectos de las tres señales estudiadas sobre la biomasa y los constituyentes de la matriz extracelular de las biopelículas de *S. aureus*. En la misma se muestra el incremento del 125% de la biopelícula de la cepa Newman mediado por SAL respecto a la condición control. Esta inducción implicó principalmente un aumento de 3,5 y de 2,8 veces en el contenido de PIA y de proteínas en la matriz extracelular, respectivamente. Por otro lado, la VAN y la CIP en Csub indujeron el aumento de la biopelícula en un 19% y 40%, respectivamente, comparativo a la condición control. Así, se establecieron incrementos de 1,3 y 1,24 veces en la producción de proteínas en la matriz de la biopelícula mediados por VAN y CIP, respectivamente. En particular, la VAN también indujo un importante incremento (6,4 veces) del ADNe en la matriz de la biopelícula.

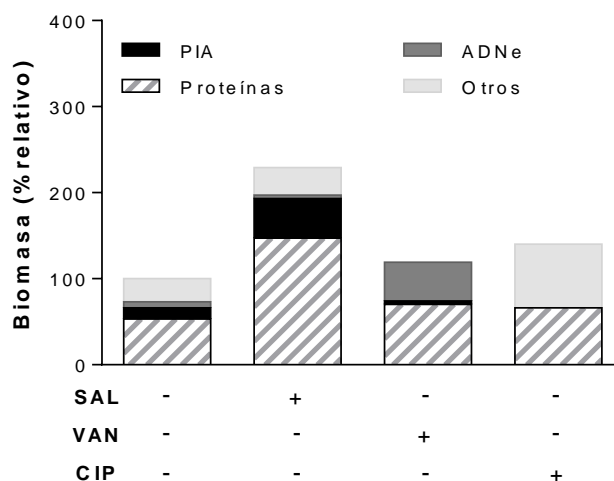


Figura 49. Comparación del efecto de las diferentes señales sobre la biopelícula y los componentes de la matriz extracelular en la cepa Newman. Se compara la fuerza inductora de cada señal estudiada, sobre la formación de la biopelícula en la cepa Newman, así como también, el aporte de los diferentes constituyentes de la matriz extracelular. Cada barra representa el porcentaje de biomasa formado relativo a la condición sin tratamiento (100%). En cada grupo experimental, el porcentaje de los componentes de la matriz extracelular se calculó considerando los valores de biomasa disgregada luego de los tratamientos con proteinasa K, ADNasa o NaIO_4 y relativos a la biomasa inducida por cada señal.

En la Figura 50 se representan en forma esquemática los mecanismos involucrados en el incremento de la biopelícula formada por la cepa Newman por acción de las tres señales estudiadas. Entre ellos cabe destacar, el atrapamiento de Fe^{2+} por parte del SAL y la consecuente redirección metabólica y regulación negativa sobre *codY* que conducen al aumento de la síntesis del PIA. También, la acción negativa del SAL sobre el sistema *agr* y la dispersión de la biopelícula. Por su parte, el incremento de la formación de la biopelícula mediado por los antibióticos, tuvo implicancias regulatorias. Tanto la VAN como la CIP indujeron la transcripción de *sae* y la VAN afectó negativamente al regulador MgrA. Ambos procesos contribuyeron con el incremento de la producción de adhesinas y condujeron al aumento de la formación de biopelícula por mecanismos *ica*-independientes.

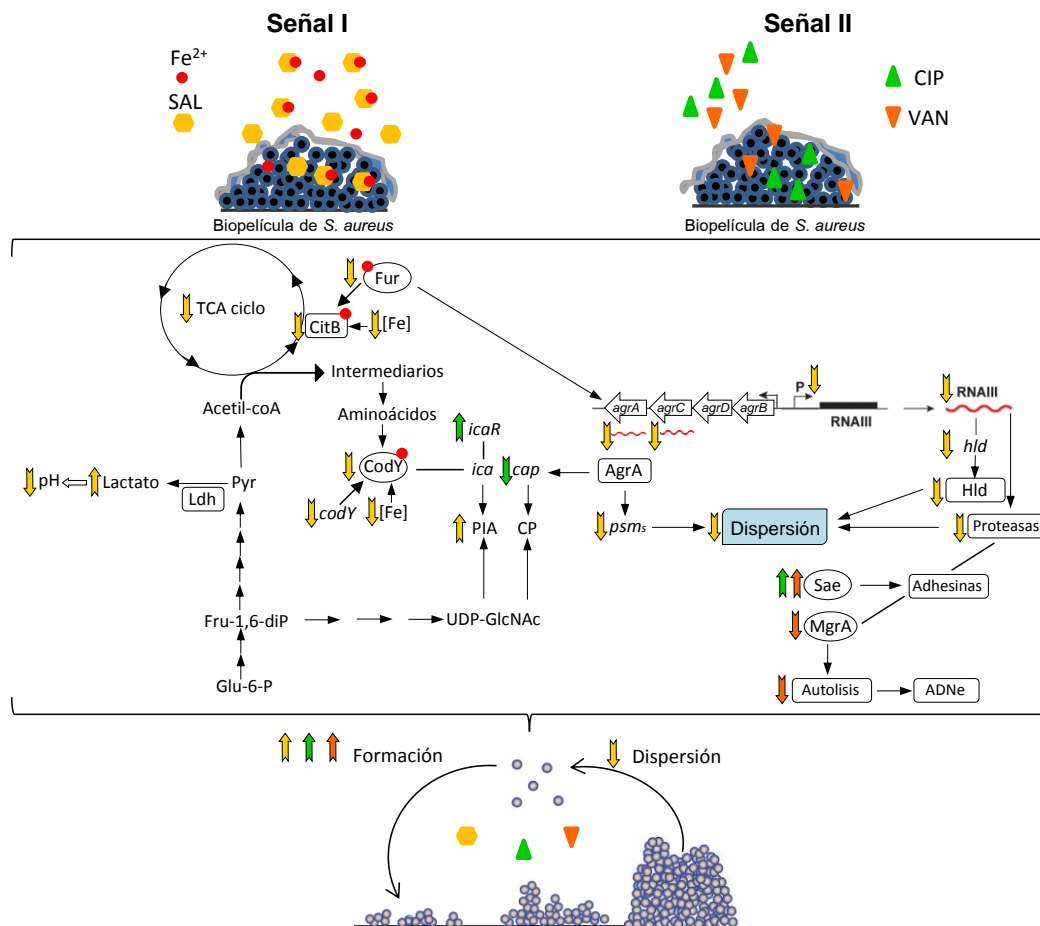


Figura 50. Representación esquemática de los efectos de las señales estudiadas sobre la biopelícula de *S. aureus*. Resumen de los cambios determinados a nivel transcripcional, bioquímico y fenotípico. Los círculos rojos, los hexágonos amarillos, los triángulos verdes y anaranjados indican Fe^{2+} , SAL, CIP y VAN, respectivamente. Las flechas hacia arriba y hacia abajo representan un efecto positivo y negativo, respectivamente, mediado por la señal. El color de las flechas correlaciona con aquel representativo de la señal.

Señal I: SAL.

Millones de individuos en el mundo entero, consumen aspirina para reducir el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares. Una vez ingerida, la aspirina se convierte rápidamente en SAL, que es el metabolito responsable de las propiedades analgésicas, antitrombóticas y antiinflamatorias ¹²⁹. Además, el SAL se encuentra presente en las plantas debido a que es una hormona vegetal que cumple un importante rol en la inmunidad de las mismas. Más aún, los niveles de SAL en suero de pacientes con una dieta vegetariana estricta pueden alcanzar valores similares a los de personas que consumen aspirina ⁵⁹. Varios efectos son ejercidos por el SAL sobre las plantas, humanos y bacterias. Al respecto, el SAL afectó la expresión de factores de virulencia bacterianos ⁶⁰. Una peculiaridad de ésta pequeña molécula es que posee la capacidad de formar complejos con iones de hierro en solución acuosa ^{113 114}. Al ser un ácido débil puede atravesar la membrana por lo que podría quelar el hierro intracelular. Los diversos mecanismos captadores de hierro que posee *S. aureus* y la importancia de la expresión de genes regulados por hierro en la patogénesis, evidencian la esencialidad de este micronutriente. En el presente trabajo, se demostró que el SAL disminuyó los niveles de hierro tanto en el medio de cultivo como en el interior de las células bacterianas que conforman la biopelícula. Como consecuencia de la disminución en la biodisponibilidad de hierro, *S. aureus* incrementó la biomasa de las biopelículas a través de un mecanismo PIA-dependiente. Más aún, el SAL disminuyó los niveles transcripcionales del gen *codY*, el cual regula negativamente el locus *ica*, en las bacterias asociadas a la biopelícula. Asimismo, el SAL redujo la transcripción del sistema *agr* (*agrA*, *agrC* y *RNAIII*) frenando la dispersión de las bacterias que escapan de la biopelícula. De este modo, el SAL promovió el aumento de la biopelícula de *S. aureus* al evitar que las bacterias se liberen de la comunidad embebida en una matriz extracelular con mayor contenido de PIA (por la acción quelante del SAL) y con proteínas que no pudieron ser degradadas por la baja actividad proteolítica y surfactante.

Existen reportes contradictorios respecto a la relación del hierro y la formación de biopelículas en diferentes especies. Al respecto, la exposición al hierro estimuló la producción de la biopelícula en *E. coli* ¹³⁰ y *P. aeruginosa* ¹³¹. La liberación de SAL a partir de películas poliméricas inhibió la formación de biopelículas en *E. coli* y *P. aeruginosa* ¹³². Aunque el mecanismo responsable de esta inhibición no fue

investigado por los autores, se podría especular que la acción quelante del SAL estaría involucrada. Por otro lado, distintos agentes quelantes de hierro inhibieron la formación de biopelícula en *S. aureus* mediante la interferencia de las fuerzas iónicas atractivas establecidas entre los diferentes componentes de la matriz extracelular^{133 134}. La exposición de una cepa de *S. aureus*, defectiva en el gen *rsbU*, a diferentes compuestos con grupos sulfhidrilos disminuyó la formación de biopelícula al limitar la producción del PIA probablemente por intervenciones metabólicas¹³⁵. Más aún, el SAL redujo la producción de biopelículas en estafilococos por mecanismos no bien entendidos¹³⁶. En el presente estudio, el incremento de la biomasa y del espesor máximo de las biopelículas formadas en presencia de SAL, se detectó mediante el análisis de las imágenes obtenidas por CLSM y medición espectrofotométrica. Además, el agregado de hierro al medio de cultivo durante la formación de la biopelícula revirtió dichos parámetros hacia valores similares a los del control. Nuestros hallazgos son consistentes con los de Johnson y col. (2005) quienes reportaron que la producción de biopelícula en *S. aureus* se indujo bajo condiciones privadas de hierro¹³⁷. Sin embargo, estos autores no observaron un incremento significativo del PIA en tales condiciones. Estas discrepancias podrían ser debidas a los distintos niveles de hierro presentes en los medios de cultivo utilizados para formar las biopelículas. Los autores utilizaron el medio de cultivo mínimo RPMI tratado con la resina Chelex-100 (por lo que no contiene hierro) para formar las biopelículas de *S. aureus* y en este trabajo se utilizó el medio TSBg (el cual contiene 39,3 μM de hierro basal) suplementado con 2 mM de SAL que reduce aproximadamente el 23% de la concentración de hierro. Las bacterias dentro de la biopelícula responden al hierro en un rango menor que las bacterias en estado de vida planctónico⁸⁵. Por lo tanto, el SAL representaría un factor de estrés ambiental para las bacterias al actuar modificando los niveles de hierro y contribuir así al incremento de la biomasa de las biopelículas por aumento de la producción del PIA. Señales externas como el NaCl y el etanol adicionados al medio de cultivo también activaron al operón *ica* en estafilococos¹³⁸.

En el presente trabajo, una concentración relativamente alta (2 mM) de SAL fue elegida teniendo en cuenta que es una concentración terapéutica de aspirina para tratar enfermedades inflamatorias¹³⁹. Por cierto, la inducción de la formación de la biopelícula se observó también en cepas SAMR y SAMS crecidas con 0,36 mM de SAL, una concentración similar a la encontrada en el suero de individuos tratados

diariamente con bajas dosis de aspirina para prevenir trombosis (ver Figura 6). Puede especularse que en el sitio de infección, la presencia del SAL en los fluidos biológicos podría contribuir a crear microambientes más restringidos en hierro libre forzando a *S. aureus* a competir con el hospedador por este nutriente esencial. Como una evidencia parcial de este hecho, se demostró aquí que *S. aureus* crecido en presencia del SAL provocó la liberación del hierro unido a la transferrina humana al disminuir el pH a través de un incremento en la producción de lactato por las bacterias que forman las biopelículas. El crecimiento de la cepa Newman en presencia del SAL redujo el pH del medio de cultivo a valores menores a 5,4 los cuales favorecen la adquisición de hierro por *S. aureus*¹⁴⁰. Es importante destacar que distintas cepas de *S. aureus* podrían responder diferencialmente a la disponibilidad de hierro. Al respecto, la producción de biopelículas por varias cepas relacionadas a los linajes CC8/USA300 o CC5/USA100 se incrementó (1,25 - 3,87 veces) en la presencia del SAL y el agregado de hierro revirtió significativamente dichos aumentos. Por lo tanto, el efecto observado del SAL es independiente de la cepa involucrada, la susceptibilidad a la meticilina o a las características genéticas y clonales (CC5 y CC8).

Las técnicas de espectroscopía FTIR han sido utilizadas previamente para investigar la presencia del PC¹⁰⁶, para caracterizar la composición polisacáridica superficial estafilocócica¹⁰⁷ y también para identificar los constituyentes extracelulares de las biopelículas¹⁴¹. Mediante el análisis de componentes principales de los espectros FTIR en el rango espectral específico para los polisacáridos (1.200–800 cm⁻¹) fue posible interpretar cuantitativa y cualitativamente las variaciones de los polisacáridos superficiales de *S. aureus* en biopelículas y cultivos planctónicos crecidos en las 3 condiciones diferentes. Este análisis demostró que tanto las bacterias crecidas en forma planctónica como en biopelícula en presencia del SAL, se agruparon separadamente respecto a sus respectivos controles en el diagrama de puntos correspondiente al análisis de componentes principales. Sin embargo, la presencia del hierro promovió cambios hacia la zona del grupo control sólo en el grupo de bacterias crecidas en biopelícula. Estos hallazgos mostraron que los datos FTIR proveen de evidencia espectroscópica de que el SAL modifica las características polisacáridicas de *S. aureus* crecidos en forma de vida sésil o planctónica, aunque sólo en la biopelícula las modificaciones en los polisacáridos se volvieron aparentes cuando las concentraciones de hierro son

disminuidas por acción del SAL. Contrariamente, las perturbaciones polisacáridicas detectadas por el análisis FTIR de las biopelículas de la mutante *codY* inducidas por SAL, permanecieron sin cambios cuando el hierro exógeno se encontraba en el medio de cultivo.

S. aureus puede producir tanto PIA como PC a partir del mismo precursor biosintético (UDP-*N*-acetilglucosamina) durante las fases exponencial y post-exponencial del crecimiento, respectivamente⁸⁸. Nuestro grupo de investigación ha demostrado previamente que el SAL reduce la expresión del PC en *S. aureus* crecido en forma planctónica⁶⁵. Sin embargo, en el presente estudio las células de *S. aureus* que se encuentran formando la biopelícula no produjeron PC en ninguna de las condiciones estudiadas, sugiriendo que las perturbaciones polisacáridicas halladas por espectroscopía FTIR podrían corresponder al PIA, el otro polisacárido principal producido por *S. aureus*. Más aún, la evaluación cuantitativa demostró que el PIA juega un rol esencial en las matrices extracelulares de las biopelículas formadas por las cepas Newman, CBS y BRZ en presencia de SAL. Es generalmente aceptado que cepas SAMR desarrollan biopelículas por mecanismos PIA-independientes¹⁴². En particular, el linaje BRZ muestra una habilidad incrementada de formar biopelícula por mecanismos PIA-independientes¹⁴³. Sin embargo, el aumento en la producción del PIA debido a la acción del SAL en cepas SAMR (CBS y BRZ) se asemejó al de la cepa SAMS (Newman) indicando que el SAL induce la formación PIA-dependiente de las biopelículas de *S. aureus* indistintamente de la sensibilidad a la meticilina en las condiciones bajo estudio. Por otra parte, estos resultados sugieren que la síntesis incrementada del PIA en presencia del SAL podría contribuir a formar biopelículas más tolerantes a la acción de los antibióticos y defensas del hospedador. Thomas y col. (2013) determinaron que un ciclo TCA disfuncional hace a *S. epidermidis* menos sensible a los antibióticos beta-lactámicos¹⁴⁴. De hecho, *S. epidermidis* puede desarrollar biopelículas por mecanismos PIA-dependientes promovidos por una reducida actividad del ciclo TCA¹⁴⁵.

El ciclo TCA posee enzimas que contienen centros hierro-azufre tales como la aconitasa CitB, la cual está involucrada en la conversión de citrato a isocitrato. En este estudio, el SAL disminuyó la transcripción de *citB* en biopelículas maduras (24 hs de crecimiento). Por cierto, el hallazgo de niveles bajos de transcriptos *citB* en las biopelículas de *S. aureus* respecto a cultivos planctónicos ha sido reportado

previamente ¹⁴⁶. Friedman y col. (2006) hallaron una disminución significativa de CitB cuando la cepa Newman de *S. aureus* se cultivó planctónicamente en medio carente de hierro ³⁸. Los mismos autores reportaron que CitB es regulada positivamente por Fur y por hierro en *S. aureus*. Esta observación se correlaciona con la disminución de transcriptos *citB* hallada en las biopelículas crecidas con SAL durante 24 hs. Por cierto, la transcripción de *fur* es iniciada cuando el contenido de hierro disminuye como resultado de su mecanismo autorregulatorio ¹⁴⁷. La presencia del SAL disminuyó los niveles de hierro intracelulares en las bacterias que forman la biopelícula madura promoviendo la inducción de la transcripción de *fur* en esta condición limitada de hierro. En concordancia con los datos transcripcionales de las biopelículas, la actividad enzimática de la aconitasa se encontró disminuida en presencia del SAL, lo cual indica una reducción de la actividad del ciclo TCA. En semejanza a lo hallado por otros autores, la actividad alterada del ciclo TCA debida a la acción del SAL conlleva a la falta de intermediarios requeridos para la biosíntesis del PC en las biopelículas ⁸⁸.

Recientemente, se especuló que en estafilococos cualquier señal ambiental o regulador capaz de alterar la actividad del ciclo TCA podría transformar el estado metabólico de las bacterias, resultando en la expresión de genes requeridos para el crecimiento en ese ambiente alterado ¹⁴⁸. Similarmente, la baja actividad del ciclo TCA inducida por el SAL provocó el direccionamiento del metabolismo central de las bacterias que conforman la biopelícula hacia rutas fermentativas aumentando la expresión de la Ldh y por lo tanto, estimulando sólo la producción de lactato ya que los niveles de acetato fueron indetectables. Es probable que la vía fermentativa del 2,3-butanodiol también se encuentre inducida por el SAL debido al incremento de la enzima acetoína reductasa (ButA), lo cual podría explicar la ausencia de acetato extracelular. Sadykov y col. (2008) reportaron que la inactivación del ciclo TCA en *S. epidermidis* resultó en una desrepresión de los genes de biosíntesis del PIA y una redirección del flujo de carbono hacia la síntesis del PIA ⁸⁹. En el presente trabajo, el cambio del flujo de carbono hacia la fermentación láctica de *S. aureus* indujo un aumento de los transcriptos *glmM* en las biopelículas inmaduras crecidas en presencia de SAL, lo que podría conducir a un incremento del precursor UDP-N-acetilglucosamina y por lo tanto a un aumento de PIA en vez de PC en biopelículas inducidas por SAL. Otras evidencias respecto al estado metabólico de *S. aureus* en las biopelículas maduras inducidas por SAL son la disminución de la expresión de

gapB y el aumento de la expresión de *pykA*. A diferencia de las bacterias en estado de vida planctónico, las bacterias que forman una biopelícula constituyen una población heterogénea y por lo tanto es razonable encontrar, en general, niveles transcripcionales bajos en aquellas bacterias que adoptan un estilo de vida sésil.

El ciclo TCA es controlado por varios factores transcripcionales (por ej. Fur, CodY, entre otros) que pueden responder a la concentración de metabolitos intracelulares ¹⁴⁹. Cabe destacar que los operones *ica* y *cap* contienen sitios de unión para CodY y que este regulador reprime la expresión de ambos operones ^{31 78 116}. Los resultados obtenidos de los experimentos realizados en el bagaje Newman están en acuerdo con hallazgos reportados por otros autores. Al respecto, el SAL disminuyó la transcripción de *codY*, liberando así la represión del locus *ica* por CodY. Interesantemente, el agregado de hierro no revirtió esta situación, demostrando que el hierro afecta positivamente a la proteína CodY ³⁸. A diferencia de otras especies bacterianas, la mutante *codY* de *S. aureus* exhibió una capacidad disminuida de formar biopelículas ¹⁴⁸. Aquí, se demostró que la mutación en *codY* disminuyó la habilidad de *S. aureus* para formar biopelícula pero el efecto inductor del SAL sobre la biomasa de las biopelículas se observó también en la mutante *codY*. Sin embargo, a diferencia de la cepa parental Newman, su mutante *codY* fue incapaz de revertir en presencia de hierro el efecto del SAL sobre la formación de biopelícula. Más aún, las biopelículas formadas por la mutante *codY* exhibieron un mayor nivel de producción del PIA comparado con aquel observado en la cepa parental. Una explicación posible para esta observación es que tanto los cambios metabólicos como los regulatorios (baja actividad del ciclo TCA y transcripción de *codY*) generados por el SAL podrían conducir a la producción aumentada del PIA. Es probable que la ausencia de expresión de CodY en la mutante fuera compensada por los cambios metabólicos conduciendo a resultados similares tanto en la mutante *codY* como en cepa parental. A diferencia de la cepa salvaje, la mutante *codY* no revirtió el efecto del SAL sobre la formación de la biopelícula ni la producción aumentada del PIA en presencia de hierro exógeno. Friedman y col. (2006) demostraron que la expresión de la proteína CodY es estimulada por hierro en la cepa Newman ³⁸. Al respecto, nuestros resultados sugieren que la proteína CodY está involucrada en la disminución mediada por hierro de la biopelícula aumentada y esto podría atribuirse a su efecto regulatorio sobre la síntesis del PIA.

En general, la formación de biopelícula involucra las etapas de adherencia inicial a una superficie, la adhesión entre células y proliferación, la maduración y finalmente la dispersión. Interesantemente, el sistema *agr* parece tener influencia en varias de las etapas de la formación de la biopelícula de los estafilococos. Un sistema *agr* no funcional facilita la adherencia inicial al poliestireno ¹⁵⁰. Aunque el sistema *agr* no regula la producción de PIA ¹⁵⁰ tiene un rol importante en la etapa de dispersión ^{82 151}. Por cierto, el sistema *agr* activa la expresión de proteasas extracelulares, lipasas, leucocidinas, α -hemolisinas y δ -hemolisinas (esta última codificada por RNAlII) e inhibe la de adhesinas como SpA. Por otro lado, estimula la producción de las PSMs por una vía independiente de RNAlII que involucra a AgrA ³⁹. En concordancia con otros autores, en este trabajo se observó que la mutante *agr* formó una biomasa mayor de la biopelícula comparado con aquella de la cepa salvaje Newman. Este incremento es atribuido a la incapacidad de las células bacterianas de la biopelícula madura para escapar de la misma ^{151 152}. Al respecto, el SAL impidió la dispersión de la biopelícula madura de la cepa Newman. Más aún, el SAL no alteró en forma significativa la producción de biopelícula en la mutante *agr* siendo ésta semejante a la observada cuando la cepa Newman se trató con SAL, evidenciando que el SAL ejerce un efecto sobre *agr*. La represión de *agr* es necesaria para formar y mantener las biopelículas ⁸². Es decir, que el SAL estaría ejerciendo un efecto negativo sobre el sistema *agr*. Nuestros resultados demostraron que el SAL disminuyó la producción de α - y δ -hemolisinas en biopelículas maduras de *S. aureus*, indicando que la actividad del sistema *agr* fue afectada negativamente. Esto se corroboró al determinar niveles significativamente bajos de los principales transcriptos del sistema (*agrA*, *agrC* y RNAlII) en presencia de SAL, así como los de aquellos controlados por éste (*psm*). Las moléculas surfactantes reguladas positivamente por *agr*, como la δ -hemolisina y las PSMs, están involucradas en la dispersión de las biopelículas ³⁹. Las PSMs causan la separación de las moléculas del PIA de la superficie bacteriana ¹¹⁹. Por cierto, las PSMs promovieron el desensamblaje de las biopelículas formadas por *S. epidermidis* y la diseminación bacteriana a partir de catéteres colonizados en un modelo de infección relacionada a dispositivos médicos ¹⁵³. Dastgheyb y col. (2015) demostraron que la baja actividad de *agr* y la consecuente producción disminuida de PSMs, es la causa de la fuerte agregación bacteriana de *S. aureus* en fluido sinovial

Además de las PSMs y la δ -hemolisina, las proteasas extracelulares constituyen un importante factor desestructurante involucrado también en la dispersión de la biopelícula. Por cierto, la activación exógena de *agr* propició el despegue y dispersión de las bacterias de la biopelícula formada por *S. aureus* por mecanismos dependientes de proteasas extracelulares⁸². Los resultados del presente trabajo indicaron que el SAL disminuyó la producción de proteasas extracelulares en biopelículas maduras de *S. aureus*. Más aún, la baja actividad proteolítica refleja la alta expresión de adhesinas en presencia del SAL, las que al ser degradadas por tratamiento con proteinasa K posibilitaron la reducción de la biomasa de las biopelículas inducidas por el SAL. Por lo tanto, la disminución en la transcripción de genes involucrados en la dispersión de la biopelícula y la baja producción de proteasas extracelulares mediada por la acción del SAL sobre *agr*, contribuiría con el mantenimiento de la integridad de los constituyentes de la matriz extracelular de la biopelícula inducida por SAL. La atenuación en la expresión del sistema *agr* podría evitar la diseminación de las bacterias desde la biopelícula hacia otros sitios del hospedador.

Los factores de transcripción bacterianos cumplen un rol fundamental en la regulación de la expresión de genes de virulencia⁴⁰. Para la producción de PSMs es requerida la unión directa del factor transcripcional AgrA a las regiones promotoras de *psm α* y *psm β* ³⁹. En determinadas condiciones, el SAL y algunos de sus derivados pueden interaccionar con factores de transcripción bacterianos y con ADN^{120 121 154}. Al respecto, el estudio *in silico* de la interacción entre el SAL y la proteína reguladora AgrA sugiere que dicha molécula puede interaccionar con AgrA en cuatro sitios. Los estudios complementarios de dinámica molecular, indicaron que el SAL ocuparía el sitio 4 con mayor frecuencia. Si bien este sitio no estaría involucrado en la unión de AgrA al ADN, el SAL podría estar ejerciendo un impedimento estérico al trasladarse de un sitio a otro, lo que dificultaría la interacción entre AgrA y sus secuencia consenso en los genes que regula. De esta manera, la expresión de los genes regulados por AgrA se encontraría afectada. Además, la acción regulatoria de AgrA se encuentra controlada por el estado redox de la bacteria debido a que esta proteína posee 2 residuos de Cys conservados que están íntimamente relacionados en el proceso de unión al ADN. En relación a esto, un elevado contenido de hierro intracelular puede conducir a un aumento de las especies reactivas del oxígeno mediante la reacción de Fenton¹⁵⁵. La capacidad antioxidante del SAL se debería a

la habilidad para atrapar iones de hierro lo que tiene impacto en la reacción de Fenton ¹⁵⁶. Con esto en mente, se puede especular que la unión al ADN del factor de transcripción AgrA en estado reducido podría verse afectada en presencia del SAL. Una serie de ensayos experimentales complementarios que demuestren el efecto del SAL sobre la interacción entre AgrA y el ADN deben llevarse a cabo para estudiar en profundidad esta hipótesis.

El ADN_e es un componente importante de las matrices extracelulares de las biopelículas de *S. aureus* ⁷³. La liberación del ADN_e a partir de la autólisis bacteriana es regulada positivamente por *agr* ¹²⁵. Al respecto, los resultados del presente trabajo concuerdan con Fujimoto y col. (1998) ¹²⁵ y muestran además que el SAL produjo una disminución de la autólisis en *S. aureus*. Más aún, el tratamiento con ADN_e de las biopelículas preformadas en presencia de SAL no tuvo un efecto significativo. Podemos sugerir que la disminución de la actividad del sistema *agr* mediada por el SAL estaría afectando la autólisis de manera negativa y consecuentemente retrasaría la liberación de ADN_e. Por otro lado, se puede especular que la menor autólisis bacteriana podría deberse, al menos en parte, a la mayor estabilidad de los lípidos de membrana dado un ambiente menos oxidativo en presencia del SAL como producto del atrapamiento del Fe²⁺ y su efecto sobre la reacción de Fenton ¹⁵⁶.

S. aureus es capaz de colonizar el tejido nasal murino formando una robusta biopelícula con una extensa matriz extracelular ⁸. Más aún, Lin y col. (2015) reportaron una significativa contribución del PIA a la adherencia de *S. aureus* al epitelio nasal ¹⁵⁷. Además, la colonización nasal con la cepa Newman ocurrió por largos períodos de tiempo en un modelo de colonización nasal usando ratones transgénicos humanizados ¹⁵⁸. Por cierto, se ha reportado el involucramiento de ciertas adhesinas (ClfB, IsdA, SpA, SdrC, entre otras) en la adherencia y colonización del epitelio nasal por *S. aureus* ⁴. En el presente trabajo, la administración de SAL a ratones por vía intravenosa incrementó el nivel de colonización nasal por *S. aureus*. La portación asintomática de *S. aureus* en narinas es un factor de riesgo importante para infecciones subsecuentes producidas por esta bacteria. Este patógeno puede ser encontrado viviendo asintóticamente en el vestíbulo nasal de aproximadamente el 20% de la población humana ⁴. Si estos individuos tuvieran una concentración significativa de SAL en suero debida a la ingesta de aspirina o a una dieta vegetariana estricta, podríamos especular no sólo

que la colonización por *S. aureus* estaría favorecida sino que también la erradicación de esta especie de este sitio podría estar dificultada. Por lo tanto, el riesgo de una infección endógena sería mucho mayor ¹⁵⁹.

Señal II: VAN y CIP en concentraciones bajas.

La capacidad de formar biopelículas es un factor de virulencia que le confiere a las bacterias ciertas ventajas como la supervivencia en ambientes hostiles, la evasión de las defensas del hospedador, así como también la resistencia a los antibióticos. Esta última, se basa en que la compleja estructura de las biopelículas dificulta el ingreso de los antibióticos al interior de las mismas ^{160 161}. Por esto, las bacterias más internas podrían no recibir la CIM del antibiótico que está siendo administrado como terapia ante una infección bacteriana. En estos casos, las concentraciones bajas de antibióticos podrían considerarse señales que son sensadas por las bacterias de la biopelícula e impactan en la expresión de sus sistemas regulatorios y factores de virulencia. La VAN y la CIP son antibióticos con diferentes blancos de acción, utilizados para tratar infecciones por *S. aureus*.

Diversos trabajos reportaron que Csub de antibióticos pueden afectar la formación de biopelículas en *S. aureus* ^{46 162}. En particular, se observó un efecto inductor de la VAN sobre la biopelícula de distintas cepas SAMR y VRSA ^{51 163 164}. LaPlante y col. (2009) observaron que la VAN no inhibió la formación de biopelícula en cepas SAMR y SAMS aisladas de pacientes con infecciones asociadas a catéteres, que fueron expuestos a Csub del antibiótico ¹⁶⁵. Nuestros resultados indican que la VAN en Csub no afectó la formación de la biopelícula de la cepa SAMR AR71 ni la de la cepa VISA Mu50. Por otra parte, la CIP en Csub indujo la expresión de FnBPB en *S. aureus* ⁴⁵, la cual está involucrada en la formación de biopelículas por este patógeno ^{166 167}. Ahire y col. (2015) informaron que nanofibras que eluyen CIP inhibieron la formación de la biopelícula en cepas SAMS y *P. aeruginosa* ¹⁶⁸. En el presente estudio, la CIP en bajas concentraciones disminuyó la producción de la biopelícula en la cepa Mu50 mientras que no tuvo efecto sobre aquella de la cepa AR71. Por otra parte, Csub de VAN y CIP incrementaron la formación de la biopelícula de la cepa Newman. Dicha cepa se eligió debido a su considerable virulencia y a que se relaciona clonalmente con la cepa SAMR USA300 (Tabla 2). Al profundizar dicho estudio, se observó una disgregación significativa de las biopelículas de la cepa Newman formadas en presencia de CIP o

VAN, cuando se las trató con proteinasa K. A diferencia de lo sugerido por Hsu y col. (2011) ⁵¹, estos resultados indican que los mecanismos dependientes de proteínas tienen un rol importante en la biopelícula inducida por VAN. Más aún, la biomasa de las biopelículas de la mutante Newman *ica* formada en presencia de Csub de VAN o CIP también se encontró significativamente disminuida luego del tratamiento con proteinasa K. Similar a lo hallado en estudios previos, la mutante Newman *ica* no presentó defectos en cuanto a la formación de biopelículas ⁸². Particularmente, en las biopelículas de la cepa Newman expuestas a Csub de CIP, se determinó que dicha señal incrementó los niveles de transcriptos *icaR*, el cual codifica para el represor del locus *ica*. Por otro lado, en las biopelículas de la cepa Newman formadas en presencia de VAN, el tratamiento con NaIO₄ (el cual cliva las uniones C3-C4 de los residuos de *N*-acetilglucosamina del PIA) ⁹¹ no tuvo un efecto significativo. A diferencia de las cepas SAMR, la evidencia indica que la formación de biopelículas de aislamientos SAMS sería por mecanismos *ica*-dependientes ⁷⁴. Contrariamente a lo esperado, tanto Csub de CIP y VAN indujeron la formación de la biopelícula por mecanismos *ica*-independientes en la cepa SAMS Newman.

En el presente trabajo se demostró que la expresión de adhesinas en la cepa Newman fue mayor en biopelículas inmaduras. Este resultado va en concierto con lo reportado por otros autores, que informaron la importancia de la expresión de adhesinas en la etapa de adhesión inicial durante el proceso de formación de la biopelícula ^{123 169}. Cabe mencionar que la expresión de las proteínas de superficie puede variar en cantidad y diversidad en respuesta a las condiciones ambientales del nicho donde se encuentre la bacteria. En este sentido, la CIP indujo un importante incremento de los transcriptos *sdrC*. Al respecto, Barbu y col. (2014) demostraron que SdrC promueve la adherencia a superficies y la formación de biopelículas en *S. aureus* ¹⁷⁰. Por otra parte, la VAN aumentó la transcripción de los genes *emp*, *eap* y *sdrC* y la expresión de la proteína Eap en biopelículas maduras de la cepa Newman no observándose cambios en el patrón de expresión en biopelículas inmaduras. Por otro lado, ha sido descrito que MgrA regula negativamente la expresión de proteínas superficiales y la formación de la biopelícula en las cepas MW2, RN6390 y SH1000 de *S. aureus* ^{27 79}. Similarmente, nuestros resultados mostraron que la mutante Newman *mgrA* presentó una capacidad aumentada de formar biopelículas respecto a la cepa parental y a diferencia de esta última disminuyó la producción de la biopelícula en presencia de

Csub de VAN. Este resultado, sugiere la participación de MgrA en el incremento de la biopelícula formada por la cepa Newman en presencia de VAN. Más aún, la biopelícula de la mutante *mgrA* presentó una mayor expresión proteica respecto a la parental. Contrario a lo observado en esta última, la VAN sólo incrementó la transcripción del gen *sdrC* significativamente en biopelículas maduras de la mutante *mgrA*, siendo el incremento menor al determinado en la cepa salvaje. Interesantemente, la expresión de Eap se observó levemente disminuida en biopelículas maduras de la mutante *mgrA* expuesta a Csub de VAN. Por cierto, la VAN no afectó la formación de biopelícula de la mutante Newman *eap*. Estos resultados sugieren un efecto negativo de la VAN sobre MgrA. Al respecto, el factor transcripcional MgrA de *S. aureus* en estado reducido, se encuentra asociado al ADN ²⁹. Se demostró que la VAN indujo la producción de especies reactivas del oxígeno que median la resistencia antibiótica en *S. aureus* ⁴⁸. Este incremento de especies reactivas del oxígeno afectaría a reguladores que responden al estado redox bacteriano para unirse o liberarse del ADN. Por lo cual, se puede especular que la inducción de la formación de la biopelícula mediada por VAN en *S. aureus*, involucraría la generación de especies reactivas del oxígeno por parte del antibiótico y la consecuente oxidación de MgrA y su separación del ADN. Sin embargo, esta hipótesis necesita ser comprobada experimentalmente. Por otro lado, nuestros resultados sugieren que MgrA sería un represor de la expresión de Eap. Por su parte, Eap parecería ser necesaria en la biopelícula inducida por VAN en la cepa Newman. Al respecto, trabajos previos reportaron que las proteínas Eap y Emp son componentes necesarios para la formación de las biopelículas de la cepa Newman bajo ciertas condiciones de crecimiento ^{37 126}.

El sistema de dos componentes SaeRS regula positivamente la expresión de adhesinas que contribuyen con la formación de la biopelícula e inhibe la expresión de proteasas que afectan negativamente la producción de la biopelícula en *S. aureus* ^{83 171}. Más aún, Harraghy y col. (2005) demostraron que *sae* es esencial para la expresión de las adhesinas Eap y Emp en *S. aureus* ¹²⁷. Por otro lado, el SAL estimuló la expresión de *sae*, así como también la de Eap en cultivos planctónicos de *S. aureus* ⁶⁶, lo que demuestra que éste sistema regulador puede sensar la presencia de señales del tipo farmacológicas. Los resultados del presente trabajo indican que Csub de VAN incrementaron los niveles de transcritos *sae*, lo que contribuiría con la inducción de la expresión de Eap y de la biopelícula. Por otro

lado, la CIP en bajas concentraciones también aumentó la transcripción de *sae* tanto en biopelículas maduras como en cultivos planctónicos de la misma cepa. Además, *sae* regula negativamente la expresión del PC en cultivos planctónicos de *S. aureus*⁹⁶. Si bien no detectamos la presencia de PC en biopelículas de la cepa Newman, nuestros resultados indican que Csub de CIP disminuyeron la expresión del PC e indujeron la de adhesinas en los cultivos planctónicos. Al respecto, Risley y col. (2007) demostraron que la expresión del PC en *S. aureus* impidió la adherencia a fibrinógeno y plaquetas mediante el enmascaramiento de la adhesina ClfA¹⁷². Por cierto, tanto la VAN como la CIP indujeron la expresión de *sae* provocando cambios en la expresión de los factores de virulencia que este regulador controla (PC, Eap y otras adhesinas). Por ello, se puede especular que estos antibióticos en bajas concentraciones provocan un fenotipo más adherente en *S. aureus* lo que favorecería el aumento de la biopelícula.

La autólisis bacteriana es un mecanismo por el cual las bacterias adheridas a una superficie propician su destrucción y al liberar el ADN contribuyen a la constitución de la matriz extracelular que protege a la comunidad bacteriana. Ha sido sugerido que el ADN podría jugar un importante rol en la formación de las biopelículas. Al respecto, Csub de VAN indujeron la formación de la biopelícula en un aislamiento VRSA a través de un mecanismo dependiente de autólisis⁵¹. En concordancia con este reporte, los resultados del presente trabajo indicaron que el ADN forma parte de la matriz extracelular de la biopelícula inducida por VAN, ya que el tratamiento con ADNasa disgregó significativamente la biopelícula de la cepa Newman. Por otro lado, se demostró el rol negativo de *sae* y positivo de *mgrA* sobre la autólisis de *S. aureus*, y que la VAN redujo la capacidad autolítica tanto de la cepa Newman como la de su mutante *sae*. Sin embargo, tal retraso no se observó en la autólisis de la mutante *mgrA* señalando la participación de este regulador en la acción de la VAN sobre la autólisis de la cepa parental. Al respecto, Chen y col (2006) sugirieron que la autólisis de *S. aureus* es regulada por oxidación de MgrA y que la cepa Newman es más resistente a la lisis en condiciones oxidantes²⁹. El retraso en la autólisis de la cepa Newman mediado por Csub de VAN podría deberse al efecto negativo del antibiótico sobre *mgrA* sumado a la estimulación transcripcional de *sae*. Si bien el efecto final es un retraso leve en la autólisis de la cepa Newman mediado por VAN, la presencia abundante de ADN en la matriz extracelular de la biopelícula inducida por el antibiótico podría deberse a una

disminución en la liberación o actividad de nucleasas extracelulares. Al respecto, se vinculó a la actividad nucleasa con la regulación de la formación de la biopelícula dependiente de ADNe en *S. aureus*¹⁷³. Más aún, Luong y col. (2006) reportaron el rol positivo de MgrA sobre la transcripción del gen *nuc*²⁷, por lo que se puede razonar que el efecto negativo de la VAN sobre MgrA estaría inhibiendo la producción de nucleasas extracelulares y de esta manera el ADNe no sería degradado. Futuros experimentos deben realizarse para comprobar esta hipótesis.

Tanto la VAN como la CIP en Csub, son capaces de inducir la formación de la biopelícula en *S. aureus* por mecanismos *ica*-independientes. Por cierto, la presencia de VAN o CIP como señales del microambiente afecta la expresión de reguladores y de los factores de virulencia relevantes en el desarrollo de la biopelícula en *S. aureus*. Bajo estas condiciones podría modificarse el curso de las infecciones causadas por este patógeno.

Adaptabilidad de *S. aureus*.

Algunas especies bacterianas pueden responder a los cambios del ambiente que las rodea modificando la red regulatoria lo que promueve la expresión diferencial de factores de virulencia necesarios para responder a ese nuevo entorno

174 175

Las señales estudiadas promovieron la formación de la biopelícula en *S. aureus*. Sin embargo, los mecanismos que mediaron dicho efecto fueron variables e impactaron diferencialmente sobre la composición de la matriz extracelular de las biopelículas (Figura 49). Al respecto, el SAL promovió el mayor incremento (125%), seguido por aquel observado con Csub de CIP (40%) y VAN (19%) en la formación de la biopelícula de la cepa Newman. Los mecanismos que conducen a la inducción de las biopelículas por las distintas señales estudiadas se resumen de manera esquemática en la Figura 50.

Este estudio pone énfasis en la habilidad de *S. aureus* para responder de manera efectiva a diversas señales que crean un ambiente hostil para la bacteria durante la formación de biopelícula. Así, se podría especular que cualquier molécula externa que genere en la bacteria los cambios regulatorios o metabólicos aquí observados, podría contribuir con la cronicidad de la infección, ya sea incrementando la producción de la biopelícula o la colonización en los tejidos del hospedador. Por lo tanto, debemos destacar la importancia de conocer en

profundidad como diversos fármacos influyen en la virulencia de *S. aureus* a la hora de diseñar esquemas terapéuticos o de control de las infecciones.

La información brindada por los resultados del presente trabajo, enriquece el conocimiento sobre la patogenia de *S. aureus* donde la biopelícula tiene un rol preponderante, como la colonización nasal y las infecciones crónicas o persistentes. Aquí se pone de manifiesto que *S. aureus* utiliza varios factores de virulencia cuya expresión modifica cambiando su intrincada red regulatoria, y también altera su metabolismo para formar la biopelícula en respuesta al ambiente que lo rodea. De este modo, se demuestra la plasticidad de este patógeno para contrarrestar las condiciones adversas que pudieran estar presentes en el hospedador. El entendimiento del conjunto de nuestros hallazgos contribuye con la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos y posibilita innovar los tratamientos y medidas de control.

En el presente trabajo se realizaron ensayos para determinar el efecto de señales microambientales como el SAL y Csub de VAN y CIP, sobre la regulación y expresión de factores de virulencia implicados en la formación de biopelículas en *S. aureus*. Así como también, la influencia del SAL en la interacción de *S. aureus* con el hospedador utilizando un modelo murino de colonización nasal. Los resultados descriptos permitieron concluir:

1. El SAL disminuyó la concentración intracelular de Fe^{2+} en un 27% en las bacterias de la biopelícula.
2. La disminución de la biodisponibilidad de Fe^{2+} causada por el SAL, promovió un incremento (entre 1,25 y 3,87 veces) en la formación de la biopelícula tanto en cepas SAMS como SAMR de los linajes USA100 y USA300.
3. Ni el SAL ni el Fe^{2+} alteraron los niveles de bacterias metabólicamente activas que forman la biopelícula, aunque el SAL causó un leve retraso en el crecimiento planctónico de *S. aureus*.
4. El SAL alteró la composición polisacáridica de la superficie de *S. aureus*, y el agregado de Fe^{2+} revirtió parcialmente dicho efecto sólo en las biopelículas.
5. El SAL aumentó la cantidad de PIA producido por cepas SAMS y SAMR como consecuencia de la baja disponibilidad de Fe^{2+} . Sin embargo, no se observó producción de PC en las biopelículas en las condiciones estudiadas.
6. El SAL modificó los niveles transcripcionales de genes involucrados en: i) rutas metabólicas (*citB*, *pyrA*, *gapB*, *glmM*), ii) regulación (*fur*, *codY*, *agrA*, *agrC*, RNAlII) y iii) virulencia (*cap5K*, *psm*, *icaA*) en biopelículas de *S. aureus*.
7. La actividad de la enzima aconitasa y, por ende del ciclo TCA, disminuyó en las bacterias de la biopelícula formada en presencia de SAL.

8. El SAL incrementó la expresión de las proteínas L- y D-lactato deshidrogenasa y acetoína reductasa, así como los niveles de L-lactato en biopelículas de *S. aureus*, indicando el cambio metabólico hacia la vía fermentativa.
9. La producción de lactato mediada por el SAL contribuyó a disminuir el pH del medio extracelular de cultivos de *S. aureus*, promoviendo así la liberación del hierro unido a la transferrina humana.
10. En ausencia de *codY*, el SAL indujo en menor proporción la formación de biopelícula PIA-dependiente y el agregado de Fe^{2+} no revirtió dicho efecto.
11. En ausencia del sistema *agr*, el SAL no afectó la formación de la biopelícula de *S. aureus*.
12. El SAL disminuyó la actividad del promotor P3 del sistema *agr* y consecuentemente aumentó la del gen *spa* en biopelículas maduras. Además, el SAL redujo la producción de proteasas y de las α - y δ -hemolisinas en las biopelículas de *S. aureus*, indicando la estimulación disminuida por parte de *agr*.
13. La actividad proteasa disminuida en las biopelículas, se reflejó en el incremento de las adhesinas Eap y Emp y en la disgregación mediada por proteinasa K de la biopelícula formada en presencia de SAL.
14. Se identificaron *in silico* cuatro sitios en el regulador AgrA con los que el SAL podría interactuar, siendo el sitio 1 el de mayor probabilidad de albergarlo, con una energía de unión de -4,30 kcal/mol. Además, los sitios 1 y 2 se encuentran en regiones de interacción de la proteína con el ADN.
15. El SAL retrasó la capacidad autolítica mediada por Tritón X-100 tanto en cepas SAMS como SAMR limitando la liberación de ADN en las biopelículas.
16. La colonización nasal de *S. aureus* aumentó en presencia de SAL.

17. La VAN aumentó la formación de la biopelícula de la cepa SAMS Newman un 19%, mientras que la CIP la incrementó en un 40%. Ninguno de los antibióticos afectó la producción de la biopelícula formada por el aislamiento SAMR AR71. La CIP disminuyó la formación de la biopelícula de la cepa VISA Mu50 en un 20%.
18. El constituyente proteico es el principal en las matrices extracelulares de las biopelículas de las cepas Newman y Newman *ica* formadas en presencia de VAN o CIP en Csub.
19. La VAN incrementó la actividad del promotor *sae* y la transcripción de *sae* lo que contribuyó con: i) el aumento de los niveles de transcriptos *eap*, *emp* y *sdrC*, ii) el aumento de la expresión de la adhesina Eap y iii) el retraso de la autólisis.
20. La VAN afectó negativamente al regulador MgrA lo que condujo a: i) la liberación de la represión ejercida por este regulador sobre la expresión de Eap y la consecuente inducción de la biopelícula en *S. aureus* y ii) el retraso de la autólisis.
21. La CIP aumentó los niveles de transcriptos *sae* lo que contribuyó con: i) el aumento en la transcripción del gen *sdrC* en biopelículas de *S. aureus*; ii) la disminución tanto de la actividad del promotor *cap* como de la producción del PC y iii) la inducción de la expresión de proteínas de superficie en cultivos planctónicos.

Los hallazgos del presente trabajo de tesis proveen nueva información sobre la influencia de señales externas sobre la virulencia de *S. aureus*. Algunas de estas señales podrían coexistir con este patógeno durante el transcurso de la infección y promover la cronicidad al favorecer la producción aumentada de biopelículas en el hospedador. Por esta razón, este trabajo pone en evidencia la habilidad de *S. aureus* para adaptarse rápidamente a señales del microambiente de la infección que promueven su persistencia. Nuevas estrategias terapéuticas deberían ser contempladas a fin de lograr una efectiva erradicación de este patógeno.

1. Kuroda, M. y col.. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. **357**, 1225–40 (2001).
2. Novick, R. P., Schlievert, P. & Ruzin, A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes Infect*. **3**, 585–594 (2001).
3. Cervantes-García, E., García-González, R. & Salazar-Schettino, P. M. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* **61**, 28–40 (2014).
4. Mulcahy, M. E. & McLoughlin, R. M. Host-Bacterial Crosstalk Determines *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. *Trends Microbiol*. **24**, 872–886 (2016).
5. van Belkum, A., Verkaik N., de Vogel, C., Boelens, H., Verveer, J., Nouwen, J., Verbrugh, H. & Wertheim H. Reclassification of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Types. *J. Infect. Dis*. **199**, 1820–1826 (2009).
6. Zernotti, M. E., Villegas, N., Revol, M., Baena-Cagnani, C., Arce Miranda, J., Paredes, M., Albesa, I. & Paraje, M. Evidence of bacterial Biofilms in nasal polyposis. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol*. **20**, 380–385 (2010).
7. Muthukrishnan, G., Quinn, G., Lamers, R., Diaz, C., Cole, A., Chen, S., & Cole, A. Exoproteome of *Staphylococcus aureus* Reveals Putative Determinants of Nasal Carriage. *J. Proteome Res*. **10**, 2064–2078 (2011).
8. Reddinger, R. M., Luke-Marshall, N. R., Hakansson, A. P. & Campagnari, A. A. Host physiologic changes induced by influenza a virus lead to *Staphylococcus aureus* biofilm dispersion and transition from asymptomatic colonization to invasive disease. *MBio* **7**, 1–8 (2016).
9. Brumfitt, W. & Hamilton-Miller, J. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med*. **320**, 1188–1196 (1989).
10. Johnson, M. D. & Decker, C. F. Antimicrobial Agents in Treatment of MRSA Infections. *Disease-a-Month* **54**, 793–800 (2008).
11. Naimi, T., LeDell, K., Como-Sabetti, K., Borchardt, S., Boxrud, D., Etienne, J., Johnson, S., Vandenesch, F., Fridkin S., O'Boyle, C., Danila, R. & Lynfield R. Comparison of Community -and Health Care -Associated Methicillin -Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *JAMA* **290**, 2976-2984 (2003).

12. Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M. & Ito, T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* **9**, 486–493 (2001).
13. Rodríguez-Noriega, E., Seas, C., Guzmán-Blanco, M., Mejía, C., Alvarez, C., Bavestrello, L., Zurita, J., Labarca, J., Luna, C., Salles, M. & Gotuzzoy, E. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *Int. J. Infect. Dis.* **14**, 560–566 (2010).
14. Gardella, N., Fernandez, S. & Di Gregorio, S. Estudio comparativo de clones de aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina prevalentes en la Argentina. *Rev Panam Salud Publica* **30**, 665–666 (2011).
15. von Specht, M., Gardella, N., Tagliaferri, P., Gutkind, G. & Mollerach, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired meningitis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **25**, 267–269 (2006).
16. Liu, C., Bayer, A., Cosgrove, S., Daum, R., Fridkin, S., Gorwitz, R., Kaplan, S., Karchmer, A., Levine, D., Murray, B., Rybak, M., Talan, D. & Chambers, H. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin. Infect. Dis.* **52**, 1-38 (2011).
17. Howden, B. P., Davies, J. K., Johnson, P. D. R., Stinear, T. P. & Grayson, M. L. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: Resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 99–139 (2010).
18. Gardete, S. & Tomasz, A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* **124**, 2836–40 (2014).
19. Koch, G., Yepes, A., Forstner, K., Wermser, C., Stengel, S., Modamio, J., Ohlsen, K., Foster, K. & Lopez D. Evolution of resistance to a last-resort antibiotic in *Staphylococcus aureus* via bacterial competition. *Cell* **158**, 1060–1071 (2014).
20. Hidalgo, M., Reyes, J., Cárdenas, A., Díaz, L., Rincón, S., Vanegas, N., Díaz, P., Castañeda, E. & Arias, C. Perfiles de resistencia a fluoroquinolonas en aislamientos clínicos de cocos Gram positivos provenientes de hospitales colombianos, 1994-2004. *Biomédica* **28**, 284–294 (2008).

21. Rolain, J., François, P., Hernandez, D., Bittar, F., Richet, H., Fournous, G., Mattenberger, Y., Bosdure, E., Stremler, N., Dubus, J., Sarles, J., Reynaud-Gaubert, M., Boniface, S., Schrenzel, J. & Raouly, D. Genomic analysis of an emerging multiresistant *Staphylococcus aureus* strain rapidly spreading in cystic fibrosis patients revealed the presence of an antibiotic inducible bacteriophage. *Biol. Direct* **4**, 1-15 (2009).
22. Joh, D., Speziale, P., Gurusiddappa, S., Manor, J. & Höök, M. Multiple specificities of the staphylococcal and streptococcal fibronectin-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules. *Eur. J. Biochem.* **258**, 897-905 (1998).
23. Nitsche-Schmitz, D. P., Rohde, M. & Chhatwal, G. S. Invasion mechanisms of Gram-positive pathogenic cocci. *Thromb. Haemost.* **98**, 488–496 (2007).
24. Novick, R. P. & Geisinger, E. Quorum sensing in staphylococci. *Annu.Rev.Genet.* **42**, 541–564 (2008).
25. Haag, A. F. & Bagnoli, F. The Role of Two-Component Signal Transduction Systems in *Staphylococcus aureus* Virulence Regulation. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. doi:10.1007/82 (2015).
26. Cheung, A. L., Bayer, A. S., Zhang, G., Gresham, H. & Xiong, Y. Q. Regulation of virulence determinants *in vitro* and *in vivo* in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **40**, 1–9 (2004).
27. Luong, T. T., Dunman, P. M., Murphy, E., Projan, S. J. & Lee, C. Y. Transcription profiling of the *mgrA* regulon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **188**, 1899–1910 (2006).
28. Jonsson, I. M., Lindholm, C., Luong, T. T., Lee, C. Y. & Tarkowski, A. *mgrA* regulates staphylococcal virulence important for induction and progression of septic arthritis and sepsis. *Microbes Infect.* **10**, 1229–1235 (2008).
29. Chen, P., Bae, T., Williams, W., Duguid, E., Rice, P., Schneewind, O. & He, C. An oxidation-sensing mechanism is used by the global regulator MgrA in *Staphylococcus aureus*. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 591–595 (2006).
30. Ingavale, S., van Wamel W., Luong, T., Lee C. & Cheung, A. Rat / MgrA , a Regulator of Autolysis , Is a Regulator of Virulence Genes in *Staphylococcus*

- aureus*. *Infect. Immun.* **73**, 1423–1431 (2005).
31. Majerczyk, C., Dunman, P., Luong, T., Lee, C., Sadykov, M., Somerville, G., Bodi, K. & Sonenshein, A. Direct targets of CodY in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **192**, 2861–2877 (2010).
32. Pohl, K., Francois, P., Stenz, L., Schlink, F., Geiger, T., Herbert, S., Goerke, C., Schrenzel, J., & Wolz, C. CodY in *Staphylococcus aureus*: A regulatory link between metabolism and virulence gene expression. *J. Bacteriol.* **191**, 2953–2963 (2009).
33. Xiong, A., Singh, V. K., Cabrera, G. & Jayaswal, R. K. Molecular characterization of the ferric-uptake regulator, Fur, from *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **146**, 659–668 (2000).
34. Johnson, M., Sengupta, M., Purves, J., Tarrant, E., Williams, P., Cockayne, A., Muthaiyan, A., Stephenson, R., Ledala, N., Wilkinson, B., Jayaswal, R. & Morrissey, J. Fur is required for the activation of virulence gene expression through the induction of the *sae* regulatory system in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 44–52 (2011).
35. Torres, V., Attia, A., Mason, W., Indriati Hood, M., Corbin, B., Beasley, F., Anderson, K., Stauff, D., Hayes McDonald, W., Zimmerman, L., Friedman, D., Heinrichs, D., Dunman, P. & Skaar, E. *Staphylococcus aureus fur* regulates the expression of virulence factors that contribute to the pathogenesis of pneumonia. *Infect. Immun.* **78**, 1618–1628 (2010).
36. Horsburgh, M. J., Clements, M. O., Crossley, H., Ingham, E. & Foster, S. J. PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **69**, 3744–3754 (2001).
37. Johnson, M., Cockayne, A. & Morrissey, J. A. Iron-regulated biofilm formation in *Staphylococcus aureus* Newman requires *ica* and the secreted protein Emp. *Infect. Immun.* **76**, 1756–1765 (2008).
38. Friedman, D., Stauff, D., Pishchany, G., Whitwell, C., Torres, V. & Skaar, E. *Staphylococcus aureus* redirects central metabolism to increase iron availability. *PLoS Pathog.* **2**, 0777–0789 (2006).
39. Queck, S., Jameson-Lee, M., Villaruz, A., Bach, T., Khan, B., Sturdevan, D.,

- Ricklefs, S., Li, M. & Otto, M. RNAIII-independent target gene control by the *agr* quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell* **32**, 150–158 (2008).
40. Sun, F., Liang, H., Kong, X., Xie, S., Cho, H., Deng, X., Ji, Q., Zhang, H., Alvarez, S., Hicks, L., Bae, T., Luo, C., Jiang, H. & He, C. Quorum-sensing *agr* mediates bacterial oxidation response via an intramolecular disulfide redox switch in the response regulator AgrA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 9095–9100 (2012).
41. Adhikari, R. P. & Novick, R. P. Regulatory organization of the staphylococcal *sae* locus. *Microbiology* **154**, 949–959 (2008).
42. Liu, Q., Yeo, W. S. & Bae, T. The SaeRS two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Genes*. **7**, 1-20 (2016).
43. Kuroda, H., Kuroda, M., Cui, L. & Hiramatsu, K. Subinhibitory concentrations of β -lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system. *FEMS Microbiol. Lett.* **268**, 98–105 (2007).
44. Rasigade, J., Moulay, A., Lhoste, Y., Tristan, A., Bes, M., Vandenesch, F., Etienne, J., Lina, G., Laurent, F. & Dumitrescu, O. Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* **11**, 1-9 (2011).
45. Li, D., Renzoni, A., Estoppey, T., Bisognano, C., Francois, P., Kelley, W., Lew, D., Schrenzel, J. & Vaudaux, P. Induction of fibronectin adhesins in quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* by subinhibitory levels of ciprofloxacin or by sigma B transcription factor activity is mediated by two separate pathways. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 916–924 (2005).
46. Smith, K., Gould, K., Ramage, G., Gemmell, C., Hinds, J. & Lang, S. Influence of tigecycline on expression of virulence factors in biofilm-associated cells of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 380–387 (2010).
47. Hessling, B., Bonn, F., Otto, A., Herbst, F., Rappen, G., Bernhardt, J., Hecker, M. & Becher, D. Global proteome analysis of vancomycin stress in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **303**, 624–634 (2013).
48. Li, G., Quan, F., Qu, T., Lu, J., Chen, S., Cui, L., Guo, D., & Wang, Y. Sublethal

- Vancomycin Induced ROS Mediating Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Biosci. Rep.* **35** 1–7 (2015).
49. Chen, H., Chen, C., Fang, C., Hsieh, Y., Lin, M. & Shu, J. Vancomycin activates σ^B in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* resulting in the enhancement of cytotoxicity. *PLoS One* **6**, 1–8 (2011).
50. Kaplan, J. B., Jabbouri, S. & Sadovskaya, I. Extracellular DNA-dependent biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A in response to subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. *Res. Microbiol.* **162**, 535–541 (2011).
51. Hsu, C., Lin, M., Chen, C., Chien, S., Cheng, Y., Su, I. & Shu, J. Vancomycin promotes the bacterial autolysis, release of extracellular DNA, and biofilm formation in vancomycin-non-susceptible *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **63**, 236–247 (2011).
52. Goerke, C., Koller, J. & Wolz, C. Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 171–177 (2006).
53. Lamichhane-Khadka, R., Cantore, S., Riordan, J., Delagdo, A., Norman, A., Dueñas, S., Zaman, S., Horan, S., Wilkinson, B. & Gustafson, J. *sarA* inactivation reduces vancomycin-intermediate and ciprofloxacin resistance expression by *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **34**, 136–141 (2009).
54. Nagel, M., Reuter, T., Jansen, A., Szekat, C. & Bierbaum, G. Influence of ciprofloxacin and vancomycin on mutation rate and transposition of IS256 in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 229–236 (2011).
55. McGettigan, P. & Henry, D. Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs That Elevate Cardiovascular Risk: An Examination of Sales and Essential Medicines Lists in Low-, Middle-, and High-Income Countries. *PLoS Med.* **10**, 1-6 (2013).
56. Patrignani, P. & Dovizio, M. COX-2 and EGFR: Partners in Crime Split by Aspirin. *EBioMedicine* **2**, 372–373 (2015).
57. Caarls, L., Pieterse, C. M. J. & Van Wees, S. C. M. How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Front. Plant Sci.* **6**, 1-11 (2015).
58. Rajaram, S. The effect of vegetarian diet, plant foods, and phytochemicals on

- hemostasis and thrombosis. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**, 552-558 (2003).
59. Blacklock, C., Lawrence, J., Wiles, D., Malcolm, E., Gibson, I., Kelly, C. & Paterson, J. Salicylic acid in the serum of subjects not taking aspirin. Comparison of salicylic acid concentrations in the serum of vegetarians, non-vegetarians, and patients taking low dose aspirin. *J Clin Pathol* **54**, 553–555 (2001).
60. Price, C. T. D., Lee, I. R. & Gustafson, J. E. The effects of salicylate on bacteria. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 1029–1043 (2000).
61. Domenico, P., Schwartz, S. & Cunha, B. A. Reduction of capsular polysaccharide production in *Klebsiella pneumoniae* by sodium salicylate. *Infect Immun* **57**, 3778–3782 (1989).
62. Kupferwasser, L., Yeaman, M., Nast, C., Kupferwasser, D., Xiong, Y., Palma, M., Cheung, A. & Bayer, A. Salicylic acid attenuates virulence in edovascular infections by targeting global regulatory pathways in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Investigation* **112**, 222–233 (2003).
63. El-Mowafy, S. A., Abd El Galil, K. H., El-Messery, S. M. & Shaaban, M. I. Aspirin is an efficient inhibitor of quorum sensing, virulence and toxins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Pathog.* **74**, 25–32 (2014).
64. Gustafson, J., Candelaria, P., Fisher, S., Goodridge, J., Lichocik, T., McWilliams, T., Price, C., O'Brien, F. & Grubb, W. Growth in the Presence of Salicylate Increases Fluoroquinolone Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 990–992 (1999).
65. Alvarez, L., Barbagelata, M., Gordiola, M., Cheung, A., Sordelli, D. & Buzzola, F. Salicylic acid diminishes *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5 expression. *Infect. Immun.* **78**, 1339–1344 (2010).
66. Alvarez, L. P., Barbagelata, M. S., Cheung, A. L., Sordelli, D. O. & Buzzola, F. R. Salicylic acid enhances *Staphylococcus aureus* extracellular adhesin protein expression. *Microbes Infect.* **13**, 1073–1080 (2011).
67. Pozdnyakov, I. P., Plyusnin, V. F., Grivin, V. P. & Oliveros, E. Photochemistry of Fe(III) complexes with salicylic acid derivatives in aqueous solutions. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **307**, 9–15 (2015).
68. Haley, K. P. & Skaar, E. P. A battle for iron: Host sequestration and

- Staphylococcus aureus* acquisition. *Microbes Infect.* **14**, 217–227 (2012).
69. Aumercier, M., Murray, D. M. & Rosner, J. L. Potentiation of susceptibility to aminoglycosides by salicylate in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 786–791 (1990).
70. Greene, C., McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P., Lew, D. & Foster, T. Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Mol. Microbiol.* **17**, 1143–1152 (1995).
71. Cramton, S. E., Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W. & Götz, F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* **67**, 5427–5433 (1999).
72. Cucarella, C., Solano, C. & Valle, J. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* **183**, 2888–2896 (2001).
73. Rice, K., Mann, E., Endres, J., Weiss, E., Cassat, J., Smeltzer, M. & Bayles, K. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 8113–8118 (2007).
74. O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Smyth, D., Humphreys, H., Robinson, D. & O'Gara, J. Association between Methicillin Susceptibility and Biofilm Regulation in *Staphylococcus aureus* Isolates from Device-Related Infections. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1379–1388 (2007).
75. O'Gara, J. P. *ica* and beyond : biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **270**, 179–188 (2007).
76. Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J., Amorena, B., Penadés, J. & Lasa, I. SarA and not σ^B is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **48**, 1075–87 (2003).
77. Valle, J., Vergara-Irigaray, M., Merino, N., Penadés, J. R. & Lasa, I. σ^B regulates IS256-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotypic variation. *J. Bacteriol.* **189**, 2886–2896 (2007).
78. Majerczyk, C., Sadykov, M., Luong, T., Lee, C., Somerville, G. & Sonenshein, A.

- Staphylococcus aureus* CodY negatively regulates virulence gene expression. *J. Bacteriol.* **190**, 2257–2265 (2008).
79. Trottonda, M. P., Tamber, S., Memmi, G. & Cheung, A. L. MgrA represses biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **76**, 5645–5654 (2008).
80. Tu Quoc, P., Genevaux, P., Pajunen, M., Savilahti, H., Georgopoulos, C., Schrenzel, J. & Kelley, W. Isolation and Characterization of Biofilm Formation-Defective Mutants of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **75**, 1079–1088 (2007).
81. Rivera, F. E., Miller, H. K., Kolar, S. L., Stevens, S. M. & Shaw, L. N. The impact of CodY on virulence determinant production in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proteomics* **12**, 263–268 (2012).
82. Boles, B. R. & Horswill, A. R. *agr*-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.* **4** 1-13 (2008).
83. Mrak, L., Zielinska, A., Beenken, K., Mrak, I., Atwood, D., Griffin, L., Lee, C. & Smeltzer, M. SaeRS and *sarA* act synergistically to repress protease production and promote biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **7**, 1-10 (2012).
84. Hammer, N. D. & Skaar, E. P. The impact of metal sequestration on *Staphylococcus aureus* metabolism. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 10–14 (2012).
85. Weinberg, E. D. Suppression of bacterial biofilm formation by iron limitation. *Med. Hypotheses* **63**, 863–865 (2004).
86. Lyte, M., Freestone, P., Neal, C., Olson, B., Haigh, R., Bayston, R. & Williams, P. Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes. *Lancet* **361**, 130–135 (2003).
87. Maresso, A. W. & Schneewind, O. Iron acquisition and transport in *Staphylococcus aureus*. *BioMetals* **19**, 193–203 (2006).
88. Sadykov, M., Mattes, T., Luong, T., Zhu, Y., Day, S., Sifri, C., Lee, C. & Somerville, G. Tricarboxylic acid cycle-dependent synthesis of *Staphylococcus aureus* type 5 and 8 capsular polysaccharides. *J. Bacteriol.* **192**, 1459–1462 (2010).

89. Sadykov, M., Olson, M., Halouska, S., Zhu, Y., Fey, P., Powers, R. & Somerville, G. Tricarboxylic Acid Cycle-Dependent Regulation of *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin Synthesis. *J. Bacteriol.* **190**, 7621–7632 (2008).
90. Watts, A., Ke, D., Wang, Q., Pillay, I., Nicholson-Weller, A. & Lee, J. *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. *Infect. Immun.* **73**, 3502–3511 (2005).
91. Di Poto, A., Sbarra, M. S., Provenza, G., Visai, L. & Speziale, P. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biomaterials* **30**, 3158–3166 (2009).
92. Lattar, S. M., Tuchscher, L., Centrón D., Becker, K., Predari, S., Buzzola, F., Robinson, D. & Sordelli, D. Molecular fingerprinting of *Staphylococcus aureus* isolated from patients with osteomyelitis in Argentina and clonal distribution of the cap5(8) genes and of other selected virulence genes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**, 2559–2566 (2012).
93. Hiramatsu, K., Aritaka, N., Hanaki, H., Kawasaki, S., Hosoda, Y., Hori, S., Fukuchi, Y. & Kobayashi, I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* **350**, 1670–1673 (1997).
94. Duthie, E & Lorenz, L. Staphylococcal Coagulase : Mode of Action and Antigenicity. *J. Gen. Microbiol.* **6**, 95–107 (1952).
95. Hussain, M., Hagggar, A., Heilmann, C., Peters, G., Flock, J. & Herrmann, M. Insertional Inactivation of *eap* in *Staphylococcus aureus* Strain Newman Confers Reduced Staphylococcal Binding to Fibroblasts. *Infect. Immun.* **70**, 2933–2940 (2002).
96. Luong, T., Sau, K., Roux, C., Sau, S., Dunman, P. & Lee, C. *Staphylococcus aureus* ClpC divergently regulates capsule via *sae* and *codY* in strain Newman but activates capsule via *codY* in strain UAMS-1 and in strain Newman with repaired *saeS*. *J. Bacteriol.* **193**, 686–694 (2011).
97. Kropec, A., Maira-Litran, T., Jefferson, K., Grout, M., Cramton, S., Gotz, F.,

- Goldmann, D. & Pier, G. Poly-*N*-Acetylglucosamine Production in *Staphylococcus aureus* Is Essential for Virulence in Murine Models of Systemic Infection. *Infect. Immun.* **73**, 6868–6876 (2005).
98. Li, D. & Cheung, A. Repression of *hla* by *rot* is dependent on *sae* in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **76**, 1068–1075 (2008).
99. Barbagelata, M., Alvarez, L., Gordiola, M., Tuchscher, L., von Eiff, C., Becker, K., Sordelli, D. & Buzzola, F. Auxotrophic mutant of *Staphylococcus aureus* interferes with nasal colonization by the wild type. *Microbes Infect.* **13**, 1081–1090 (2011).
100. van Wamel, W., Xiong, Y., Bayer, A., Yeaman, M., Nast, C. & Cheung, A. Regulation of *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharides by *agr* and *sarA* in vitro and in an experimental endocarditis model. *Microb. Pathog.* **33**, 73–79 (2002).
101. Manna, A. & Cheung, A. L. Characterization of *sarR*, a modulator of *sar* expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **69**, 885–896 (2001).
102. Kahl, B., Goulian, M., van Wamel, W., Herrmann, M., Simon, S., Kaplan, G., Peters, G. & Cheung, A. *Staphylococcus aureus* RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line. *Infect. Immun.* **68**, 5385–5392 (2000).
103. Grare, M., Fontanay, S., Cornil, C., Finance, C. & Duval, R. E. Tetrazolium salts for MIC determination in microplates: Why? Which salt to select? How? *J. Microbiol. Methods* **75**, 156–159 (2008).
104. Mladěnka, P., Macáková, K., Filipský, T., Zatloukalová, L., Jahodář, L., Bovicelli, P., Silvestri, I., Hrdina, R. & Saso, L. *In vitro* analysis of iron chelating activity of flavonoids. *J. Inorg. Biochem.* **105**, 693–701 (2011).
105. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
106. Grunert, T., Wenning, M., Barbagelata, M., Fricker, M., Sordelli, D., Buzzola, F. & Ehling-Schulz, M. Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* capsular serotypes by means of artificial neural network-assisted fourier

- transform infrared spectroscopy. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 2261–2266 (2013).
107. Johler, S., Stephan, R., Althaus, D., Ehling-Schulz, M. & Grunert, T. High-resolution subtyping of *Staphylococcus aureus* strains by means of Fourier-transform infrared spectroscopy. *Syst. Appl. Microbiol.* **39**, 189–194 (2016).
108. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
109. Kennedy, M. C., Emptage, M. H., Dreyer, J. L. & Beinert, H. The role of iron in the activation-inactivation of aconitase. *J. Biol. Chem.* **258**, 11098–11105 (1983).
110. Jenkins, R., Burton, N. & Cooper, R. Proteomic and genomic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) exposed to manuka honey in vitro demonstrated down-regulation of virulence markers. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 603–615 (2014).
111. Chatterjee, I., Kriegeskorte, A., Fischer, A., Deiwick, S., Theimann, N., Proctor, R., Peters, G., Herrmann, M. & Kahl, B. *In vivo* mutations of thymidylate synthase (Encoded by *thyA*) are responsible for thymidine dependency in clinical small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **190**, 834–842 (2008).
112. Kaito, C., Saito, Y., Nagano, G., Ikuo, M., Omae, Y., Hanada, Y., Han, X., Kuwahara-Arai, K., Hishinuma, T., Baba, T., Ito, T., Hiramatsu, K. & Sekimizu, K. Transcription and translation products of the cytolysin gene *psm-mec* on the mobile genetic element *SCCmec* regulate *Staphylococcus aureus* virulence. *PLoS Pathog.* **7** 1-18 (2011).
113. Goi, A., Veressinina, Y. & Trapido, M. Degradation of salicylic acid by Fenton and modified Fenton treatment. *Chem. Eng. J.* **143**, 1–9 (2008).
114. Nichela, D., Donadelli, J., Caram, B., Haddou, M., Rodriguez Nieto, F., Oliveros, E. & García Einschlag, F. Iron cycling during the autocatalytic decomposition of benzoic acid derivatives by Fenton-like and photo-Fenton techniques. *Appl. Catal. B Environ.* **170**, 312–321 (2015).
115. Vuong, C., Kidder, J., Jacobson, E., Otto, M., Proctor, R. & Somerville, G. *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin Production Significantly Increases during Tricarboxylic Acid Cycle Stress. *J. Bacteriol.* **187**,

- 2967–2973 (2005).
116. Thoendel, M., Kavanaugh, J. S., Flack, C. E. & Horswill, A. R. Peptide signaling in the *Staphylococci*. *Chem. Rev.* **111**, 117–151 (2011).
117. Fischer, J., Lee, J. C., Peters, G. & Kahl, B. C. Acapsular clinical *Staphylococcus aureus* isolates lack *agr* function. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 414–417 (2014).
118. Shopsin, B., Drlica-Wagner, A., Mathema, B., Adhikari, R., Kreiswirth, B. & Novick, R. Prevalence of *agr* dysfunction among colonizing *Staphylococcus aureus* strains. *J. Infect. Dis.* **198**, 1171–1174 (2008).
119. Dastgheyb, S., Villaruz, A., Le, K., Tan, V., Duong, A., Chatterjee, S., Cheung, G., Joo, H., Hickok, N. & Otto, M. Role of phenol-soluble modulins in formation of *Staphylococcus aureus* biofilms in synovial fluid. *Infect. Immun.* **83**, 2966–2975 (2015).
120. Martin, R. G. & Rosner, J. L. Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to *mar* operator sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5456–5460 (1995).
121. Abedi, M., Bathaie, S. Z. & Mousavi, M. F. Interaction Between DNA and Some Salicylic Acid Derivatives and Characterization of their DNA Targets. *Electroanalysis* **25**, 2547–2556 (2013).
122. Gao, J. & Stewart, G. C. Regulatory Elements of the *Staphylococcus aureus* Protein A (Spa) Promoter. *J. Bacteriol.* **186**, 3738–3748 (2004).
123. Otto, M. *Staphylococcal* infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med* **64**, 175–188 (2013).
124. Otto, M. Quorum-sensing control in *Staphylococci* – a target for antimicrobial drug therapy? *FEMS Microbiol. Lett.* **241**, 135–141 (2004).
125. Fujimoto, D. F. & Bayles, K. W. Opposing roles of the *Staphylococcus aureus* virulence regulators, *agr* and *sar*, in triton X-100- and penicillin-induced autolysis. *J. Bacteriol.* **180**, 3724–3726 (1998).
126. Thompson, K. M., Abraham, N. & Jefferson, K. K. *Staphylococcus aureus*

- extracellular adherence protein contributes to biofilm formation in the presence of serum. *FEMS Microbiol. Lett.* **305**, 143–147 (2010).
127. Harraghy, N., Kormanec, J., Wolz, C., Homerova, D., Goerke, C., Ohlsen, K., Qazi, S., Hill, P. & Herrmann, M. *sae* is essential for expression of the *staphylococcal* adhesins Eap and Emp. *Microbiology* **151**, 1789–1800 (2005).
128. Cafiso, V., Bertuccio, T., Spina, D., Purrello, S., Campanile, F., Di Pietro, C., Purrello, M. & Stefani, S. Modulating activity of vancomycin and daptomycin on the expression of autolysis cell-wall turnover and membrane charge genes in hVISA and VISA strains. *PLoS One* **7**, 1-10 (2012).
129. Wu, K. K. Control of COX-2 and iNOS gene expressions by aspirin and salicylate. *Thromb. Res.* **110**, 273–276 (2003).
130. DePas, W., Hufnagel, D., Lee, J., Blanco, L., Bernstein, H., Fisher, S., James, G., Stewart, P. & Chapman, M. Iron induces bimodal population development by *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 2629–2634 (2013).
131. Hendricks, M., Lashua, L., Fischer, D., Flitter, B., Eichinger, K., Durbin, J., Sarkar, S., Coyne, C., Empey, K. & Bomberger, J. Respiratory syncytial virus infection enhances *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth through dysregulation of nutritional immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 1642–1647 (2016).
132. Nowatzki, P., Koepsel, R., Stoodley, P., Min, K., Harper, A., Murata, H., Donfack, J., Hortelano, E., Ehrlich, G. & Russell, A. Salicylic acid-releasing polyurethane acrylate polymers as anti-biofilm urological catheter coatings. *Acta Biomater.* **8**, 1869–1880 (2012).
133. Lin, M. H., Shu, J. C., Huang, H. Y. & Cheng, Y. C. Involvement of iron in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **7**, 1-7 (2012).
134. Ardehali, R., Shi, L., Janatova, J., Mohammad, F. & Burns, G. L. The effect of apo-transferrin on bacterial adhesion to biomaterials. *Artif. Organs* **26**, 512–520 (2002).
135. Wu, X., Wang, Y. & Tao, L. Sulfhydryl compounds reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation by inhibiting PIA biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **316**, 44–50 (2011).

136. Prithiviraj, B., Bais, H., Weir, T., Suresh, B., Najarro, E., Dayakar, B., Schweizer, H. & Vivanco, J. Down Regulation of Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* by Salicylic Acid Attenuates Its Virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*. **73**, 5319–5328 (2005).
137. Johnson, M., Cockayne, A., Williams, P. H. & Morrissey, J. Iron-Responsive Regulation of Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Involves Fur Dependent and Fur-Independent Mechanisms. *J. Bacteriol.* **187**, 8211–8215 (2005).
138. O’Gara, J. P. *ica* and beyond: Biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **270**, 179–188 (2007).
139. Laudy, A. E., Mrowka, A., Krajewska, J. & Tyski, S. The influence of efflux pump inhibitors on the activity of non-antibiotic NSAIDS against Gram-negative rods. *PLoS One* **11**, 1-16 (2016).
140. Cohen, S., Sweeney, H. M. & Leitner, F. Relation between iron uptake, pH of growth medium, and penicillinase formation in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **93**, 1227–1235 (1967).
141. Karadenizli, A., Kolayli, F. & Ergen, K. A novel application of Fourier-transformed infrared spectroscopy: classification of slime from staphylococci. *Biofouling* **23**, 63–71 (2007).
142. McCarthy, H., Rudkin, J., Black, N., Gallagher, L., O’Neill, E. & O’Gara, J. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **5**, 1-9 (2015).
143. Costa M., Beltrame C., Ferreira F., Botelho A., Lima N., Souza R., de Almeida L., Vasconcelos A., Nicolás, M., & Figueiredo, A. Complete Genome Sequence of a Variant of the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST239 Lineage , Strain BMB9393 , Displaying Superior Ability To Accumulate *ica* -Independent Biofilm. *Genome Announc.* **1**, 1-2 (2013).
144. Thomas, V. & Kinkead, L. A Dysfunctional Tricarboxylic Acid Cycle Enhances Fitness of *Staphylococcus epidermidis* during β -Lactam Stress. *MBio* **4**, 1-5 (2014).

145. Sadykov, M., Zhang, B., Halouska, S., Nelson, J., Kreimer, L., Zhu, Y., Powers, R. & Somerville, G. Using NMR metabolomics to investigate tricarboxylic acid cycle-dependent signal transduction in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Biol. Chem.* **285**, 36616–36624 (2010).
146. Beenken, K., Dunman, P., McAleese, F., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S., Blevins, J. & Smeltzer, M. Global Gene Expression in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *J. Bacteriol.* **186**, 4665–4684 (2004).
147. Carpenter, B. M., Whitmire, J. M. & Merrell, D. S. This is not your mother's repressor: The complex role of *fur* in pathogenesis. *Infect. Immun.* **77**, 2590–2601 (2009).
148. Richardson, A. R., Somerville, G. A. & Sonenshein, A. L. Regulating the Intersection of Metabolism and Pathogenesis in Gram-positive Bacteria. *Microbiol. Spectr.* **3**, 1–27 (2015).
149. Geiger, T. & Wolz, C. Intersection of the stringent response and the CodY regulon in low GC Gram-positive bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**, 150–155 (2014).
150. Vuong, C., Saenz, H. L., Götz, F. & Otto, M. Impact of the *agr* Quorum-Sensing System on Adherence to Polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* **182**, 1688–1693 (2000).
151. Yarwood, J. M., Bartels, D. J., Volper, E. M. & Greenberg, E. P. Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *J. Bacteriol.* **186**, 1838–1850 (2004).
152. Kong, K. F., Vuong, C. & Otto, M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**, 133–139 (2006).
153. Wang, R. y col. *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 238–248 (2011).
154. Sun, F., Zhou, L., Zhao, B., Deng, X., Cho, H., Yi, C., Jian, X., Song, C., Luan, C., Bae, T., Li, Z. & He, C. Targeting MgrA-mediated virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Chem. Biol.* **18**, 1032–1041 (2011).
155. Touati, D. Iron and Oxidative Stress in Bacteria. *Archives of Biochemistry and*

- Biophysics*. **373**, 1–6 (2000).
156. Cheng, I. F., Zhao, C. P., Amolins, A., Galazka, M. & Doneski, L. A hypothesis for the *in vivo* antioxidant action of salicylic acid. *BioMetals* **9**, 285–290 (1996).
157. Lin, M., Shu, J., Lin, L., Chong, K., Cheng, Y., Du, J. & Liu, S. Elucidating the crucial role of poly *N*-acetylglucosamine from *Staphylococcus aureus* in cellular adhesion and pathogenesis. *PLoS One* **10**, 1-13 (2015).
158. Xu, S. X., Kasper, K. J., Zeppa, J. J. & McCormick, J. K. Superantigens modulate bacterial density during *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *Toxins*. **7**, 1821–1836 (2015).
159. Brown, A. F., Leech, J. M., Rogers, T. R. & McLoughlin, R. M. *Staphylococcus aureus* colonization: Modulation of host immune response and impact on human vaccine design. *Front. Immunol.* **4**, 1–21 (2014).
160. Singh, R., Ray, P., Das, A. & Sharma, M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 1955–1958 (2010).
161. Jefferson, K. K., Goldmann, D. A. & Pier, G. B. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2467–2473 (2005).
162. Kaplan, J. B. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int. J. Artif. Organs* **34**, 737–751 (2011).
163. Mirani, Z. A. & Jamil, N. Effect of sub-lethal doses of vancomycin and oxacillin on biofilm formation by vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Basic Microbiol.* **51**, 191–195 (2011).
164. Rose, W. E. & Poppens, P. T. Impact of biofilm on the *in vitro* activity of vancomycin alone and in combination with tigecycline and rifampicin against *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**, 485–488 (2009).
165. LaPlante, K. L. & Mermel, L. A. *In vitro* activities of telavancin and vancomycin against biofilm-producing *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, and *Enterococcus faecalis* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 3166–3169 (2009).

166. Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Merino, N., Latasa, C., García, B., Ruiz de los Mozos, I., Solano, C. & Toledo-Arana, A. Relevant role of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated foreign-body infections. *Infect. Immun.* **77**, 3978–3991 (2009).
167. Houston, P., Rowe, S. E., Pozzi, C., Waters, E. M. & O’Gara, J. P. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infect. Immun.* **79**, 1153–1165 (2011).
168. Ahire, J. J., Neveling, D. P., Hattingh, M. & Dicks, L. M. T. Ciprofloxacin-Eluting nanofibers inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **10**, 1-13 (2015).
169. Speziale, P., Pietrocola, G., Foster, T. J. & Geoghegan, J. A. Protein-based biofilm matrices in Staphylococci. *Front Cell Infect. Microbiol.* **4**, 1–10 (2014).
170. Barbu, E. M., Mackenzie, C., Foster, T. J. & Höök, M. SdrC induces staphylococcal biofilm formation through a homophilic interaction. *Mol. Microbiol.* **94**, 172–185 (2014).
171. Rogasch, K., Ruhmling, V., Pané-Farré, J., Hoper, D., Weinberg, C., Fuchs, S., Schmudde, M., Broker, B., Wolz, C., Hecker, M. & Engelmann, S. Influence of the two-component system SaeRS on global gene expression in two different *Staphylococcus aureus* strains. *J. Bacteriol.* **188**, 7742–7758 (2006).
172. Risley, A. L., Loughman, A., Cywes-Bentley, C., Foster, T. J. & Lee, J. C. Capsular Polysaccharide Masks Clumping Factor A–Mediated Adherence of *Staphylococcus aureus* to Fibrinogen and Platelets. *J. Infect. Dis.* **196**, 919–927 (2007).
173. Kiedrowski, M., Kavanaugh, J., Malone, C., Mootz, J., Voyich, J., Smeltzer, M., Bayles, K. & Horswill, A. Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **6**, 1-16 (2011).
174. Dastgheyb, S. S. & Otto, M. Staphylococcal adaptation to diverse physiologic niches: an overview of transcriptomic and phenotypic changes in different biological environments. *Future Microbiol.* **10**, 1981–1995 (2015).
175. Verbrugghe, E., Boyen, F., Gaastra, W., Bekhuis, L., Leyman, B., Van Parys,

- A., Haesebrouck, F. & Pasmans, F. The complex interplay between stress and bacterial infections in animals. *Vet. Microbiol.* **155**, 115–127 (2012).
176. Otto, M. *Staphylococcus epidermidis*—the 'accidental' pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 555–567 (2009).