

**Regulación catabólica por carbono de  
los factores de patogenicidad de  
*Clostridium perfringens* relacionados  
con la gangrena gaseosa.**

*Lic. en Biotecnología*

Marcelo B. Méndez

**Año 2013**

Tesis para la obtención del título de Doctor en Ciencias  
Biológicas,  
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas,  
Universidad Nacional de Rosario.

Dr. Roberto Grau  
*Director de Tesis*

Rosario, Octubre 2013.

**Marcelo Bernabé Méndez**  
Licenciado en Biotecnología  
Matrícula Doctorado 2005.25750146.00

**Doctor Roberto Grau**  
Director de tesis  
FCByF-UNR

## **Agradecimientos.**

A mis viejos y hermanos por la confianza que siempre me brindaron.

A mi familia... mis amores Gisel, Helena y Lucio que viene en camino, por el sustento, por no dejar que bajara los brazos, por ser mis guías espirituales.

A mis amigos... los de siempre y los nuevos, por no cambiar nunca, por los consejos, datos, asesoramiento... y fundamentalmente por eso que no se puede describir sencillamente.

A mi director de tesis, Roberto,... por la paciencia, el respeto, el compañerismo, la confianza y la oportunidad.

A mis tutores de tesis... por sus consejos y por soportar las idas y vueltas.

A Gabriela Michelini de la Secretaría de Postgrado por darme el sacudón a tiempo.

A todos los que de alguna manera formaron parte de esta tesis.

A mi mismo...

Agradecimiento especial a las fuentes de financiamiento: IFS (Internacional Foundation for Science, Suecia) que otorgó el primer subsidio para comenzar a trabajar con *Clostridium*; Fundación Antorchas, que dio el primer subsidio importante y prolongable en el tiempo que permitió continuar con los trabajos iniciados con *C. perfringens*; CONICET, FONCyT y ASM (American Society for Microbiology Undergraduate Research Fellowship y American Society for Microbiology International Fellowship) que continuaron con el apoyo brindado inicialmente por la IFS y Antorchas a esta línea de investigación del patógeno humano y animal *C. perfringens*.

## **Resultados difundidos relacionados a la presente tesis en congresos y revistas de investigación.**

**2005- Méndez, M.** and Grau, R. Role of Spo0A and Sigma H in survival of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *105<sup>th</sup> International Meeting of the American Society for Microbiology*. June 5-9<sup>th</sup>, Atlanta, USA.

**2006- Méndez, M.**, Sarker, M., and Grau, R. Role of Spo0A on biofilm formation and sliding motility in *Clostridium perfringens*. *Fifth International Congress on the Molecular Biology of Pathogenic Clostridia*. May 12-15<sup>th</sup>, UK.

**2006- Grau R., Méndez, M.**, and Sarker, M. Spo0A is essential for biofilm formation and swarming motility in the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *11<sup>th</sup> International Congress on Microbial Ecology, ISME 11*. August 20<sup>th</sup>, Vienna, Austria.

**2007- Méndez, M., Grau, R.** Carbon catabolite repression of Type IV pili-dependent gliding. Comunicación Oral, *XLIII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB)*. 31: MI-C16. 17 a 20 de noviembre, Mar del Plata, Argentina.

**2008- Méndez, M.**, Huang, I. H., Ohtani, K., Grau, R., Shimizu, T., Sarker, M. R. Carbon catabolite repression of Type IV pilus-dependent gliding motility in the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 190:48-60.

**2009- Méndez, M.**, Goñi, A. and Grau, R. Regulación catabólica por carbono de la producción de toxinas en *Clostridium perfringens* tipo A. *LIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)* y *LVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI)*. 18 a 21 de noviembre, Mar del Plata, Argentina.

**2010- Méndez, M.**, Ramirez, W., and Grau, R. Carbon catabolites inhibit PLC and PFO toxin production in the gas gangrene-producer *Clostridium perfringens*. *XII Congreso*

*Argentino de Microbiología y I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental*. 17 a 20 de octubre, Buenos Aires, Argentina.

**2012- Méndez, M. B., Goñi, A., Ramirez, W., Grau, R. R.** Sugar inhibits the production of the toxins that trigger clostridial gas gangrene. *Microbial Pathogenesis*. 52: 85-91.

## **Notas periodísticas relacionadas.**

**Jueves, 20 de julio de 2006.** *La Nación. Ciencia/Salud*. Hallazgo de investigadores argentinos. Avance contra el tétanos y el botulismo. <http://www.lanacion.com.ar/824707-avance-contra-el-tetanos-y-el-botulismo>.

**Lunes, 04 de febrero de 2008.** *La Nación. Ciencia/Salud*. Hallan el talón de Aquiles de la bacteria que produce la gangrena. <http://www.lanacion.com.ar/984290-hallan-el-talon-de-aquiles-de-la-bacteria-que-produce-la-gangrena>.

**Sábado, 16 de febrero de 2008.** *La Capital. La Ciudad*. Un docente de la UNR logró frenar la gangrena. <http://www.lacapital.com.ar/la-ciudad/Un-docente-de-la-UNR-logroacute-frenar-la-gangrena-20080217-0078.html#comentarios>.

## **Distinciones.**

### **Becas internacionales.**

**2004-American Society for Microbiology Undergraduate Research Fellowship.** Board of the Education of the American Society for Microbiology (ASM, Estados Unidos), Primera vez que la ASM otorga esta beca a un estudiante fuera de Estados Unidos. Beca que comprendía la realización de un trabajo experimental en Argentina y la posterior presentación en 105<sup>th</sup> International Meeting of the American Society for Microbiology, ASM, Atlanta, USA.

### **2005-American Society for Microbiology International Fellowship.**

ASM, Estados Unidos, Beca destinada a la realización de un trabajo de investigación llevado a cabo en el Department of Biomedical Sciences and Microbiology, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA. La investigación estuvo bajo la dirección del Dr. Matfuzur Sarker, referente internacional sobre el patógeno *C. perfringens*.

## **Abreviaturas utilizadas en la presente tesis en orden alfabético.**

ADI - arginina deiminasa.

ADN – ácido desoxiribonucleico.

ADNc – ácido desoxiribonucleico cadena complementaria.

ADP – adenosil difosfato.

AHL – acil homoserina lactona.

AI-2 - autoinductor tipo 2.

AIP – autoinductor peptídico.

ARN – ácido ribonucleico.

ARNm – ácido ribonucleico mensajero.

ARNr – ácido ribonucleico ribosomal.

ATP – adenosil trifosfato.

BHIA – brain heart infusion agar (agar infusión cerebro corazón).

BHIGA – brain heart infusion glucose agar (agar infusión cerebro corazón glucosa).

cAMP – adenosil monofosfato cíclico.

CcpA - catabolite control protein A (proteína de control por catabolito A).

CcpB - catabolite control protein B (proteína de control por catabolito B).

CcpC - catabolite control protein C (proteína de control por catabolito C).

CCR - carbon catabolite repression (represión por catabolito fuente de carbono).

c-di-GMP – guanosil monofosfato bicíclico.

cGMP – guanosil monofosfato cíclico.

Cm<sup>R</sup>- resistencia a Cloranfenicol.

CPE – *Clostridium perfringens* enterotoxin (enterotoxina de *C. perfringens*).

CRE – catabolite control element (elemento de control por catabolito).

DO - densidad óptica.

Em<sup>R</sup>- resistencia a Eritromicina.

EPS – exopolisacárido.

ETEC – entero toxigenic *Escherischia coli* (*E. coli* enterotoxigénica)

FBP – fructosa-1,6-bifosfato.

FQ – fibrosis quística.

FTG – fluid tioglycolate (caldo tioglicolato fluído).

GAS – group A *Streptococcus* (*Streptococcus* del grupo A).

GTP – guanosil trifosfato.

HprK/P – Hpr kinase/phosphatase (Hpr quinsa/fosfatasa).

HTH – helix-turn-helix (dominio hélice-vuelta-hélice).

IgA – inmunoglobulina A.

Kb – kilopares de bases.

KDa – kilo Daltons (1000 Daltons).

LB – Luria Bertani.

LPS – lipopolisacárido.

MOPS – morpholinepropanesulfonic acid (ácido morfolinopropanosulfónico).

pb – pares de bases.

PBS – phosphate buffer saline (buffer fosfato salino).

PCR - polimerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa).

PEP – phosphoenolpyruvate (fosfoenolpiruvato).

PFO – perfringolisina O.

PLC - fosfolipasa C.

PMNs – polimorfonucleares.

PNPG - para-nitrofenil- $\beta$ -D-glucurónico.

(p)ppGpp – (tri) difosfoguanina difosfato.

PTS – phosphoenolpyruvate-dependent phophotransferase system (sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpirubato).

QS – quorum sensing (sensado del quorum).

RT-PCR – reverse transcription-polimerase chain reaction (transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa).

RTX- repeat in toxins (repeticiones presentes en toxinas).

T<sub>0</sub> - inicio de la fase estacionaria de crecimiento.

T<sub>1</sub> - 1 h después del final de la fase exponencial de crecimiento de un cultivo.

T4P - Type four pili (pili Tipo IV).

TGY – Triptein glucose yeast extract (tripteína glucose extracto de levadura).

TGYA – Triptein glucose yeast extract agar (agar tripteína glucose extracto de levadura).

TNF- $\alpha$  – tumor necrosis factor  $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ).

Tris-HCl – tris (hidroximetil) aminometano hidroxiclورو (2-amino-2-hidroximetil – propano -1,3- diol hidroxiclورو).

TY – Triptien yeast extract (tripteína extracto de levadura).

TYA –Triptien yeast extract agar (agar tripteína extracto de levadura).

UFC – unidades formadoras de colonia.

VB1 y VB2 – VirR box1 y VirR box 2 (caja VirR 1 y 2).

## **Anglicismos utilizados en la presente tesis en orden alfabético.**

Gliding: movilidad bacteriana semejante a un “deslizamiento”.

Swarming: desplazamiento bacteriano en grupo o “enjambre” de células hiperflageladas.

Swimming: desplazamiento microbiano en medio líquido utilizando flagelo que recuerda al “nado”.

Twitching: movimiento bacteriano semejante a “crispaciones, contracciones, espasmos, o temblores”.

## Índice general de contenidos.

	<b>Pág.</b>
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción.</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Factores de patogenia bacteriana.</b>	<b>5</b>
1.1.1. Cápsula.	5
1.1.2. Pared celular.	6
1.1.3. Toxinas.	9
1.1.4. Adhesinas.	10
1.1.5. Invasión.	12
1.1.6. Modos de vida intracelulares.	13
1.1.7. Regulación de factores de virulencia.	15
1.1.7.1. Factores sigma.	15
1.1.7.2. Sistema de dos componentes.	16
1.1.8. Pili tipo IV.	17
1.1.9. Biofilms.	24
1.1.10. Movilidad bacteriana.	27
1.1.10.1. Regulación de los desplazamientos bacterianos dependientes de T4P.	33
1.1.10.2. Funciones bacterianas dependientes de la movilidad twitching.	35
<b>1.2. Metabolismo bacteriano y patogenia.</b>	<b>35</b>
1.2.1. Competencia por el alimento.	36
1.2.2. Desafíos medioambientales dentro de los hospedadores.	36
1.2.3. Interacciones metabólicas dinámicas entre hospedadores y patógenos.	37
1.2.4. Los genes metabólicos ayudan a las bacterias patógenas a colonizar nuevos territorios.	37
1.2.5. Las bacterias patógenas pueden experimentar adaptaciones	39

metabólicas.	
<b>1.3. Represión catabólica.</b>	<b>40</b>
1.3.1. Represión catabólica por carbono mediada por reguladores específicos.	43
1.3.2. Mecanismos de CCR entre otras bacterias.	44
1.3.3. CCR regula comportamientos sociales y patogenicidad en bacterias.	45
<b>1.4. <i>Clostridium perfringens</i>.</b>	<b>46</b>
1.4.1. Pili tipo IV, movilidad y formación de biofilms en <i>C. perfringens</i> .	48
1.4.2. La gangrena gaseosa producida por <i>C. perfringens</i> .	51
1.4.3. Regulación de la producción de toxinas en <i>C. perfringens</i> .	55
1.4.4. Regulación catabólica de la producción de toxinas en <i>Clostridium</i> .	58
<b>1.5. Hipótesis de trabajo de la presente tesis.</b>	<b>58</b>
<b>2. Objetivos.</b>	<b>62</b>
<b>2.1. Objetivos secundarios destinados al cumplimiento del objetivo principal.</b>	<b>63</b>
<b>3. Materiales y métodos.</b>	<b>64</b>
<b>3.1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.</b>	<b>65</b>
<b>3.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.</b>	<b>66</b>
<b>3.3. Mantenimiento de las cepas bacterianas.</b>	<b>68</b>
<b>3.4. Ensayos de movilidad en placa.</b>	<b>68</b>
3.4.1. Generación de gradiente de glucosa en placa.	68
<b>3.5. Plásmidos empleados en este trabajo.</b>	<b>69</b>
3.5.1. Construcción de los plásmidos reporteros <i>gusA</i> .	70
3.5.2. Construcción de plásmido complementante de CcpA.	71
<b>3.6. Ensayos de actividad <math>\beta</math>-glucuronidasa.</b>	<b>72</b>
3.6.1. Determinación cuantitativa.	72
3.6.2. Recolección de muestras.	72
3.6.3. Medición de la actividad $\beta$ -glucuronidasa.	72

<b>3.7. Antibióticos.</b>	<b>73</b>
<b>3.8. Determinación del número de células vegetativas y de esporas.</b>	<b>74</b>
<b>3.9. Electroporación de <i>C. perfringens</i>.</b>	<b>75</b>
<b>3.10. Transformación de <i>E. coli</i>.</b>	<b>75</b>
<b>3.11. Preparación de ADN genómico de <i>C. perfringens</i>.</b>	<b>76</b>
<b>3.12. Obtención de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>.</b>	<b>77</b>
<b>3.13. Digestión con enzimas de restricción.</b>	<b>77</b>
<b>3.14. Determinación de la actividad de las toxinas producidas por <i>C. perfringens</i>.</b>	<b>78</b>
3.14.1. Medición de la actividad lipasa.	<b>78</b>
3.14.2. Medición de la actividad hemolítica.	<b>78</b>
3.14.3. Preparación de medios de cultivo tamponados para estudio de las toxinas PLC y PFO.	<b>79</b>
<b>3.15. Estudio de la expresión génica mediante evaluación de ARN mensajeros específicos.</b>	<b>79</b>
3.15.1. Extracción y cuantificación de ARN de <i>C. perfringens</i> .	<b>79</b>
3.15.2. Transcripción reversa y amplificación a partir de ARN total.	<b>80</b>
3.15.3. Determinación de la intensidad de banda en gel por análisis de imágenes.	<b>81</b>
<b>3.16. Construcción de la cepa mutante en CcpA.</b>	<b>81</b>
3.16.1. Southern blot de la mutante KO13.	<b>82</b>
<b>3.17. Análisis de secuencias genómicas para determinar la presencia de sitios CRE.</b>	<b>85</b>
<b>4. Capítulo Primero: Represión catabólica de la movilidad tipo gliding en <i>Clostridium perfringens</i>.</b>	<b>87</b>
<b>4.1. La glucosa reprime la movilidad tipo gliding de cepas salvajes de <i>C. perfringens</i> aisladas de infecciones humanas y animales.</b>	<b>88</b>
<b>4.2. Represión catabólica por carbono de la movilidad gliding de <i>C. perfringens</i>.</b>	<b>95</b>
<b>4.3. Cinética de la movilidad tipo gliding dependiente de T4P en <i>C. perfringens</i>.</b>	<b>97</b>
<b>4.4. Efecto de la glucosa sobre la expresión de los genes <i>pilT</i> y <i>pilD</i> en cepa de</b>	<b>100</b>

<b><i>C. perfringens</i> productora de gangrena gaseosa.</b>	
<b>4.5. Rol dual de la proteína reguladora CcpA en la movilidad gliding de <i>C. perfringens</i>.</b>	<b>103</b>
<b>5. Capítulo Segundo: Los carbohidratos inhiben la producción de toxinas esenciales para la iniciación y establecimiento de la gangrena gaseosa.</b>	<b>109</b>
5.1. La producción de toxina alfa y toxina theta es inhibida por la presencia de azúcares en <i>C. perfringens</i> .	111
5.2. La expresión de los genes codificantes de las toxinas PLC y PFO es reprimida por azúcares.	113
5.3. La represión por catabolito de carbono de la toxina alfa y la toxina theta está bajo el control de CcpA en <i>C. perfringens</i> .	116
<b>6. Capítulo Tercero: Regulación de los genes de las toxinas PLC, PFO y del T4P por CcpA en <i>C. perfringens</i>.</b>	<b>120</b>
6.1. Regulación de genes <i>plc</i> y <i>pfoA</i> codificantes de las toxinas desencadenantes de la gangrena gaseosa.	121
6.1.1. Regulación de la producción de PFO por catabolito de carbono.	124
6.1.2. Regulación de la expresión de <i>plc</i> por CcpA.	129
6.1.3. Control por CcpA de reguladores globales de la producción de toxinas dependientes de la densidad celular en <i>C. perfringens</i> .	130
6.2. Regulación de los genes para la biosíntesis del T4P.	131
6.2.1. Regulación por CcpA del pili tipo IV en <i>C. perfringens</i> .	138
<b>7. Discusión.</b>	<b>140</b>
<b>8. Conclusión.</b>	<b>153</b>
<b>9. Bibliografía.</b>	<b>155</b>

## Índice de Figuras y Tablas.

	Pág.
<b>Figura 1:</b> Estructuras generales en bacterias.	8
<b>Figura 2:</b> Representaciones esquemáticas de dos sistemas de transducción de señales de dos componentes involucrados en la patogenia microbiana.	17
<b>Figura 3:</b> Esquemas de las estructuras de los T4P.	22
<b>Figura 4:</b> Mapa físico del locus de T4P en bacterias Gram-positivas.	23
<b>Figura 5:</b> Biofilms producidos por distintas cepas de <i>B. subtilis</i> en la interface aire-líquido de cultivo estacionarios.	27
<b>Figura 6:</b> Movilidad bacteriana.	31
<b>Figura 7:</b> Representación esquemática del control por catabolito carbonado.	42
<b>Figura 8:</b> Foto ilustrativa de la generación de gases durante el crecimiento de <i>C. perfringens</i> .	47
<b>Tabla 1:</b> Principales toxinas producidas por <i>C. perfringens</i> .	48
<b>Figura 9:</b> Genes involucrados en la síntesis y función del T4P en <i>C. perfringens</i> .	49
<b>Figura 10:</b> Esquema representando la regulación de toxinas mediante el sistema de dos componentes VirR/VirS en <i>C. perfringens</i> Cepa 13 (gangrena gaseosa).	56
<b>Figura 11:</b> Esquema representando las etapas supuestas que seguiría el proceso infeccioso de la gangrena gaseosa provocada por <i>C. perfringens</i> .	60
<b>Tabla 2:</b> Cepas y plásmidos usados en este estudio.	65
<b>Tabla 3:</b> Medios de cultivo.	67
<b>Figura 12:</b> Plásmido pJIR751, vector de replicación en <i>E. coli</i> y en <i>C. perfringens</i> .	69
<b>Figura 13:</b> Plásmido reportero pMRS127, vector de replicación en <i>E. coli</i> y en <i>C. perfringens</i> .	70
<b>Figura 14:</b> Construcción y caracterización molecular de la cepa mutante knock-out en <i>ccpA</i> de <i>C. perfringens</i> (KO13, Tabla 2).	83
<b>Tabla 4:</b> Cebadores oligonucleótidos usados en este estudio.	84
<b>Figura 15:</b> La glucosa reprime la movilidad gliding de <i>C. perfringens</i> .	90
<b>Figura 16:</b> La glucosa reprime la movilidad gliding de distintas cepas de <i>C. perfringens</i> aisladas de diferentes patologías y hospedadores.	91

<b>Figura 17:</b> Efecto represivo dosis respuesta de la glucosa (Glu) sobre la capacidad de movilidad gliding de <i>C. perfringens</i> .	<b>92</b>
<b>Figura 18:</b> Evaluación de la concentración mínima de glucosa requerida para inhibir el desarrollo del gliding de <i>C. perfringens</i> .	<b>94</b>
<b>Figura 19:</b> Efecto de carbohidratos simples y complejos sobre la movilidad gliding de <i>C. perfringens</i> .	<b>96</b>
<b>Figura 20:</b> Cinética del desarrollo del gliding de la Cepa 13 de <i>C. perfringens</i> productora de gangrena gaseosa en ausencia y presencia de glucosa.	<b>99</b>
<b>Figura 21:</b> La glucosa reprime la transcripción de <i>pilT</i> y <i>pilD</i> en cepas de <i>C. perfringens</i> productoras de la gangrena gaseosa y contaminación de alimentos.	<b>101</b>
<b>Figura 22:</b> Medición por RT-PCR de la expresión de genes para la biosíntesis del pili Tipo IV en <i>C. perfringens</i> .	<b>102</b>
<b>Figura 23:</b> CcpA media la represión por catabolito de carbono del gliding en <i>C. perfringens</i> .	<b>104</b>
<b>Figura 24:</b> RT-PCR para los niveles de transcritos de <i>pilA1</i> , <i>pilA2</i> y <i>pilT</i> en la cepa mutante <i>ccpA</i> .	<b>105</b>
<b>Figura 25:</b> CcpA tiene un nuevo rol positivo independiente de catabolito en la movilidad gliding de <i>C. perfringens</i> .	<b>107</b>
<b>Figura 26:</b> Los azúcares regulan la producción de PLC y PFO en <i>C. perfringens</i> .	<b>112</b>
<b>Figura 27:</b> Los azúcares producen represión por catabolito de carbono de la expresión de los genes <i>plc</i> y <i>pfoA</i> en <i>C. perfringens</i> causante de gangrena gaseosa.	<b>115</b>
<b>Figura 28:</b> CcpA media la represión catabólica por azúcar de la producción de la toxina alfa (PLC) y la toxina theta (PFO) en <i>C. perfringens</i> productor de gangrena gaseosa.	<b>118</b>
<b>Figura 29:</b> CcpA juega un rol clave sobre la producción de toxinas relacionadas con la gangrena gaseosa en <i>C. perfringens</i> .	<b>119</b>
<b>Figura 30:</b> Regulación de las toxinas PLC y PFO en <i>C. perfringens</i> Cepa 13.	<b>123</b>
<b>Tabla 5:</b> Secuencias CRE reportadas en la bibliografía y secuencias halladas por análisis informático en <i>C. perfringens</i> Cepa 13.	<b>125</b>
<b>Figura 31:</b> Secuencia de las regiones promotoras de los genes <i>pfoA</i> , <i>virU</i> y <i>virT</i> de <i>C. perfringens</i> Cepa 13 (gangrena gaseosa).	<b>128</b>
<b>Figura 32:</b> Región promotora de <i>plc</i> de <i>C. perfringens</i> Cepa 13.	<b>130</b>
<b>Figura 33:</b> Regulación de la biosíntesis y funcionalidad del T4P.	<b>135</b>
<b>Figura 34:</b> Locus génico para la biosíntesis del T4P en <i>P. aeruginosa</i> y <i>M. xanthus</i> .	<b>136</b>

<b>Figura 35:</b> Arreglo de genes <i>pil</i> en el cromosoma de <i>C. perfringens</i> Cepa 13 causante de la gangrena gaseosa.	<b>139</b>
<b>Figura 36:</b> Relevancia de los azúcares en el tratamiento de heridas.	<b>147</b>
<b>Figura 37:</b> Modelo representando la interconexión entre reguladores maestros de virulencia y metabólicos: sistema de dos componentes VirR/S y CcpA.	<b>149</b>
<b>Figura 38:</b> Esquema que muestra el estudio global de la virulencia de <i>C. perfringens</i> .	<b>152</b>

## Resumen.

*Clostridium perfringens* es una bacteria anaeróbica, Gram-positiva, formadora de esporas, responsable de la producción de severas enfermedades histotóxicas y gastrointestinales en humanos y animales. *C. perfringens* es capaz de producir varias toxinas, dos de las cuales son las principales implicadas en la patología conocida como gangrena gaseosa. Debido a que esta bacteria posee un metabolismo sacarolítico-fermentativo y porque la regulación catabólica por carbono está implicada en el control de diferentes comportamientos bacterianos, este trabajo investigó los efectos de la glucosa y otros carbohidratos rápidamente metabolizables sobre la movilidad tipo gliding y la producción de las toxinas fosfolipasa C (PLC) y la perfringolisina O (PFO), fundamentales para el desarrollo de la gangrena gaseosa. Los resultados obtenidos demuestran que la regulación catabólica por carbono constituye un importante mecanismo regulatorio fisiológico que reduce la capacidad de moverse por gliding de la cepa de *C. perfringens* causante de la gangrena gaseosa (Cepa 13), así como de un gran número de aislados patogénicos de esta bacteria derivados de humanos y animales. La inhibición del gliding en presencia de glucosa fue debida, al menos en parte, a la represión de genes involucrados en la biosíntesis y funcionalidad del pili tipo IV (T4P), el cual es requerido para la movilidad tipo gliding. El efecto inhibitorio de la glucosa sobre los genes del T4P *pilT* y *pilD* se encuentra bajo el control de la proteína reguladora CcpA (catabolite control protein A). La deficiencia en CcpA en la cepa de *C. perfringens* mutante en *ccpA* restaura la expresión de *pilT* y *pilD* en presencia de concentraciones represivas de glucosa. La expresión de PLC y PFO en cultivos de la cepa productora de la gangrena gaseosa, Cepa 13, también es reprimida catabólicamente por carbono. La glucosa produce una fuerte inhibición dosis-dependiente del gliding y una reducción de más del 50 % en la producción de las histotoxinas PLC y PFO sin afectar el crecimiento vegetativo del patógeno. La represión de los genes *plc* y *pfoA* dependió también de CcpA, ya que una cepa deficiente en este regulador no presenta inhibición de la expresión de PLC en presencia de glucosa 2 %. Además, se observaron dos fenómenos novedosos, por un lado se descubrió que CcpA tiene un rol positivo en la expresión de *pilT*, *pilD* y la capacidad de moverse por gliding en ausencia de regulación catabólica. El otro fenómeno fue el efecto negativo que ejerce CcpA sobre la producción de toxinas, debido a que en la cepa deficiente en CcpA, PLC y PFO se expresan en un nivel superior al observado en la cepa salvaje en ausencia de regulación

catabólica. CcpA actuaría, de acuerdo a las condiciones experimentales y fisiológicas de la célula, como un regulador positivo y negativo (en ausencia y presencia de catabolitos, respectivamente) del gliding, siendo un represor de la producción de toxinas en condiciones de regulación catabólica por carbono.

# **1. Introducción.**

## 1. Introducción.

Todo microorganismo en el planeta tiene como objetivo sobrevivir y multiplicarse para preservarse en el tiempo. Es por esto, que a lo largo de la evolución, las bacterias han colonizado y se han adaptado eficientemente a diversos nichos planetarios. Dentro de la plétora de bacterias, encontramos a las que son patógenas para otros seres vivos como ser plantas, animales y/o para el hombre. Dentro de este conjunto de microorganismos, hay bacterias que no solo poseen la capacidad de sobrevivir y, muchos de ellas, de multiplicarse en nichos abióticos sino que también tienen la habilidad de colonizar y reproducirse en ambientes bióticos ricos en nutrientes (plantas, animales, seres humanos). Para poder establecerse en los distintos hospedadores, las bacterias patógenas poseen estrategias evolutivamente perfeccionadas destinadas a contrarrestar los distintos sistemas de defensa propios de cada blanco biológico, así como para obtener nutrientes a partir de componentes celulares y estructurales del hospedador infectado. Las distintas estrategias de patogenia pueden agruparse tentativamente dentro de las siguientes categorías: las relacionadas con la adherencia del patógeno, las de evasión de los sistemas inmunes, las de obtención de nutrientes y crecimiento, las de colonización, las involucradas en la movilidad bacteriana y las de persistencia a largo plazo en el hospedador.

Muchas bacterias patógenas tienen la capacidad de adherirse a los tejidos de los hospedadores a quienes infectan. Esta propiedad es muy importante en las etapas iniciales de las infecciones causadas por los microorganismos que presentan esta cualidad. La importancia radica en el hecho de que al adherirse estas bacterias pueden permanecer en el lugar determinado donde pueden prosperar. Luego de esta primera etapa de adherencia tienen lugar distintos mecanismos para asegurar la persistencia en este nicho biológico. Entre ellos encontramos las estrategias para evadir el sistema inmune del hospedador (inhibición de la respuesta inmune, biofilm, cambio de determinantes antigénicos, entrada en el citosol celular, persistencia en macrófagos). Además, mecanismos involucrados en la obtención de los nutrientes del medio circundante para asegurar la proliferación y persistencia bacteriana (toxinas, proteasas y otras enzimas que degradan componentes de matriz extracelular y celulares).

Si el microorganismo patógeno logra superar las biodefensas y es capaz de crecer en el medioambiente biológico del hospedador, puede entonces establecerse y de esta manera colonizar el sitio de la infección. El paso siguiente es la diseminación a otros

tejidos y órganos, en este proceso cobra importancia las propiedades de desplazamiento bacteriano. Como último objetivo, principalmente para aquellos microorganismos que no son capaces de proliferar en otros ambientes distintos al del organismo que infectan, la persistencia a largo plazo en el hospedador asegura la supervivencia por tiempos prolongados. De no ser así deben ser capaces de sobrevivir en el medio abiótico lo suficiente para poder contactar con otro hospedador y así poder dividirse e incrementar su número para así persistir.

## **1.1. Factores de patogenicidad bacteriana.**

### **1.1.1. Cápsula.**

Algunas bacterias sobreproducen y secretan grandes cantidades de polisacáridos de alto peso molecular, llamados exopolisacáridos (EPS). Esta capa de azúcares extracelulares es llamada cápsula. La producción de cápsula es uno de los principales factores de virulencia utilizado por las bacterias para evadir la erradicación desde el sitio de la infección. Especialmente, la cápsula otorga a la bacteria protección del sistema inmune del hospedador así como de los antibióticos (Figura 1A). Algunas cápsulas han mostrado tener efecto inmuno modulador; otras protegen a la bacteria de la fagocitosis evitando que los anticuerpos opsonizantes sean reconocidos por las células defensivas del hospedador (por ejemplo, macrófagos y neutrófilos). Esta fagocitosis frustrada promueve la respuesta inflamatoria ya que los macrófagos y los neutrófilos producen más citoquinas inflamatorias destinadas a eliminar la bacteria. El incremento de la respuesta inflamatoria conduce a un incremento del daño del tejido a medida que más neutrófilos y macrófagos son reclutados en el sitio de infección (Wilson, J. M. et al., 2002).

Las especies de bacterias productoras de cápsula más notorias son *Streptococcus pneumoniae* (Pneumococcus), *Neisseria meningitidis* (Meningococcus) y *Pseudomonas aeruginosa*. La cápsula de Pneumococcus es uno de sus factores de virulencia primarios, utilizando 24 genes para su biosíntesis. Hay al menos 90 tipos diferentes de cápsulas, aunque solo un subgrupo de 23 tipos causan más del 90% de las enfermedades invasivas alrededor del mundo. Las diferencias en la estructura química del polisacárido capsular determinan los serogrupos de Meningococcus. Los serogrupos B, C, Y y W-135 expresan cápsulas compuestas enteramente de ácido polisiálico y ácido siálico

unido a glucosa y galactosa, mientras que la cápsula del serogrupo A está compuesto de N-acetilmanosamina-1-fosfato. La cápsula de *P. aeruginosa* está compuesta de alginato (ácido manurónico y gulurónico acetilado). Las proteínas biosintéticas para alginato han sido elucidados, muchas de las cuales están involucrados en la regulación génica de producción de alginato. La característica única de las cepas de *P. aeruginosa* es que todas tienen la capacidad génica de producir alginato pero se encuentra más frecuentemente en los aislados de fibrosis quística. Aunque estas cápsulas tienen diferentes composiciones químicas y efectos inmuno moduladores, todas sirven para proteger a la bacteria de la respuesta inflamatoria del hospedador, como ser la activación del complemento y la muerte mediada por fagocitos (Wilson, J. M. et al., 2002).

### **1.1.2. Pared celular.**

Las bacterias pueden dividirse en dos grupos principales basados en las diferencias en la estructura de la pared celular: Gram-positivas y Gram-negativas (Figura 1B y 1C). Las pared celular de ambos tipos de bacterias contiene componentes tóxicos que son factores de virulencia potentes y tiene un rol central en la patogénesis de bacterias que producen shock séptico (condición frecuentemente letal que involucra el colapso del sistema circulatorio y puede resultar en la falla de múltiples órganos). A diferencia de las toxinas convencionales descritas más adelante, las cuales son producidas por la bacteria y secretadas al medio circundante (exotoxinas), los componentes tóxicos de la pared celular de procariontes son las distintas estructuras que no son liberadas apreciablemente al medio extracelular sino hasta que la célula muere y se lisa la bacteria. Irónicamente, los antibióticos usados en el tratamiento de las sepsis pueden incrementar la cantidad de componentes tóxicos de pared celular liberados, y por lo tanto impacta negativamente en la recuperación del hospedador. Se cree, que las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas podrían activar vías comunes que conducen al shock séptico (Wilson, J. M. et al., 2002).

El shock séptico es el resultado de la acción combinadas de citoquinas, de componentes del complemento y de elementos de la cascada de coagulación. Un evento que gatilla el shock séptico es la liberación de lipopolisacáridos (LPS) u otros componentes tóxicos de la pared celular bacteriana en la circulación. El LPS bacteriano

(también conocido como endotoxina) es una molécula anfifílica embebida en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y se la considera generalmente como el principal componente responsable de la inducción del shock séptico, el cual frecuentemente acompaña a infecciones severas con estos microbios. El receptor primario del LPS en el hospedador es CD14, un marcador celular superficial de los macrófagos. El lípido A, la porción tóxica de la molécula de LPS, causa la liberación de numerosas citoquinas pro-inflamatorias y activa las cascadas de complemento y coagulación. Estudios recientes sugieren que receptores tipo Toll, citoquinas inflamatorias, eicosanoides, radicales libres, el factor inhibitorio de la migración del macrófago, protein quinasas de señal y factores de transcripción, todos juegan un rol importante en la patología del shock séptico mediado por Gram-negativas (Wilson, J. M. et al., 2002).

Mientras que la endotoxina media eventos claramente importantes en la reacción del hospedador durante las infecciones por Gram-negativas, las Gram-positivas pueden producir también el shock séptico y se las considera como las principales responsables de las sepsis nosocomiales. Las bacterias Gram-positivas no tienen endotoxina, pero la sola presencia de estas bacterias en los tejidos y en el sistema circulatorio provoca una respuesta inflamatoria y shock séptico similar a la generada por el LPS de Gram-negativas, siendo liberadas las mismas citoquinas elicidadas por el LPS. Esto se debe, en parte, a que los fragmentos de peptidoglicano y los ácidos teicoicos que se encuentran en la pared celular de las bacterias Gram-positivas elicitan muchas de las respuestas fisiológicas inducidas por el LPS en el hospedador infectado. El peptidoglicano y los ácidos teicoicos (polímeros de azúcares alcohol fosfato) son los principales potenciadores del shock séptico. Los componentes tóxicos de la pared celular de Gram-negativas y Gram-positivas actúan principalmente a través de la activación de la respuesta inflamatoria mediante la estimulación de monocitos y macrófagos, y la subsecuente liberación de citoquinas pro-inflamatorias, especialmente del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y de la interleuquina-1. Además, tanto la endotoxina como el peptidoglicano pueden activar la cascada de complemento, la cual induce la liberación de TNF- $\alpha$  a partir de monocitos y estimula la agregación de neutrófilos polimorfonucleares y la vasoconstricción pulmonar. Por lo tanto, independientemente de si la infección es causada por una bacteria Gram-positiva ó Gram-negativa, los signos y síntomas son similares (Wilson, J. M. et al., 2002).

Las bacterias que frecuentemente están implicadas en el shock séptico incluyen los microorganismos Gram-negativos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y Meningococo; y los Gram-positivos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y Streptococo (Wilson, J. M. et al., 2002).

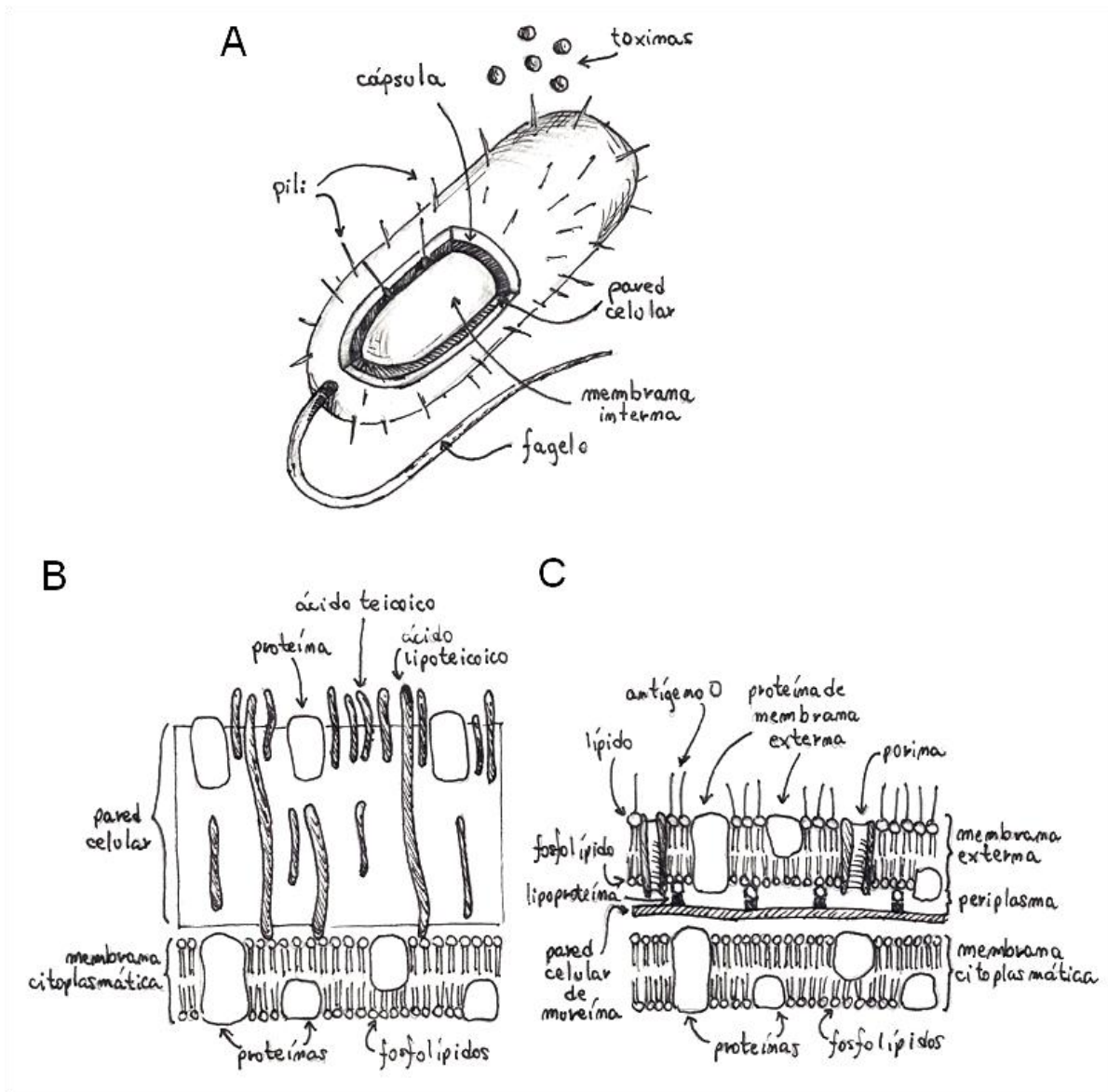


Figura 1: Estructuras generales en bacterias. A) Estructuras microbianas y toxinas implicadas en la patogenia bacteriana. B) Esquema del corte transversal de la pared y membrana celular de bacterias Gram-positivas. C) Esquema del corte transversal de la pared y membrana celular de bacterias Gram-negativas.

### 1.1.3. Toxinas.

Las toxinas son análogas a las armas biológicas, son moléculas proteínicas o no, producidas por las bacterias para destruir o dañar las células del hospedador. Ejemplos de toxinas no proteicas son el LPS (endotoxina) y el ácido teicoico. Las toxinas protéicas (exotoxinas) son generalmente enzimas que son secretadas hacia las células eucariotas por dos métodos diferentes: secreción en el medioambiente circundante (Figura 1A) o inyección directa en el citoplasma a través de sistemas de secreción tipo III u otros mecanismos. La exotoxinas bacterianas pueden ser categorizadas dentro de cuatro tipos principales basados en su composición de aminoácidos y función: toxinas A-B, toxinas proteolíticas, toxinas formadoras de poros y otras toxinas (Wilson, J. M. et al., 2002).

Varias especies diferentes de bacterias contienen toxinas A-B, incluyendo *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Bordetella pertussis*. Las toxinas A-B tienen dos componentes: la subunidad A que posee la actividad enzimática, y la subunidad B la cual es responsable de la unión y la liberación de la toxina dentro de la célula del hospedador. La actividad enzimática de la porción A va desde la proteolítica (por ejemplo, tétano y botulismo) a ADP-ribosilante (por ejemplo, cólera, pertusis, difteria y la exotoxina A de *P. aeruginosa*). A pesar del rango de actividades enzimáticas de las porciones A de numerosas toxinas A-B, hay un dinucleótido adenina nicotinamida conservado uniendo porciones en la subunidad A, sugiriendo que podría haber un ancestro evolutivo común (Wilson, J. M. et al., 2002).

Las toxinas proteolíticas destruyen proteínas del hospedador específicas, dando algunas de las manifestaciones clínicas características de la enfermedad. Ejemplos de toxinas proteolíticas incluyen: toxina tetánica de *Clostridium tetani* (Marvaud, J. et al., 1998), la toxina botulínica de *Clostridium botulinum* (Marvaud, J., Gilbert, K. et al., 1998), la elastasa y proteasa IV de *P. aeruginosa*. Los blancos para las toxinas tetánica y botulínica son las sinaptobrevinas que previenen la liberación de neurotransmisores, resultando en diferentes tipos de parálisis. Estas dos toxinas también difieren en sus sitios de afección, el botulismo se da por ingestión y causa la parálisis flácida en nervios periféricos, mientras el tétano se produce por heridas profundas y resulta en parálisis espástica a través del sistema nervioso central. La elastasa y proteasa IV de *P. aeruginosa* destruyen las proteínas de matriz extracelular permitiendo la diseminación de la infección. La elastasa es un importante factor de virulencia en neumonía por *P.*

*aeruginosa*, mientras que la proteasa IV es importante en las infecciones corneales (Wilson, J. M. et al., 2002).

Las toxinas que desestabilizan membranas se encuentran en numerosas especies de bacterias y son capaces de formar un poro en la membrana celular del hospedador, lo cual lleva finalmente a la lisis celular. Hay un número creciente de toxinas formadoras de poro incluidas en la familia RTX (repetición en toxinas, típicamente un nonapéptido rico en glicina y aspartato que uniría iones  $\text{Ca}^{2+}$ , Linhartová, I et al., 2010) encontrada en muchos patógenos Gram-negativos. Aunque el mecanismo general de la formación del poro y las secuencias son conservadas en la familia RTX, la especificidad por la célula blanco varía. Las toxinas de la familia RTX, además, comparten al sistema de secreción tipo I como método común por el cual son liberadas. Muchas bacterias Gram-positivas contienen citolisinas con un sulfidriilo activado. La mejor caracterizada entre estas citolisinas de Gram-positivas es la listeriolisina O, la cual es necesaria para el escape de *Listeria monocytogenes* del macrófago (Wilson, J. M. et al., 2002).

Además de las toxinas A-B, otras incluyen: proteínas tipo inmunoglobulina A (IgA) proteasas, toxinas estables al calor que activan la guanilato ciclasa, y toxinas que modifican el citoesqueleto de la célula hospedadora. Las bacterias son capaces de utilizar muchos métodos diferentes para interferir en las vías de señalización y la integridad estructural de la célula hospedadora para conseguir el establecimiento y mantenimiento de la infección (Wilson, J. M. et al., 2002).

#### **1.1.4. Adhesinas.**

Un paso clave en la interacción patógeno-hospedador es la adherencia del patógeno a la superficie del hospedador. Estas superficies incluyen: piel, membranas mucosas (cavidad oral, nasofaríngea, tracto urogenital), y tejidos profundos (tejido linfoide, epitelio gástrico e intestinal, cerco alveolar, tejido endotelial). Numerosas fuerzas mecánicas producidas por el hospedador actúan para remover los microbios de estas superficies: secreción de saliva, toz, estornudos, movimiento de mucus, peristalsis y el flujo sanguíneo. Un aspecto común de los patógenos microbianos es la expresión de factores de unión a moléculas sobre distintas células del tejido hospedador que le otorgan al microorganismo la capacidad de resistir a los mecanismos de remoción. Una vez unido o adherido a la superficie de una célula hospedadora específica, el patógeno

es capaz de iniciar sus procesos bioquímicos específicas como ser proliferación, secreción de toxinas, invasión de la célula hospedadora y activación de las cascadas de señalización celular, que darán lugar a la enfermedad (Wilson, J. M. et al., 2002).

Los factores de adherencia microbianos son llamados adhesinas y pueden ser polipéptidos (proteínas) o polisacáridos (carbohidratos y azúcares). Las adhesinas proteicas son separadas en dos grupos: las fimbriales y las afimbriales. Las fimbrias (también conocidas como pili) son apéndices que protruyen como estructuras similares a cabello desde la superficie bacteriana y están compuestas de proteínas que son empaquetadas apretadamente en un arreglo semejante a un cilindro helicoidal. Una simple proteína sirve generalmente como la principal subunidad fimbrial, sin embargo, otras proteínas también tienen roles estructurales en la punta y en la base de la fimbria. Frecuentemente, la punta fimbrial sirve para unir al receptor celular del hospedador. Los patógenos Gram-negativos, en particular, dependen de fimbrias para adherirse. Los ejemplos incluyen *E. coli* (para infecciones del tracto urinario y gastroenteritis) *V. cholerae*, *P. aeruginosa* y *Neisseria* spp. Las adhesinas afimbriales hacen referencia a proteínas que sirven como factores de adherencia, pero que no forman una estructura larga y polimérica tipo fimbria. Estas adhesinas no fimbriadas generalmente median más un contacto íntimo entre el patógeno y la célula del hospedador que el llevado a cabo por fimbrias. Las Gram-negativas (*Yersinia pseudotuberculosis*, *E. coli* enteropatógena y *Neisseria* spp), las Gram-positivas (*Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp) y patógenos mycobacteriales expresan adhesinas afimbriales. Las adhesinas constituidas por polisacáridos son generalmente componentes de la membrana celular, la pared celular o la cápsula bacteriana. Los ácidos teicoicos hallados en las envolturas celulares de bacterias Gram-positivas sirven como adhesinas para *Staphylococcus* spp y *Streptococcus* spp. Los polisacáridos encontrados en la cápsula de Mycobacterias (glucanos y mananos) son también reconocidos por receptores celulares del hospedador (receptor 3 del complemento y receptor de manosa) y promueven la adhesión (Wilson, J. M. et al., 2002).

Aunque las interacciones receptor-ligando durante la adherencia pueden dividirse en dos grupos, proteína-proteína y proteína-carbohidrato, es importante contemplar la diversidad de blancos que los microorganismos usan como receptores del hospedador. Las moléculas que sirven como receptores para bacterias incluyen proteínas que atraviesan la membrana celular, inmunoglobulinas de superficie, glicolípidos, glicoproteínas y proteínas de matriz extracelular (tal como fibronectina y colágeno). En

al menos un caso (*E. coli* enteropatógena), el patógeno inyecta su propia proteína receptora en la célula del hospedador. Una vez que se encuentra en la membrana, el receptor une luego a una adhesina afimbrial sobre la superficie de la bacteria. Es importante tener en cuenta que un simple patógeno expresa y utiliza más de una adhesina. Esta estrategia se observa en todos los tipos y especies bacterianas, Gram-negativas, Gram-positivas y Mycobacterias. Dada la importancia de la adherencia en los procesos infecciosos, actualmente gran parte de la investigación en terapias antimicrobianas está focalizada en el desarrollo de vacunas o drogas que bloqueen la etapa de adherencia en el ciclo de la infección (Wilson, J. M. et al., 2002).

### **1.1.5. Invasión.**

Una vez unidos a la superficie del hospedador, algunos patógenos ganan un acceso más profundo dentro del hospedador para perpetuar el ciclo de infección. Este proceso patogénico, denominado invasión, se puede dividir en dos tipos, extracelular y intracelular. La invasión extracelular tiene lugar cuando el microbio sobrepasa las barreras de un tejido para diseminarse en el hospedador mientras permanece fuera de las células del organismo infectado. Esta es una estrategia usada por el grupo A de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico y *S. aureus*. Estas especies secretan varias enzimas que degradan las moléculas celulares del hospedador: hialuronidasas (cortan proteoglicanos en el tejido conectivo), streptoquinasa y staphyloquinasa (destruyen coágulos de fibrina), lipasas (degradan grasas del hospedador acumuladas) y nucleasa (digieren ARN y ADN libre). La hemólisis producida por estas especies lisa no solo los eritrocitos sino también otros tipos de células y puede contribuir a la diseminación por los tejidos de hospedador. *P. aeruginosa* secreta una enzima, elastasa, la cual degrada moléculas extracelulares y permite la invasión de tejido ocasionando queratitis, necrosis tisular y fibrosis quística. Las invasiones extracelulares permiten a estos patógenos acceder a nichos en tejidos donde son capaces de proliferar, expresar toxinas, iniciar respuestas inflamatorias y diseminarse a otros lugares del cuerpo. Hay evidencia creciente que sugiere que los patógenos de invasión extracelular podrían ingresar en las células del hospedador y por lo tanto usar las dos vías de invasión, la extracelular y la intracelular.

La invasión intracelular tiene lugar cuando el microorganismo realmente penetra en las células del tejido del hospedador y sobrevive dentro de este medioambiente. Varios

patógenos Gram-negativos, Gram-positivos y Mycobacterias han demostrado tener la habilidad de ingresar a células tanto fagocíticas como no fagocíticas. Algunos patógenos tienen un ciclo de vida intracelular obligado con requerimientos absolutos de las células de mamíferos para crecer; como ser *Chlamydia* spp, *Rickettsia* spp y *Mycobacterium leprae*. Otros patógenos son intracelulares facultativos, usando su habilidad para ingresar y sobrevivir dentro de las células como un medio para su proliferación y diseminación a otros tejidos. Un gran avance en el estudio de la patogénesis bacteriana en los últimos años ha sido la identificación de los genes que permiten al patógeno invadir células no fagocíticas del hospedador. Notoriamente, se encontró que estos genes de invasión, presentes en varios patógenos, codifican proteínas de sistemas de secreción tipo III relacionadas evolutivamente, las cuales sirven para inyectar proteínas de señalización desde la bacteria hacia la célula hospedadora. Las proteínas inyectadas luego activan las vías de señalización propias de la célula hospedadora que hacen que la misma internalice el microbio. Los mecanismos de entrada han sido bien caracterizados en *Salmonella* spp y *Shigella* spp. Una particularidad común de la señalización inducida por los sistemas de secreción-inyección tipo III es que provocan un re-arreglo de la actina de la célula hospedadora, lo cual hace que el citoesqueleto celular sea reclutado para engullir al microorganismo invasor. Tanto *Salmonella* como *Shigella* activan las proteínas regulatorias de actina, llamadas GTPasas Rho, gatillando las vías de re-arreglo de actina para formar nodos de actina por debajo del patógeno invasor. Este tipo de interacción pone de relieve el fenómeno bioquímico del diálogo entre el hospedador y el patógeno que es esencial para la penetración de la célula hospedadora (Wilson, J. M. et al., 2002).

#### **1.1.6. Modos de vida intracelulares.**

Varios patógenos han evolucionado para sobrevivir y poder reproducirse dentro de las células del hospedador. El rango de células del hospedador en las cuales los patógenos pueden sobrevivir incluyen células no fagocíticas (epiteliales y endoteliales) y células fagocíticas profesionales (macrófagos y neutrófilos). La habilidad de sobrevivir y multiplicarse dentro de las células fagocíticas es de remarcar ya que éstas poseen mecanismos destinados a destruir las bacterias ingeridas. Estos mecanismos de muerte incluyen la producción de intermediarios oxidativos reactivos, la reducción del

pH del interior de las vacuolas conteniendo las bacterias y la activación de proteasas degradadoras. Las estrategias que las bacterias usan para evitar su destrucción a través de estas vías están siendo bien caracterizadas (Wilson, J. M. et al., 2002).

Hay tres nichos intracelulares generales en los cuales los patógenos residen: dentro de vacuolas fagolisosomales ácidas e hidrolíticamente competentes, dentro de vacuolas sin fusionarse a lisosomas, y en el citosol de la célula hospedadora. *Coxiella burnettis* es un ejemplo de un patógeno que es capaz de sobrevivir en el ambiente tóxico de una vacuola fagolisosomal, y se ha demostrado que son necesarios pH bajos para iniciar su replicación intracelular. *Mycobacterium* spp, *Samonella* spp, *Legionella pneumophila* y *Chlamydia trachomatis* son parte del grupo de patógenos que reside en vacuolas no lisosomales. Las vacuolas ocupadas por estas bacterias son conocidas como “especializadas” o “remodeladas” debido a que generalmente son morfológicamente diferentes de otras vacuolas y contienen una combinación de marcadores de superficie característicos. *Shigella flexneri*, *L. monocytogenes* y *Rickettsia rickettsii* son patógenos que residen en el citosol. Estas bacterias comparten una estrategia común de degradación enzimática de la vacuola que las contiene y se diseminan intracelularmente empleando el citoesqueleto celular (Wilson, J. M. et al., 2002).

Las bacterias que sobreviven intracelularmente pueden replicarse y desimanarse dentro de las células en el área local de infección o migrar a otras zonas del cuerpo. *Chlamydia* y *Rickettsia* lisan la membrana de la célula hospedadora, liberando las bacterias infectivas que atacan e invaden células adyacentes. Además de la lisis de la célula del hospedador, *Shigella* y *Listeria* utilizan una vía de diseminación célula-célula la cual conlleva a la infección de la célula adyacente. Las bacterias que residen en macrófagos y neutrófilos pueden usar a estas células como vehículos para dispersarse sistémicamente a través del sistema circulatorio sanguíneo y linfático. *Salmonella typhi*, *Yersinia* spp y *Brucella* spp se mueven entre distintos tejidos de esta manera. Las bacterias de vida intracelular son particularmente problemáticas en ciertas enfermedades. Algunas infecciones intracelulares pueden persistir por años y requieren una terapia con antibióticos muy extensa, la infección por *Mycobacterium tuberculosis* es un ejemplo clásico. La investigación actual está focalizada en la identificación y caracterización de los factores de virulencia moleculares que las bacterias intracelulares emplean para ocupar este nicho (Wilson, J. M. et al., 2002).

### 1.1.7. Regulación de los factores de virulencia.

El éxito de un microbio durante la patogénesis recae en su habilidad para censar y responder a la miríada de medioambientes a los que se enfrenta durante la infección del hospedador. Esto requiere el uso de un repertorio de funciones génicas de parte del microorganismo que son independientemente reguladas en respuesta a las señales medioambientales halladas dentro del hospedador infectado. La regulación de la expresión de los factores de virulencia es muy importante para muchas bacterias patogénicas. Al ir encontrando diferentes microambientes durante el curso normal de la infección, los patógenos deben adaptarse rápidamente a los nuevos medioambientes para de esta manera lograr colonizar, sobrevivir y crecer dentro del hospedador. Las bacterias llevan a cabo una intrincada regulación de los factores de virulencia mediante el uso de estrategias comunes como ser los factores sigma alternativos y la regulación coordinada de los sistemas de transducción de señales de dos componentes (Wilson, J. M. et al., 2002).

#### 1.1.7.1. Factores sigma.

Los factores sigma son subunidades proteicas de la ARN-polimerasa que controlan la iniciación de la transcripción en la secuencia promotora. Los factores sigma son los principales reguladores de la expresión génica en procariotas. Las bacterias usan diferentes factores sigma para controlar la iniciación específica de la transcripción génica en diferentes promotores, incluyendo aquellos cuyos genes codifican factores de virulencia. En particular, el factor sigma RpoS ( $\sigma^{38}$ ) ha mostrado regular la expresión de genes en respuesta a los cambios durante la fase estacionaria de crecimiento, depleción de nutrientes, estrés oxidativo y osmótico. Estas condiciones medioambientales son fisiológicamente similares a las encontradas por muchos microorganismos patógenos durante el curso de una infección. El factor sigma RpoS es importante para la patogenia de un gran número de bacterias, incluyendo *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *L. pneumophila* (Wilson, J. M. et al., 2002).

Otros factores sigma involucrados en la regulación de los genes relacionados con virulencia procariota, son: RpoE ( $\sigma^{24}$ ), el cual responde a estrés periplasmático y ha demostrado ser importante para la virulencia de *S. typhimurium*; RpoN ( $\sigma^{54}$ ) y AlgU

quienes regulan el fenotipo mucoso de *P. aeruginosa*; RpoH ( $\sigma^{32}$ ), factor sigma de estrés térmico el cual es relevante en la regulación de la virulencia de *Vibrio cholerae*; y sigma F, el cual afecta la expresión flagelar en el patógeno respiratorio *Bordetella bronchiseptica* (Wilson, J. M. et al., 2002).

#### 1.1.7.2. Sistemas de dos componentes.

Los sistemas regulatorios de dos componentes consisten de dos proteínas involucradas en la regulación de la expresión, en este caso, de determinantes de virulencia. Típicamente, estos sistemas están compuestos de: una proteína censora embebida en la membrana bacteriana, la cual censa diferentes condiciones medioambientales y fisiológicas de la bacteria; y por un regulador de respuesta, el cual generalmente se une a la región promotora de un gen para activar o reprimir su transcripción (Figura 2). Este tipo de sistemas es responsable del control de muchas funciones diferentes implicadas en la virulencia bacteriana. Se han identificado muchos sistemas regulatorios de dos componentes en bacterias, los cuales están involucrados, por nombrar algunos procesos, en la regulación de la homeostasis del hierro, fosfato, nitrógeno y carbono, producción de cápsula y en la movilidad flagelar. La fracción censora de un sistema de dos componentes generalmente contiene una histidín quinasa que se autofosforila luego de la interacción con la molécula señal. El fosfato derivado del ATP en la quinasa es luego transferido al regulador de respuesta, induciendo en este un cambio conformacional que lleva a la activación del mismo, pudiendo éste unirse o liberarse del ADN promotor. El regulador de respuesta puede interactuar con la ARN-polimerasa para incrementar la transcripción o se puede unir a la región promotora para prevenir que la polimerasa transcriba el gen debajo. Los factores de virulencia que son regulados por sistemas de dos componentes incluyen por ejemplo: la toxina pertusi de *B. pertussis* (BvgA/BvgS), la formación del pili y producción de toxina en *V. cholerae* (ToxR/ToxS), la supervivencia de *Salmonella* en macrófagos (PhoP/PhoQ), regulación de las porinas de membrana externa en *Salmonella* y *E. coli*, la producción de alginato en *P. aeruginosa* (FimS(AlgZ)/AlgR), las proteínas Yops de *Yersinia pestis*, y la regulación del hierro en *Salmonella* y *Pseudomonas* (Fur). La señal extracelular que es censada por la bacteria a través de estos sistemas es desconocida en muchos casos. Las similitudes entre estos diferentes sistemas de dos componentes podría ser utilizada

para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos que puedan interferir e inhibir el proceso de transducción de la señal (Wilson, J. M. et al., 2002).

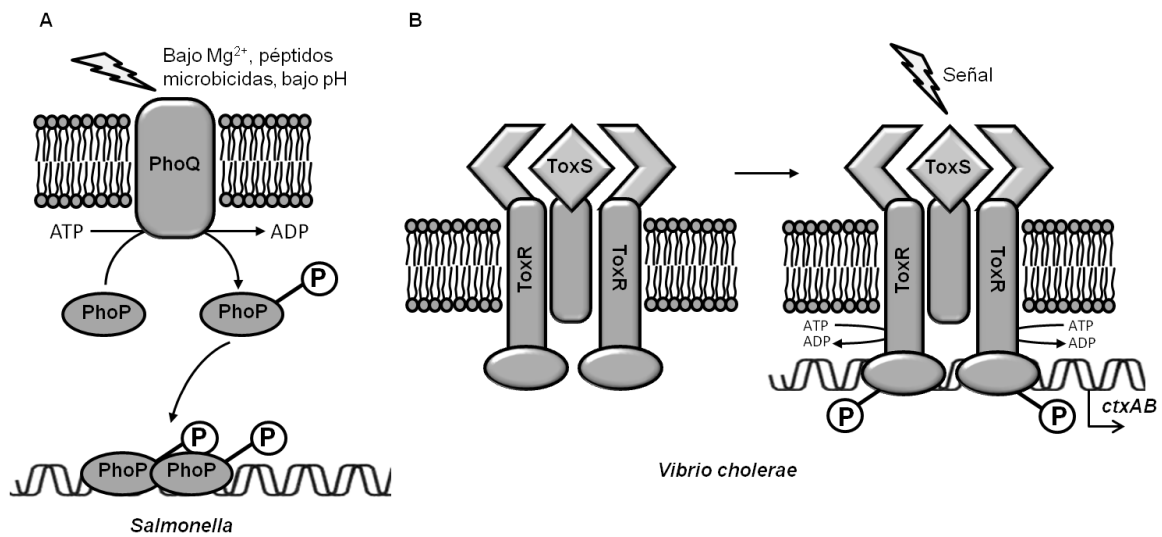


Figura 2: Representaciones esquemáticas de dos sistemas de transducción de señales de dos componentes involucrados en la patogenia microbiana. A) Sistema PhoP/PhoQ de *Salmonella* media respuestas a cambios del entorno y en la sobrevivencia en el interior de macrófagos. PhoP es la quinasa sensora de membrana que fosforila a PhoQ que es el regulador de respuesta, el cual una vez activo dirige la expresión de diversos genes. B) Sistema ToxR/ToxS de *Vibrio cholerae* involucrado en la producción de toxinas y pili. ToxS es la quinasa sensora unida a membrana que recibe la señal y activa mediante fosforilación al regulador de respuesta ToxR, el cual se encuentra en la membrana adyacente a ToxS (DiRita, V. J., 1992; Spector, M. P. y Kenyon, W. J., 2012; <http://2010.igem.org/Team:Tsinghua/project/outline/m2>).

#### 1.1.8. Pili tipo IV.

El pili tipo IV (T4P, type four pili) es un filamento extremadamente fino y muy resistente, ensamblado sobre las superficies celulares de eubacterias y de arqueas. Esta gran estructura constituida por una variedad de proteínas está involucrada en diversos procesos celulares, incluyendo movilidad, conjugación, adherencia, incorporación de ADN exógeno y formación de biofilm (Rakotoarivonina, H. et al., 2002; Averhoff, B. y Friedrich, A., 2003; Klausen, M. et al., 2003; Jurcisek, J. A. y Bakaletz, L. O., 2007; Brown, D. R. et al., 2010). El T4P es el único pili que ha sido identificado en especies Gram-negativas, Gram-positivas y arqueas, lo cual sugiere un origen muy antiguo

(Imam, S. et al., 2011). Esta estructura bacteriana posee funciones esenciales en la patogénesis de varios patógenos humanos. El T4P es altamente dinámico y experimenta ciclos de expansión y contracción. Estas oscilaciones son centrales para las diferentes funciones del T4P. El pili tipo IV es un filamento de 5 a 8 nm de espesor y varios micrones de longitud, típicamente solo compuesto de la subunidad de pilina PilA. Los sistemas de T4P comparten un core central de 10 proteínas que formarían un complejo proteico que atraviesa la membrana bacteriana, con componentes en el citoplasma, la membrana interna, el periplasma y la membrana externa (en bacterias Gram-negativas) (Figura 3) (Burrows, L. L., 2005; Ramboarina, S. et al., 2005; Imam, S. et al., 2011). La elongación del T4P involucra la incorporación de subunidades de pilina desde la base del pili a partir de un reservorio en la membrana interna. La retracción tiene lugar a través de la remoción y transferencia de las subunidades de pilina desde la base del pili hacia la membrana interna (Bulyha, I. et al., 2009). La biosíntesis del T4P ha sido más extensamente estudiada en bacterias Gram-negativas, donde su ensamblado involucra un set de proteínas bien conservadas, codificadas generalmente por el operón *pil*. El ensamblado de esta estructura requiere de una proteína de membrana politépica (PilC) la cual provee la base para el armado del pili, y una ATPasa similar a VirB11 de *Agrobacterium tumefaciens* (PilB) que cataliza la polimerización de las subunidades de pilina. Los operones conteniendo los genes que codifican para este core proteico pueden contener, además, genes para proteínas adicionales, como ser el caso de PilM y PilN, involucradas en la formación del complejo de membrana interna para la secreción de proteínas, así como PilQ, la cual forma un poro en la membrana externa de microorganismos Gram-negativos a través del cual las proteínas son transportadas. Análisis de la estructura cuaternaria de PilQ muestra que estas proteínas forman un complejo dodecamérico con forma de toroide cuyo diámetro de cavidad interno es de 53°A y 65°A en *P. aeruginosa*, y de 52°A y 60°A en *N. meningitidis* (Figura 3) (Mattick, J., 2002). Los operones conteniendo los componentes del pili tipo IV también poseen, comúnmente, los genes codificantes para las pre-pilinas, las cuales contienen un péptido señal amino-terminal tripartita (extremo N-terminal cargado, dominio central hidrofóbico y el extremo C-terminal hidrofílico) responsable de dirigir estas proteínas al sistema de translocación Sec para ser secretadas a través de la membrana citoplasmática. En contraste a los péptidos señal Sec, los péptidos señal de las pre-pilinas son procesados por PilD, una peptidasa de pre-pilinas que corta una glicina o alanina que precede al tramo hidrofóbico. El resultado de esto es un N-terminal hidrofóbico,

usualmente conteniendo glutamato o aspartato en la posición +5, formando parte del andamiaje que media el ensamblado del pili (Mattick, J., 2002; Imam, S. et al., 2011). Análisis genéticos en *P. aeruginosa* también han revelado la existencia de genes que codifican proteínas menores similares a pilinas como ser: PilE, PilV, PilW, PilX, FimT y FimU, que contienen la región helicoidal amino-terminal hidrofóbica encontrada en las pilinas principales, las cuales (excepto FimT, que puede ser sustituida por FimU) son requeridas para el ensamblado del pili, la movilidad twitching (ver anglisismos página VI al inicio) y la infección por fagos específicos de pili, aparentemente en una estequiometría correcta. PilV, W y X formarían la estructura de la base del pili a nivel de la membrana interna. PilX funcionaría como ancla o terminador del pili (Mattick, J., 2002). La regulación de las oscilaciones de extensión y contracción de T4P dependen de dos proteínas motoras, PilB y PilT, las cuales son miembros de la superfamilia de ATPasas de secreción (Figura 3). Las ATPasas de secreción son proteínas hexaméricas y dinámicas que usan la energía de la hidrólisis del ATP para la translocación de proteínas y/o ADN a través de membranas. Con la excepción de PilT, todas las proteínas del T4P son necesarias para la extensión del mismo; consecuentemente PilT es solo necesaria para la contracción. La evidencia indica que PilB y PilT funcionan antagonicamente siendo la energía para el trabajo mecánico de la extensión provista por la hidrólisis del ATP en PilB y la de retracción por la hidrólisis del ATP en el motor PilT. PilT promueve no solo la movilidad tipo “twitching” (ver más adelante), sino que esta retracción mediada por PilT del T4P afecta muchos de los aspectos de la biología de este pili. En las especies de *Neisseria*, por ejemplo, un mutante *pilT* no es competente para la transformación por ADN y es incapaz de progresar desde una etapa inicial de adherencia localizada hacia la etapa posterior de adherencia difusa. Además, un mutante en *pilT* muestra una agregación bacteriana incrementada, lo cual indica que la retracción del pili funcionaría a veces como una fuerza de dispersión (Brown, D. et al., 2010). Un aspecto interesante de la retracción del pili, dependiente de PilT, durante la interacción de *N. gonorrhoeae* con las células del hospedador, es que la retracción del pili cuando las bacterias están adheridas a la superficie celular, distorsiona y fuerza la membrana celular, estimulando vías mecano-sensitivas que promueve la expresión de genes de estrés y activa la señales cito-protectivas de la célula hospedadora bajo ataque (Howie, H. L. et al., 2005). En *Neisseria* no solo PilT es importante en la dinámica de síntesis y retracción del pili, sino que el nivel de piliación estaría bajo el control de PilE a nivel transcripcional y por PilC. Las proteínas PilC tienen un rol clave en la regulación de la

piliación previniendo que el pili se retraiga. El modelo propuesto para la actividad de PilC en la dinámica de extensión-retracción del pili contempla que durante la extensión las subunidades de pilina maduras son instaladas en la membrana, luego de ser procesadas por la peptidasa de prepilinas PilD. La fibra creciente es luego traslocada a la superficie bacteriana a través de la membrana externa por la secretina PilQ. La retracción conducida por PilT es prevenida por suficiente cantidad de PilC expresada, la cual actuaría como un clip sobre el pili, debido a la capacidad de esta proteína de unirse al pili. Esto causa un impedimento estérico que evita que la fibra se retraiga. Otra posibilidad que no puede descartarse es que PilC regule la funcionalidad de la secretina de membrana externa PilQ. Durante la retracción del pili, la reducida cantidad de PilC no puede prevenir la acción de PilT (Morand, P. C. et al., 2004).

La movilidad dependiente de T4P, denominada como “twitching” (ver más adelante) en *Neisseria* spp y *P. aeruginosa*, como movilidad S en *Myxococcus xanthus*, tiene lugar cuando las células bacterianas se encuentran en una superficie e involucra tres pasos: extensión del T4P, adhesión a la superficie y retracción. Mientras que la extensión no genera fuerza suficiente para mover la célula bacteriana, la retracción de T4P genera 100 pN, fuerza suficiente para mover la bacteria hacia adelante. Los T4P se retraen independientemente unos de los otros (Bulyha, I. et al., 2009).

El patógeno humano *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC, entero toxigenic *E. coli*) tiene la capacidad de sintetizar un T4P. Este patógeno es una importante causa de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, causa de diarrea en viajeros, siendo actualmente un patógeno re-emergente causante de diarrea en Estados Unidos. El pili tipo IV de ETEC es uno de los apéndices de colonización que emplea este patógeno para colonizar el intestino delgado, mostrando estar implicado en las etapas de adherencia temprana a receptores específicos distribuidos en las células epiteliales del intestino delgado. Por otro lado, el pili de tipo IV de ETEC es necesario para la movilidad del tipo “twitching” la cual contribuye a la patogenicidad de esta bacteria (Mazariego-Espinosa, K. et al., 2010).

Los mecanismos moleculares de la biogénesis y las funciones asociadas al T4P permanecen pobremente comprendidos a pesar de los vastos estudios realizados en distintos microorganismos. La primera y probablemente principal razón de esto es la complejidad de este sistema biológico. Desde 10 proteínas (en *V. cholerae*) hasta 18 (en *P. aeruginosa*) son necesarias para la biosíntesis del pili. Además, proteínas que no son indispensables para la biogénesis del pili, cuyo número exacto se desconoce, son actores

claves para la biología del T4P, siendo PilT un ejemplo de esto, debido a que no es necesaria para la biosíntesis del pili. La segunda, a veces paradójica, razón para la comprensión fragmentada de la biología del T4P es el hecho de que estos pili han sido estudiados en muchas especies de bacterias. Por lo tanto, fenotipos diferentes y difícilmente compatibles han sido asignados a mutantes con mutaciones en genes con alta conservación de secuencia e idéntica organización genómica. Por ejemplo, mutantes *pilU* de *P. aeruginosa* son hiperpiliados y no se mueven por “twitching”, en cambio un mutante en *pilU* de *N. gonorrhoeae* presenta una cantidad de pili similar a la cepa salvaje y puede desplazarse por “twitching”, pero tiene alterada la agregación y adherencia a células humanas (Brown, D. et al., 2010).

En contraste con las bacterias Gram-negativas, la mayoría de los pili en especies Gram-positivas hacen uso de la vía de la sortasa, la cual reconoce y corta un extremo C-terminal con la secuencia LPXTG, y polimeriza las subunidades de pilina en complejos macromoleculares que son unidos a la pared celular de peptidoglicano. La primera indicación de que las bacterias Gram-positivas poseían estructuras similares a la del T4P fue provista por el sistema Com de *Bacillus subtilis*, en el cual los péptidos señal de las pre-pilinas son procesados por un homólogo a PilD denominado ComC, produciendo una estructura de superficie de alto peso molecular para la unión de ADN. Además de la principal subunidad estructural ComGC (codificada por el operón *com*), la biosíntesis del T4P requiere de ComGA y ComGB (homólogos a PilB y PilC, respectivamente) (Figura 3), pero no hay otros homólogos a componentes Pil. A pesar de la importancia de los T4P tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, la identificación de las pilinas puede ser todo un desafío, debido a que los genes codificantes exhiben poca conservación de secuencia a excepción de los motivos mínimos descritos arriba, y la caracterización estructural se ve restringida por su baja solubilidad. Muchas de las proteínas tipo pilina de T4P han sido identificadas basándose en su asociación con los genes biosintéticos de los operones *pil* y *com*, en conjunción con un posible sitio de corte para peptidasas clase III. Sin embargo, las pilinas del T4P no necesariamente tienen que estar codificadas en el mismo operón que los genes para la biosíntesis del pili (Imam, S. et al., 2011).

Se han identificado posibles homólogos de proteínas biosintéticas de T4P altamente conservadas en genomas de bacterias Gram-positivas, usando dos ATPasas tipo VirB11 verificadas experimentalmente (ComGA de *B. subtilis* y PilB de *C. perfringens*) y dos

proteínas politópicas de membrana verificadas experimentalmente (ComGB de *B. subtilis* y PilC de *C. perfringens*) (Imam, S. et al., 2011).

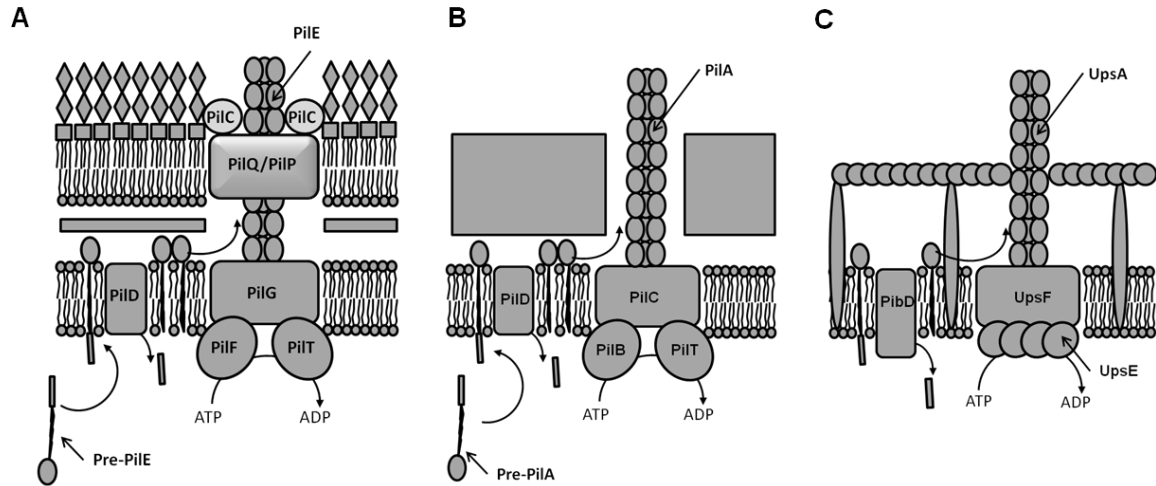


Figura 3: Esquemas de las estructuras de los T4P. A) Pili tipo IV de bacterias Gram-negativas, modelado del pili de *Neisseria gonorrhoeae*. B) Pili tipo IV de bacterias Gram-positivas, modelado del pili de *Bacillus sp.* NRRL B-14911 (ver Figura 4; Imam, S. et al., 2011). C) Estructura superficial tipo T4P de arquea *Sulfolobus solfataricus* donde UpsE es parálogo a PilB y UpsA es la pilina. (Sonja-Verena, A. y Pohlschröder, M., 2009).

Se han identificado genes codificantes para probables T4P pilinas en los genomas de 15 especies de bacterias Gram-positivas basado en su asociación con los operones que codifican proteínas biosintéticas del pili (Figura 4). Dentro de estos operones, los genes que podrían codificar para pilinas son identificados comprobando la presencia del arreglo canónico del péptido señal (A/G) $X_4$ (D/E). Se han obtenido manualmente 58 pilinas de esta manera, basándose en la proximidad de la secuencia aminoacídica del péptido señal antes descrita al N-terminal, seguida debajo por un segmento de aminoácidos hidrofóbicos (Imam, S. et al., 2011). En el caso de arqueas, análisis recientes han conducido a un mayor entendimiento de la diversidad y biosíntesis de estructuras similares a pili tipo IV en estos microorganismos extremófilos. En *Geobacter sulfurreducens* el T4P, además de sus roles funcionales típicos de adherencia a superficies y agregación celular, le permite a esta bacteria capturar una significativa

cantidad de aceptores de electrones poco disponibles mediante la extensión del área superficial de la célula. Las arqueas son únicas en el uso de estructuras que recuerdan al pili tipo IV para llevar a cabo el nado. La exposición a radiación UV induce las interacciones célula-célula en *Sulfolobus solfataricus*, siendo esta agregación dramáticamente reducida en mutantes que carecen de las pilinas inducidas por UV, UpsA y UpsB, sugiriendo que estructuras semejantes al pili tipo IV están involucradas en las asociaciones célula-célula como ocurre en procariotas (Figura 3) (Sonja-Verena, A. y Pohlschröder, M., 2009).

### Operones *pil*

#### Gram-negativa

*Burkholderia pseudomallei* K96243



#### Gram-positivas

*Bacillus* sp. NRRL B-14911



*Clostridium acetobutylicum* ATCC B24



*Clostridium cellulolyticum* H10



*Clostridium difficile* 630



*Clostridium perfringens* ATCC13124



*Desulfotomaculum reducens* MI-1

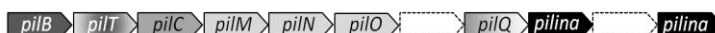


Figura 4: Mapa físico del locus de T4P en bacterias Gram-positivas. Los extremos en punta de los genes representados muestra la orientación relativa de los marcos abiertos de lectura (ORF). Los ORFs con el mismo tono o degradado corresponden a genes con funciones similares, en blanco con bordes en línea punteada están los OFRs no definidos. Los genes están anotados basándose en los resultados obtenidos por BLAST o Pfam comparados con los homólogos experimentalmente verificados. Los genes principales coloreados por funciones codifican para las proteínas PilB y PilT (ATPasas); PilC (proteína transmembrana); PilD (peptidasa); PilQ (secretina); PilA y PilS (principales pilinas); PilV (pilina minoritaria). Se utilizó como modelo de operón *pil* el de *Burkholderia pseudomallei* por su complejidad y componentes verificados experimentalmente (Imam, S. et al., 2011).

### 1.1.9. Biofilms bacterianos.

Los biofilms bacterianos son comunidades de bacterias adheridas a superficies bióticas o abióticas que se encuentran comúnmente en la naturaleza, siendo estos un ejemplo de multicelularidad en microorganismos. Los biofilms se hallan ampliamente distribuidos desde tuberías de agua a catéteres en pacientes de hospitales. La capacidad de formar biofilms por *P. aeruginosa* es un aspecto fundamental para la patogenia de esta bacteria durante el establecimiento y persistencia de la Fibrosis Quística (FQ), convirtiéndose *P. aeruginosa* en uno de los organismos modelo para el estudio de la formación de biofilm y de la socio-microbiología (Shrout, J. et al., 2006). Debido a la importancia que conllevan estas estructuras bacterianas en su interacción con los seres humanos, se ha incrementado con el tiempo los estudios destinados a comprender los mecanismos moleculares y regulatorios que conducen a las bacterias a formar biofilms, así como la ultraestructura de los mismos. La capacidad de formar biofilms fue considerada en el pasado como dominio de unos pocos microorganismos, sin embargo se sabe actualmente que es un atributo casi universal. A pesar de esta universalidad, los mecanismos utilizados por las bacterias para construir biofilms son ampliamente diversos, siendo muy distintos entre especies diferentes y bajo diferentes condiciones medioambientales. Hay, sin embargo, varios aspectos comunes en los distintos biofilms analizados hasta la fecha. Uno de ellos es que las células son mantenidas juntas dentro de estas estructuras tridimensionales mediante una matriz extracelular compuesta de expolisacáridos (EPS), proteínas y a veces ácidos nucleicos. Otro tiene que ver con el inicio del desarrollo del biofilm, ya que generalmente la formación del mismo se debe generalmente a señales extracelulares, de origen medioambiental, o producidas por los mismos microorganismos que darán origen al biofilm. Finalmente, otra característica compartida por los biofilms es que le otorgan a las bacterias contenidas en ellos protección contra una amplia variedad de agresiones ambientales, contra diversos antibióticos, predadores y contra el sistema inmune humano (Lemon, K. et al., 2008; López, D. et al., 2009).

La formación de un biofilm es un proceso de desarrollo coordinado en el cual la bacteria experimenta un cambio en su estilo de vida desde un estado unicelular nómada a un estado sedentario multicelular, donde un crecimiento subsecuente en el sitio de adherencia resulta en comunidades estructuradas y con diferenciación celular evidente.

Se ha intentado elaborar un modelo general de formación de biofilms que pueda ser útil para comprender este fenómeno en diferentes especies de bacterias. Este modelo se ajusta a dos modos de vida unicelulares: móvil y no móvil. En el caso de las especies no móviles, cuando las condiciones son propicias para la formación de biofilm, las células individuales incrementan la expresión de adhesinas sobre sus superficies, lo cual promueve la adherencia célula-célula y célula-superficie. Por ejemplo, en el caso de algunas especies de *Staphylococcus*, las proteínas Bap promueven la interacción célula-célula y contribuyen a la matriz extracelular. Muchas otras especies, no móviles como móviles poseen homólogos de Bap, pero con longitud variable. Las especies no móviles también producen exopolisacáridos (EPS) que forman una parte integral de la matriz extracelular. En las bacterias no móviles, los cambios en las proteínas de superficies, conjuntamente con la producción de EPS, juega un rol crítico en la iniciación de la formación de biofilm. Para el caso de las bacterias móviles, cuando las condiciones favorecen la formación de un biofilm las células individuales cambian su estilo de vida dramáticamente. La movilidad se pierde y las bacterias comienzan a producir una matriz extracelular que mantiene a las células unidas. Para un número considerable de organismos móviles, el rol dominante del flagelo en la iniciación del biofilm es proveer la movilidad necesaria para vencer las fuerzas repulsivas y alcanzar la superficie. Inicialmente, el encuentro con la superficie generalmente conduce a una adherencia transiente. Esta adherencia transiente puede resultar en una asociación estable a la superficie, y un subsecuente cambio hacia el desarrollo de un biofilm, o en un retorno a la existencia planctónica. Los primeros resultados importantes en el entendimiento de los mecanismos moleculares de la formación de biofilm fueron obtenidos en Proteobacterias Gram-negativas, especialmente *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa* (bioensayos de adherencia a superficies). La formación de biofilm puede dividirse en cinco etapas distintas: unión inicial a superficie, formación de monocapa, migración para formar microcolonias multicapa, producción de matriz extracelular y finalmente maduración del biofilm con arquitectura tridimensional característica. La secreción de EPS está bajo el control del quórum-sensing en numerosos sistemas bacterianos modelo. Muchas especies, incluyendo el patógeno *P. aeruginosa*, activa la producción de EPS cuando alcanza una densidad celular alta, secretando este polímero solo en el estado de biofilm, donde le confiere ventajas competitivas. Inesperadamente, otras especies tienen un comportamiento muy diferente. El patógeno entérico humano, *V. cholerae* comienza la

secreción de EPS después de unirse a superficie y perder la actividad flagelar, terminado la síntesis de EPS a altas densidades celulares, opuestamente al caso de *P. aeruginosa* (Lemon, K. et al., 2008; Nadell, C. et al., 2008). Mientras la unión inicial a la superficie es dependiente de la movilidad mediada por flagelo en una gran variedad de bacterias móviles, en algunas bacterias Gram-negativas, la formación de microcolonias y la arquitectura final tridimensional son también dependientes de una movilidad asociada a superficie dependiente del pili tipo IV, como es el caso de *P. aeruginosa* donde el T4P es importante en la formación de biofilms. Tanto el flagelo, como el T4P han mostrado estar involucrados en la unión a superficies. Sin embargo, el T4P está notablemente ausente en Gram-positivas, a excepción de *Clostridia* spp. (Lemon, K. et al., 2008; Shrout, J. et al., 2006; Varga, J. J. et al., 2006).

Usando como modelo a la bacteria Gram-positiva *Bacillus subtilis*, se ha observado que el regulador maestro Spo0A se fosforila en condiciones de limitación nutricional, y directa o indirectamente regula la transcripción de genes involucrados en la producción de matriz extracelular, movilidad y esporulación. Los biofilms de *B. subtilis* se desarrollan sobre la superficie de agar como colonias arquitectónicamente complejas. Los biofilm maduros forman proyecciones aéreas descritas como semejantes a cuerpos de fructificación, ya que estos sitios sirven como sitios preferenciales de esporulación en este microorganismo. Teniendo en cuenta estas observaciones, se ha propuesto que los biofilm comprenden una población heterogénea de células individuales que han seguido diferentes caminos de diferenciación, similar a lo que ocurre en los órganos de organismos superiores. Usando fotografías por microscopía a diferentes tiempos, se observó que las células de *B. subtilis* parecen seguir un linaje definido a medida que el biofilm se desarrolla. Las células móviles se convierten en productoras de matriz extracelular y finalmente se diferencian en células esporulantes. Se ha demostrado que se necesita una matriz extracelular particular para que se produzca la esporulación, indicando que la esporulación está de alguna manera ligada a la formación de comunidades de arquitectura compleja (Figura 5). Este acoplamiento de la esporulación con un desarrollo multicelular también ha sido observado en otros microorganismos. Por ejemplo, *Myxococcus xanthus* es una bacteria multicelular que esporula cuando es hambreada, pero esta esporulación solo tiene lugar luego de que las células se han agregado en cuerpos de fructificación macroscópicos (Jelsbak, L. y Sogaard-Andersen, L., 2003). De igual manera, la bacteria filamentosa *Streptomyces coelicolor* produce esporas en estructuras elevadas conocidas como micelio aéreo, y la formación de

esporas es normalmente dependiente de la formación de proyecciones hifales ascendentes (Vlamakis, H. et al., 2008; López, D. et al., 2009).

### Biofilms generados por cepas de *B. subtilis*



Figura 5: Biofilms producidos por distintas cepas de *B. subtilis* en la interface aire-líquido de cultivo estacionarios (Grau, R. R. y Mendez, M.). Puede observarse la complejidad estructural de los biofilms en los cuatro posillos inferiores comparados con los superiores, donde los dos primeros (extremo superior izquierdo) muestran solo una delgada capa superficial sin estructura tridimensional apreciable, y los dos segundos (extremo superior derecho) exhiben un biofilm rugoso y uniforme.

#### 1.1.10. Movilidad bacteriana.

Inicialmente se pensaba en la movilidad bacteriana como en la capacidad de nado de las células impulsadas por la rotación de un flagelo, un fenómeno que ocurría en medio líquido o fluído. Consecuencia de esta idea, durante treinta años, los estudios estuvieron enfocados a la movilidad mediante flagelo, el funcionamiento del motor flagelar, la transducción de señales y el sistema secretor tipo III bacteriano. Sin embargo, las bacterias no limitaron sus dominios a la fase acuosa, habitando medioambientes con poco contenido de agua y de humedad cambiante como ser: biofilms, suelo y colchones estratificados microbianos, donde la exploración de nuevas fuentes de alimento requiere de otras capacidades de movilidad no relacionadas con el

nado (“swimming”). Muchas bacterias pueden arrastrarse y deslizarse sobre sustratos sólidos. La capacidad de locomoción bacteriana sobre superficies está involucrada en muchos aspectos de la microbiología, incluyendo morfogénesis, formación de biofilm e interacciones microbio-hospedador (Spormann, A., 1999; Merz, A. y Forest, K., 2002; Bardy, S. L. et al., 2003). Los microorganismos que se desplazan sobre superficies tienen el desafío de moverse sobre unas pocas capas de moléculas de agua. Una solución empleada por algunas de las bacterias que hacen swimming es producir gran cantidad de flagelos laterales que les permiten dispersarse como un enjambre (“swarm”) sobre una fina capa de fluido en una superficie sólida (Figura 6). El swarming se caracteriza por un movimiento multicelular de las bacterias que migran sobre sustratos sólidos en grupos de células unidas estrechamente (Pelling, A. E. et al., 2006). Este tipo de locomoción es estrictamente dependiente de la habilidad de las bacterias adheridas de sufrir un proceso de diferenciación caracterizado por la producción de células especializadas, más largas y más flageladas que las platónicas. Las células del enjambre pueden revertir en células cortas oligoflageladas nadadoras cuando el frente de avance del movimiento swarming detiene su migración. El swarming, por lo tanto, es considerado como un comportamiento en respuesta a superficies, el cual provee a las bacterias flageladas con la habilidad de actuar como una población multicelular que rápidamente coloniza sustratos sólidos ricos en nutrientes. Se han descrito el swarming de muchas bacterias diferentes: *Serratia*, *Vibrio* y *Salmonella* (Gram-negativas); y *Bacillus* y *Clostridium* (Gram-positivas) habitantes del suelo (Kearns, D. B. y Losick, R., 2003). En Clostridia, el swarming se da en *Clostridium tetani*, *C. sporogenes*, *C. bifermentans* y *C. septicum*. La formación de células de enjambre en *Proteus mirabilis* está directamente relacionada con la virulencia. En *C. septicum* la capacidad de diferenciarse en células hiperflageladas que realizan swarming le permite migraciones poblacionales rápidas y concertadas sobre superficies, siendo observado este fenómeno en tejido necrótico de intestino grueso; sugiriendo que la patogenicidad de este microorganismo puede estar asociada a esta capacidad de desplazamiento. Se han descrito varias señales que afectan la transición de células nadadoras a células del enjambre en diversas especies de bacterias (Daniels, R. et al., 2004). La diferenciación colectiva de la movilidad swimming a swarming ha mostrado depender críticamente de la densidad celular, y se ha propuesto que los surfactantes tendrían un rol en la diferenciación, ya que son secretados por las bacterias en respuesta a señales de densidad de la población celular. Sin embargo, a pesar de que las células de enjambre

que se mueven inicialmente están frecuentemente encapsuladas dentro de matriz húmeda viscosa de composición diversa, los surfactantes parecen en realidad facilitar la migración de las células del enjambre más que inducir la diferenciación hacia la movilidad swarming. El requerimiento esencial para la iniciación de la diferenciación hacia el swarming en todas las bacterias estudiadas hasta la fecha es el contacto de las bacterias con la superficie. Poco se sabe del mecanismo mediante el cual las bacterias persisten la superficie. En *Vibrio parahaemolyticus*, la inhibición de la rotación del flagelo parece actuar como una señal mecanosensora de la presencia de una superficie (Spormann, A., 1999; MacFarlane, S. et al., 2001; Bardy, S. L. et al., 2003; Calvio, C. et al., 2005).

Además del swarming, otros procariotas emplean uno de otros dos modos de desplazamiento activo celular sobre superficies sólidas: conocidos como deslizamiento (“gliding”) y el avance mediante sacudones (“twitching”) (Figura 6). Historicamente, el gliding ha sido definido como el movimiento de células no flageladas en la dirección de su eje mayor sobre una superficie. Esta amplia definición, la cual no especifica el aparato molecular o el modo de generación de fuerza, ha sido por lo tanto utilizada para describir el desplazamiento de muchas bacterias filogenéticamente no relacionadas. La movilidad tipo gliding puede ser generada por mecanismos moleculares fundamentalmente diferentes que pueden operar simultáneamente aún sobre un simple microorganismo (Margolin, W., 2006). Varios modelos de gliding han sido propuestos para diferentes microorganismos para explicar el movimiento aparentemente suave de las células sobre superficies sólidas. Estos modelos incluyen la participación de elementos retractiles, la propagación direccional de ondas a lo largo de la superficie celular, la extrusión direccional de mucus (gel de polielectrolitos compuesto de carbohidratos complejos), motores rotatorios, la liberación controlada de surfactantes desde los polos de las células, y el movimiento de los sitios de adhesión en la membrana externa a través de guías fijas al peptidoglicano de la pared celular (Figura 6) (Bardy, S. L. et al., 2003). Se ha usado el gliding de células simples de *Myxococcus xanthus*, *Flavobacterium* y *Cytophaga* cepa U67, así como el organismo filamentoso *Flexibacter polymorphus* como modelo para el estudio del gliding. En *M. xanthus* la movilidad es controlada por dos sistemas multigénicos: el sistema A (aventurero), el cual controla la movilidad gliding de células individuales aisladas, y el sistema S (social), el cual es esencial para el movimiento grupal, durante la agregación y formación del cuerpo fructífero. La movilidad A es un gliding independiente de pili y la movilidad S es

dependiente de pili (Spormann, A., 1999; Merz, A. et al., 2002). El gliding aventurero A resulta de las fuerzas compresivas generadas por la hidratación, expansión y extrusión hacia atrás de mucus de polielectrolitos. Este gel de carbohidratos se comporta como un resorte supramolecular, guardando energía potencial que es convertida en energía cinética cuando el mucus se hincha en la boca de la cámara donde se ensabla en mucus. La hidratación de este mucus proveería la fuerza suficiente para mover las células hacia adelante a las velocidades observadas. La movilidad social S, denominada gliding social o twitching es debida a fuerzas de tensión generadas a través de la unión y retracción de un pili tipo IV (sección 1.1.8.). (Merz, A. et al., 2002). Ha habido un debate por décadas respecto a si la movilidad social gliding y el twitching son equivalentes. Para evitar posibles confusiones y en concordancia con otros autores (Mattick, J., 2002), los cuales consideran que la diferencia sería solo semántica, de aquí en adelante se usará el término gliding para describir desplazamientos generales mediados o no por T4P y el término twitching para los que dependen exclusivamente del T4P (Figura 6).

Una propiedad fascinante que distingue al T4P de muchos otros tipos de fimbrias bacterianas es la habilidad de poder retraerse a través de la pared celular mientras la punta del pili permanece firmemente adherida a superficies de diferentes tipos (incluyendo superficies inertes, células bacterianas y eucariotas), permitiéndole al pili actuar como una caña de pescar o gancho para trepar durante la traslocación del cuerpo celular (Mattick, J., 2002; Burrows, L., 2005 y 2012). Estudios de microscopía electrónica, inhibición por unión de anticuerpos o fagos, videomicroscopías ópticas y de fluorescencia, así como pinzas láser, realizados en *P. aeruginosa*, *M. xanthus* y células de *Neisseria*, han confirmado que el T4P puede acortarse, llevando el cuerpo celular más cerca del punto de unión distal del pili, pudiendo en algunos casos medir la fuerza generada durante este proceso. Se ha estimado que las fuerzas generadas durante la retracción del pili pueden ser de hasta 140 pN, colocando al motor del pili como una de las máquinas moleculares más fuertes reportadas hasta ahora. Estos pili pueden retraerse independientemente uno del otro permitiéndole a la bacteria tirar a través de muchos vectores tangenciales a lo largo del eje de la célula, dependiendo de donde se enlazó el extremo del pili. El agarre de múltiples pilis incrementará la posibilidad de que el cuerpo celular sea llevado cerca de la superficie. La movilidad tipo twitching le permite a la bacteria desplazarse a través de la superficie a velocidades de entre 0,5 a 1  $\mu\text{m s}^{-1}$ .

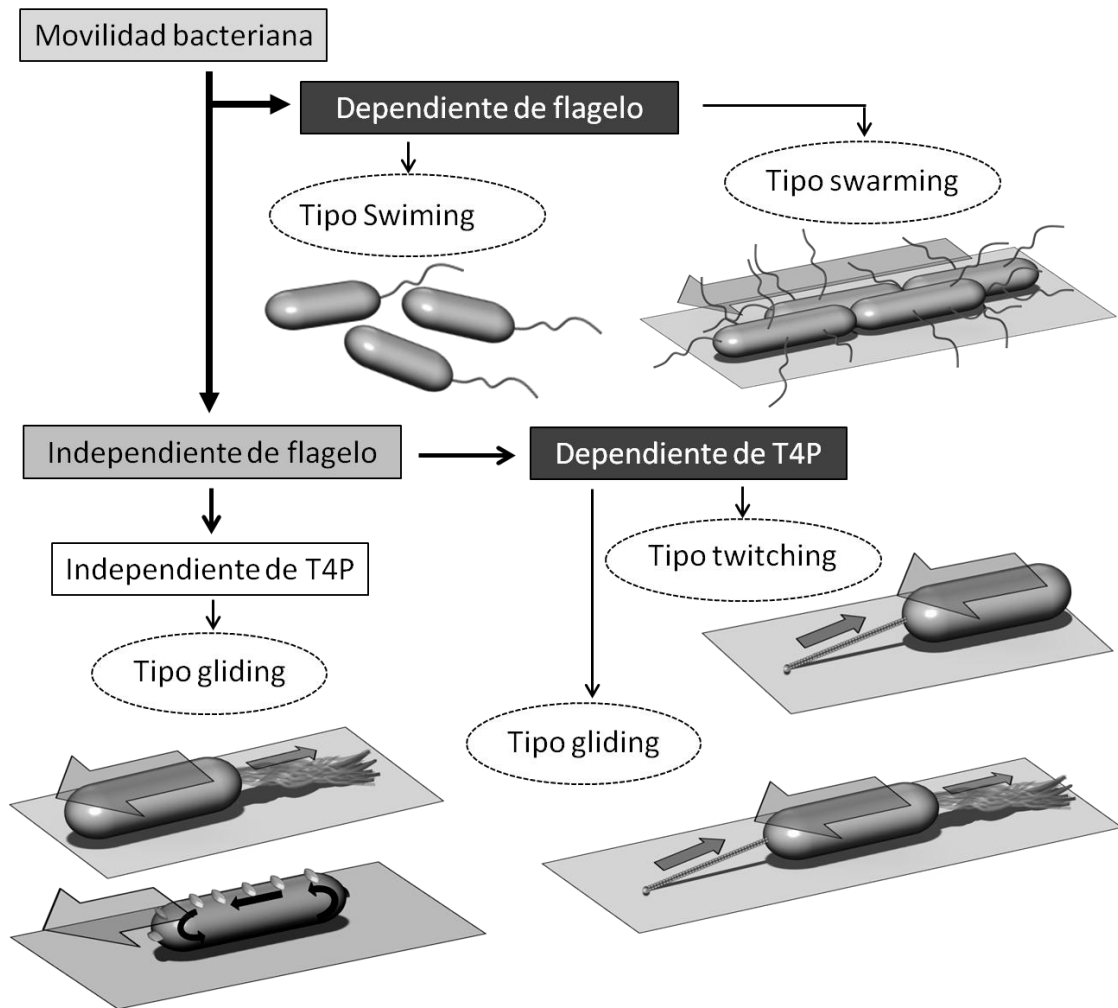


Figura 6: Movilidad bacteriana. Dependiente de flagelo: swimming, nado libre dependiente de flagelo (se representa un flagelo polar pero puede ser uno o más flagelos polares, lofótricos o perétricos); swarming, movimiento en enjambre, en grupo, de células alargadas hiperflageladas sobre superficies. Independiente de flagelo y de pili tipo IV: movilidad gliding, deslizamiento sobre superficies dependiente de múltiples estrategias. Los modelos de gliding contemplan la participación de elementos retractiles, la propagación direccional de ondas a lo largo de la superficie celular, motores rotatorios, la liberación controlada de surfactantes desde los polos de las células. Se muestra la dependiente de fuerzas compresivas generadas por la extrusión, hidratación y expansión hacia atrás de mucus de polielectrolitos, y el movimiento de los sitios de adhesión en la membrana externa a través de guías fijas al peptidoglicano de la pared celular. Dependiente de pili tipo IV: twitching, desplazamiento a los sacudones o tirones debido al acortamiento por despolimerización del T4P; gliding dependiente de pili tipo IV en el cual se convina la retracción del T4P con la producción de mucus (u otro tipo de locomoción). El término gliding es más general dependiendo la fuerza motriz del T4P o no.

La movilidad tipo twitching otorga a la células piliadas la capacidad de trepar por sobre sus isogénicas no piliadas llegando a la cima de las macrocolonias de morfología similar a hongos; siendo también importante en la patogenia. Mutantes de *P. aeruginosa* que poseen T4P pero no pueden retraerlo y desplazarse por twitching, fallan en diseminarse a otros órganos del animal infectado. La extensión y retracción del pili serían extremadamente rápidas (1500 subunidades  $s^{-1}$ ) siendo la asociación/disociación de la subunidades de pilina en la base del pili dependiente de ATP. Para que pueda llevarse a cabo la movilidad tipo twitching, la punta del pili debe adherirse firmemente a una superficie para proveer un anclaje donde el motor del pili pueda ejercer su fuerza. T4P puede promover la unión, y luego la movilidad twitching sobre una amplia variedad de materiales incluyendo tejidos, vidrio, plásticos y metales, siendo la unión y movilidad etapas claves en la formación de un biofilm. Durante el twitching, las interacciones dinámicas entre las fuerzas de retracción mediada por el pili y la subsecuente pérdida de contactos superficiales parece ser responsable, en parte, de la naturaleza sobresaltada frecuentemente reportada de esta movilidad. Las investigaciones cristalográficas de las pilinas tipo IV de *Neisseria*, *Pseudomonas* y *V. cholerae* han mostrado que las subunidades consisten de una región alfa-hélice hidrofóbica N-terminal altamente conservada, seguida por un dominio C-terminal globular conteniendo láminas beta. Las subunidades de pilina se ensamblan de manera que las alfa-hélices hidrofóbicas N-terminal forman el core de la fibra del pili, mientras que los dominios C-terminales decoran la superficie. La región N-terminal parece servir para retener las subunidades en la membrana interna para el procesado por la peptidasa/N-metilasa PilD (Sección 1.1.8.) y, en algunas cepas, para modificaciones post-transcripcionales con glicanos, alfa-glicerofosfato, fosfocolina, fosfoetanolamina y fosfato. Muchos pilis bacterianos tienen subunidades principales estructurales y subunidades menores adhesivas separadas, ubicándose estas últimas en el extremo distal del pili para promover la adherencia. En algunos casos, la subunidad adhesiva ha mostrado estar involucrada en la adherencia específica a receptores y en la no específica. Algunos experimentos en *P. aeruginosa* sugieren que la pilina PilA por si misma actúa como subunidad estructural y adhesiva. En cambio, en *Neisseria* la adherencia mediada por T4P depende de una proteína adicional, PilC (correspondiente a PilY1 en *Pseudomonas*). PilC está también involucrada en el antagonismo de la retracción del pili, y por esta razón influenciaría el twitching. Estudios genéticos de *P. aeruginosa* y *Neisseria* han demostrado que las ATPasas PilB (PilF en *Neisseria*), PilT

y PilU son necesarios para la movilidad tipo twitching; PilB está involucrada en la polimerización de las subunidades para formar el pili mientras que PilT y PilU intervienen en la despolimerización, como se mencionó anteriormente (Sección 1.1.8.). PilB y PilT se encuentran ampliamente conservadas entre las bacterias que expresan T4P, sin embargo PilU (a veces llamada PilT2) está menos distribuída. PilB y PilT jugarían un rol antagonista, donde PilB promueve la asociación del pili y la formación de la fibra, y PilT provoca la retracción a través del desensamblaje del pili. El rol de PilU es menos claro. Estudios recientes han demostrados que en *Neisseria* PilC (PilY1 en *P. aeruginosa*) se localiza en la membrana externa y actúa como un clip sobre el pili contrarestando la retracción mediada por PilT. Si bien es claro que se necesitan de proteínas motoras para la extensión-retracción del pili y que estas utilizan la hidrólisis del ATP para llevar a cabo estos eventos, el mecanismo real por el cual ocurre la polimerización y despolimerización de la pilina permanece elusivo. La visión global del proceso sugiere que PilT retraería cualquier pili que no tenga uno o más de los componentes necesarios, como por ejemplo PilC. (Mattick, J., 2002; Burrows, L., 2005).

El anclaje del T4P a la pared celular es muy importante al momento de soportar las fuerzas de tracción durante el desplazamiento del cuerpo celular en twitching. El peptidoglicano brindaría el andamiaje que cumpliría la función de refuerzo cuando se retrae el pili. Mediante mutagénesis de *P. aeruginosa* se llegó a identificar a PilM y FimV como proteínas potencialmente involucradas en las interacciones entre T4P y la pared celular. PilM, cuyo gen es el primero de un grupo que codifica de PilM a PilQ, tiene homología con las proteínas tipo actina MreB y FtsA. Intrigantemente, MreB ha mostrado recientemente participar en el posicionamiento bipolar de proteínas. PilN y PilO parecerían ser proteínas de membrana interna, PilP es una lipoproteína localizada en la membrana externa y PilQ es un poro de secreción dodecamérico de membrana externa a través del cual el pili es extruído (Burrows, L., 2005).

#### **1.1.10.1. Regulación de los desplazamientos bacterianos dependientes de T4P.**

La movilidad twitching está altamente regulada en *P. aeruginosa*. *chpA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *pilS*, *R*, *rpoN*, *fimS*, *algR*, *algU* y *vfr* están involucrados en la regulación transcripcional

y las vías quimiosensoras que controlan la expresión o actividad del sistema. La transcripción de PilA en *P. aeruginosa* está finamente controlada por un clásico sistema de dos componentes, RpoN dependiente, PilS/PilR. PilS es una proteína transmembrana sensora localizada en el polo de la célula. El twitching en *P. aeruginosa* es también controlada por un par sensor-regulador atípico FimS/AlgR. FimS y AlgR no afectan la expresión de PilA por lo que estarían regulando alguno de otros aspectos del sistema. Se ha determinado que la movilidad tipo twitching está controlada por Vfr, un homólogo de la proteína represora por catabolito, Crp, en *P. aeruginosa*. Vfr puede unir los nucleótidos cAMP y cGMP, actuando estos como reguladores. En *M. xanthus*, los genes que codifican los dos sistemas de dos componentes, *pilS/pilR* y *pilS2/pilR2* están localizados en los operones de genes *pil*. La expresión de PilA requiere de PilR pero no de PilS, la cual parece tener una función regulatoria negativa más que positiva. PilS2 no es tampoco necesaria para la movilidad twitching y también parece ser un regulador negativo. En *M. xanthus* la movilidad también requiere de un grupo de tres genes codificantes para transportadores ABC (*pilG*, *H* y *J*), los cuales están localizados dentro de los operones *pil*. Tanto en *M. xanthus* como en *P. aeruginosa* el twitching es también controlado por los sistemas de transducción de señales de fosfotransferasas quimiosensoras, *frz* en *M. xanthus* y *chp* en *P. aeruginosa*; los cuales son similares, pero más complejos, que el sistema quimiotáctico *che*. El sistema *frz* controla la frecuencia con la cual las células se dan vuelta, y de esta forma la dirección y el patrón de la movilidad twitching, tanto en crecimiento vegetativo como durante la formación del cuerpo fructífero. El conjunto de genes *chp* en *P. aeruginosa* es similar al de *frz*, siendo su función igualmente similar. ChpA contiene ocho dominios con histidinas fosfotransferasas, integrando de esta manera múltiples señales, siendo de las más complejas de la naturaleza. Las señales medioambientales que controlan el twitching no son bien comprendidas. Hay evidencia que indica que la movilidad bacteriana es influenciada por el estatus nutricional, la densidad celular y las señales intercelulares durante el swarming vegetativo, el desarrollo de microcolonias y cuerpos fructíferos. Por ejemplo, en el microorganismo *Synechocystis* sp. PCC 6803, la luz mostró controlar la movilidad y la producción de un pili extracelular tipo IV a través de un conjunto de genes fototácticos, donde la señalización está ligada a dominios fotoreceptores que unen cromóforos. En contraste, *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* son patógenos obligados y no tienen ningún sistema quimiotáctico codificado en sus genomas. Se sabe que la expresión de la pilina PilE (llamada así en estos microorganismos) y PilC es

influenciada por dos genes, *pilB* y *pilA*, que codificarían un sistema de dos componentes inusual que responde a GTP (Mattick, J., 2002).

#### **1.1.10.2. Funciones bacterianas dependientes de la movilidad twitching.**

La movilidad twitching está involucrada en la rápida colonización expedicionaria de superficies durante el crecimiento vegetativo, así como en la formación de estructuras de colonia complejas en biofilms y cuerpos fructíferos. El twitching es requerido para la colonización de hospedadores y la patogénesis. Además, el T4P participa en otros procesos celulares no menos importantes como ser, la transformación mediante la incorporación de ADN exógeno, la conjugación y la infección por bacteriófagos (Mattick, J., 2002).

### **1.2. Metabolismo bacteriano y patogenia.**

Desde el punto de vista egocéntrico del hombre, los microorganismos patógenos han desarrollado a lo largo de la evolución un gran número de estrategias para causar enfermedades. A estas estrategias las llamamos factores de patogenicidad o de virulencia. Pero si se tiene en cuenta un punto de vista más amplio, menos reduccionista, podemos ver que las bacterias patógenas solo están tratando de sobrevivir, de perdurar, y para lograr este objetivo deben ser capaces de obtener nutrientes de su entorno y de colonizar nichos con gran cantidad de alimento. Para las bacterias, el hombre, los animales y las plantas no somos más que fuentes de nutrientes extremadamente ricas. Los tejidos animales contienen una gran diversidad de nutrientes, como ser azúcares, aminoácidos y compuestos nitrogenados simples tal como urea y amonio. La interacción de las bacterias patógenas con sus hospedadores se distingue de las interacciones del hospedador con la microbiota hallada, por ejemplo, en las mucosas, ya que la primera resulta en el daño del hospedador. Las interacciones patógeno-hospedador resultan en la inducción y liberación de factores de virulencia específicos que manipulan los procesos celulares del hospedador y causan una respuesta sucesiva del hospedador, incluyendo, por ejemplo, la producción de factores

antimicrobianos por los sistemas de defensa inmune innatos de los mamíferos (Rohmer, L. et al., 2011).

### **1.2.1. Competencia por el alimento.**

En muchos hábitats, una amplia diversidad de bacterias compiten por el espacio y los recursos disponibles. En condiciones de nutrientes limitantes, las especies que extraigan y procesen los nutrientes de manera más eficiente pueden prevalecer al resto. En muchos casos (por ejemplo el intestino humano), los patógenos tienen que invadir nichos que se encuentran ampliamente ocupados por muchas bacterias residentes perfectamente adaptadas. Estos residentes han desarrollado maneras de procesar los nutrientes disponibles eficientemente y de proteger su medioambiente de especies bacterianas competidoras. Sobre la piel, la especie aeróbica predominante *Staphylococcus epidermidis* produce péptidos antimicrobianos que son tóxicos para el patogénico *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. En el tracto digestivo, la microbiota residente forma un vasto y heterogéneo ecosistema microbiano que comprende hasta  $10^{14}$  bacterias de más de 400 especies (Rohmer, L. et al., 2011).

### **1.2.2. Desafíos medioambientales dentro de los hospedadores.**

Los patógenos que invaden hospedadores animales colonizan distintos medioambientes, que a su vez son cambiantes. El pH dentro del cuerpo humano es casi neutro (7,4), pero puede ir de 1,0 en el estómago a 8,0 en la orina. Mediambientes dramáticamente diferentes son también encontrados por el patógeno cuando este se mueve desde las mucosas superficiales a la profundo de los tejidos del hospedador, por ejemplo cuando transita desde el lumen del estómago a través del mucus multicapas hasta las células epiteliales del estómago. Muchos ambientes encontrados por la bacteria luego de la invasión van desde las superficies mucosas animales bien oxigenadas hasta áreas con baja tensión de oxígeno como ser la cavidad oral, el intestino grueso, el tracto genital femenino, absesos, tejido dañado y vías aéreas de pacientes con fibrosis quística.

El sitio de la infección que la bacteria puede encontrar o colonizar puede ser subdividido en numerosos mediambientes fisiológicamente especializados. Los

patógenos deben moverse a través de múltiples y diversos ambientes durante su ciclo de vida, lo cual requiere regulación, coordinación y la utilización de vías metabólicas múltiples por parte del microorganismo invasor (Rohmer, L. et al., 2011).

### **1.2.3. Interacciones metabólicas dinámicas entre hospedadores y patógenos.**

Las modulaciones metabólicas dentro de los tejidos del hospedador pueden también ser usadas por el patógeno para regular coordinadamente la expresión de sus factores de virulencia. La represión por catabolito de carbono disparada en respuesta a la disponibilidad de una fuente de carbono influencia la virulencia en diversos patógenos Gram-negativos y Gram-positivos. Los cambios en la disponibilidad de nutrientes, incluyendo limitaciones en aminoácido o ácidos grasos, también pueden conducir a la activación de factores de virulencia a través de la denominada respuesta astringente mediada por (p)ppGpp. La disponibilidad de nutrientes no es constante. Por ejemplo, el hierro disponible es inclusive menor durante el curso de una infección ya que el hospedador produce proteínas que interaccionan con el metabolismo del hierro. Muchas bacterias interpretan esta depleción del hierro como una señal de que se encuentran dentro de un hospedador vertebrado y subsecuentemente modulan la producción de sus factores de virulencia. Para poder perdurar en el hospedador, las bacterias patógenas deben, además, competir con la flora residente por lugar y nutrientes. Desde una perspectiva evolutiva, los genes implicados en metabolismos han sido adquiridos por los patógenos de la misma manera que los genes de virulencia clásicos (Rohmer, L. et al., 2011).

### **1.2.4. Los genes metabólicos ayudan a las bacterias patógenas a colonizar nuevos territorios.**

Se ha observado que los microorganismos patógenos adquieren factores de virulencia que le permiten establecerse en nuevos nichos. Para establecerse en estos nuevos nichos, los patógenos también requieren de nuevas vías metabólicas, o de la adaptación de las que ya poseen, para poder explotar las fuentes de alimento disponibles. Se ha observado que las cepas menos virulentas de algunas bacterias

patógenas no poseen los genes que estarían implicados, directa o indirectamente, en rutas metabólicas específicas (Rohmer, L. et al., 2011).

La adquisición de islas genómicas codificantes de factores de virulencia, denominadas islas de patogenicidad, son esenciales para la colonización de nuevos nichos en hospedadores. Estas islas patogénicas a veces contienen genes que codifican rutas metabólicas específicas. Un reciente estudio demostró que la respiración de tetrionato le confiere a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo *Typhimurium* una ventaja en crecimiento cuando se encuentra en el lumen de un intestino humano inflamado. Las bacterias del colon producen grandes cantidades de sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) altamente tóxico que la mucosa caecal convierte en tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ) para protegerse a sí misma. La inflamación intestinal inducida por los factores de virulencia de *S. typhimurium* resulta en la producción de grandes cantidades de radicales óxido nítrico y especies reactivas del oxígeno en el lumen del intestino. Bajo estas condiciones el tiosulfato es oxidado a tetrionato ( $S_4O_6^{2-}$ ), el cual selectivamente inhibe coliformes. En contraste, *S. typhimurium* puede respirar el tetrionato para utilizar la etanolamina o el 1,2-propanodiol como fuentes de carbono para crecimiento anaeróbico en el lumen intestinal. Los cinco genes responsables de la utilización del tetrionato forman el operón *ttrABCRS* localizado en la isla de patogenicidad SPI2, la cual es crítica para la proliferación de *S. typhimurium*. Estos genes codifican los componentes estructurales de la tetrionato reductasa anaeróbica (*ttrABC*) y a dos componentes del sistema regulatorio (*ttrRS*) necesarios para la regulación de los genes estructurales. La fijación de SPI2 conteniendo los genes *ttr* dentro del genoma de *S. typhimurium* podría haber sido el resultado directo del éxito de las cepas que poseían *ttrABCRS* por sobre el resto. En este caso, los genes metabólicos y de virulencia está localizados en la misma isla de patogenicidad (SPI2) y ambos contribuyen a la invasión y colonización (Rohmer, L. et al., 2011).

Otro ejemplo de gen “metabólico” asociado a procesos infecciosos se observa en *Vibrio cholerae*. La isla de patogenicidad de *Vibrio* (VPI2) se encuentra exclusivamente en las cepas toxigénicas y codifica para un neuraminidasa que convierte los polisialogangliósidos de la superficie del hospedador en GM1 monogangliósidos (unen específicamente la toxina colérica), mediante la liberación de ácido siálico unido a los polisialogangliósidos. La neuraminidasa podría por lo tanto proveer específicamente una fuente de energía (ácido siálico) a las cepas de *V. cholerae* llevando VPI2. De hecho, además de la neuraminidasa, VPI2 posee un conjunto de genes posiblemente

involucrados en el catabolismo del ácido siálico (*nanA*, *nanE*, *nanK* y *nagA*). La inactivación de esta vía catabólica reduce la habilidad de *V. cholerae* de colonizar ratones en modelo animal. Por lo tanto, la presencia de la ruta de utilización de ácido siálico en VPI2 sería muy importante para una infección exitosa del intestino humano por *V. cholerae*. Interesantemente, el conjunto de genes *nan*, el cual permite la utilización del ácido siálico como fuente de carbono, es hallado casi exclusivamente en especies bacterianas íntimamente asociadas con mamíferos, muchas de las cuales son patógenas, como ser *E. coli*, *Shigella* spp, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium* spp. En estas especies los genes *nan* muestran muchos signos de transferencia horizontal, como ser: incongruente filogenia o contenido de G+C, asociación con elementos móviles y diversidad de estructura de operón (Rohmer, L. et al., 2011).

#### **1.2.5. Las bacterias patógenas pueden experimentar adaptaciones metabólicas.**

El ciclo de vida de un patógeno puede involucrar diferentes hospedadores y distintos nichos dentro de un mismo hospedador, los cuales tienen diferentes disponibilidades de nutrientes, demandando de la bacteria cierta versatilidad metabólica. Esta versatilidad es necesaria para que un patógeno pueda circular entre distintos nichos y/o en diferentes hospedadores. Para un dado patógeno, el requerimiento metabólico depende principalmente del hospedador infectado y de la ruta de inoculación. Por lo tanto, los genes “metabólicos” encontrados en el genoma de un patógeno deberían ser conservados a pesar de que no sean necesarios cuando el patógeno se encuentre en un nicho óptimo. En algunas circunstancias, sin embargo, las capacidades metabólicas de un patógeno pueden ser alteradas después de la pérdida de función debido a mutaciones, confiriéndole una ventaja dentro de un determinado nicho (Rohmer, L. et al., 2011). Cuando un patógeno evoluciona para colonizar establemente un nuevo nicho que ofrece mejores fuentes nutricionales, puede perder vías metabólicas innecesarias o poco utilizadas. Esta hipótesis ha sido comprobada para muchos patógenos en los cuales está ocurriendo una reducción del genoma. En particular, genomas de patógenos intracelulares especializados tienden a contener muchos pseudogenes, lo cual podría ser debido a que la abundancia de nutrientes dentro

de las células del hospedador hace que estos genes sean no utilizados (Rohmer, L. et al., 2011).

### 1.3. Represión catabólica.

En eubacterias, el sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS, phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system) es el principal sistema de toma de carbohidrato y, además, juega un rol importante en la regulación de la expresión de operones y genes catabólicos. El sistema es típico de eubacterias y no se encuentra en otros dominios, Arquea y Eucaria. Las bacterias han desarrollado un sofisticado mecanismo para adaptarse a los cambios medioambientales. Por ejemplo, la represión por catabolito de carbono (CCR, carbon catabolite repression) permite a las bacterias la asimilación de fuentes de carbono rápidamente metabolizables cuando están expuestas a más de un carbohidrato. CCR es un mecanismo complejo extensamente estudiado en *Enterobacteriaceae* y *Firmicutes* (Schaeffer, P. et al., 1965; Zomer, A. et al., 2007; Singh, K. D. et al., 2008; Fujita, Y., 2009; Marciniak, B. C. et al., 2012; Vinuselvi, P. et al., 2012). Interesantemente, los mecanismos principales de CCR son bastante diferentes en estos dos tipos de bacterias, pero ambos son mediados por componentes del PTS (Figura 7). Mecanismos de CCR independientes de PTS se encuentran en proteobacterias no entéricas y *Streptomyces*. Los componentes del PTS forman una cascada de fosforilación proteica que usa fosfoenolpiruvato (PEP, phosphoenolpyruvate) como donador de fosfato. Muchos de los mecanismos de CCR mediados por PTS responden al nivel de fosforilación de una proteína PTS, lo cual es controlado por el estado metabólico de la célula. La proteína glucoespecífica EIIA (EIIA<sup>Glu</sup>) es el regulador central del metabolismo de carbono en *Enterobacteriaceae*, mientras que en *Firmicutes*, HPr cumple este rol (Figura 7) (Warner, J. B. y Lolkema, J. S., 2003; Görke, B. y Stülke, J., 2008; Deutscher, J., 2008; Fujita, Y., 2009; Vinuselvi, P. et al., 2012).

En enterobacterias la incorporación de azúcares rápidamente metabolizables PTS incrementan los niveles de EIIA<sup>Glu</sup> desfosforilada. Solo EIIA<sup>Glu</sup>, pero no P-EIIA<sup>Glu</sup>, interacciona con varias proteínas de los sistemas de transporte de azúcares no PTS (lactosa, maltosa, melibiosa) e inhibe su actividad. Debido a que el azúcar no PTS transportado frecuentemente funciona como inductor del operón catabólico

correspondiente, este mecanismo de regulación fue apodado exclusión de inductor. El regulador génico final de esta cadena de señalización es CRP (Figura 7A), el cual es activado por cAMP y se une a las regiones promotoras de los genes que regula.

En *Firmicutes*, HPr tiene un rol central en CCR, además de transferir el fosfato del PEP a EIIA, Figura 7B (intermediario HPr-His-P como ocurre en enterobacterias). La exclusión de inductor en *Firmicutes* es mediada a través de una de las formas fosforiladas de HPr. La incorporación de fuentes de carbono preferidas cambia la concentración de metabolitos (incremento de fructosa-1,6-bisfosfato (FBP), ATP, PPi; pérdida de Pi), lo cual estimula la actividad quinasa de la enzima bifuncional HPr quinasa/fosforilasa (HprK/P). Esta cataliza la fosforilación ATP dependiente de HPr en Ser-46 y la desfosforilación de P-Ser-HPr (Figura 7). El transportador ABC para maltosa en *Lactobacillus casei*, y para maltosa y ribosa en *Lactococcus lactis* son instantáneamente inhibido cuando la glucosa u otra fuente de carbono está disponible. Se ha propuesto que P-Ser-HPr interactúa directamente con una de las proteínas de los transportadores ABC (Warner, J. B. y Lolkema, J. S., 2003; Görke, B. y Stülke, J., 2008; Deutscher, J., 2008; Vinuselvi, P. et al., 2012). El principal regulador global de CCR en *Firmicutes* es CcpA (catabolite control protein A), un regulador transcripcional pleiotrópico perteneciente a la familia LacI/GalR de factores de transcripción. Para unirse efectivamente al ADN, en secuencias de nucleótidos denominadas CRE (catabolite response elements), CcpA necesita interactuar con dos tipos de co-represores: P-Ser-HPr [en bacilo existe un parálogo P-Ser-Crh. (Lorca, G. L. et al, 2005)] y intermediarios glicolíticos, tales como FBP y glucosa-6-P. Los cambios estructurales inducidos por P-Ser-HPr son similares en presencia y ausencia de ADN. En contraste, las estructuras CcpA/P-Ser-HPr/CRE y CcpA/P-Ser-Crh/CRE muestran diferencias significativas, lo cual podría ser debido a las características de unión a CRE diferentes observadas con los dos co-represores. Se encontró que la FBP y la glucosa-6-P refuerzan las interacciones entre CcpA y P-Ser-HPr, favoreciendo las conformaciones propicias de unión a sitios CRE inducidas sobre CcpA por P-Ser-HPr (Warner, J. B. y Lolkema, J. S., 2003; Görke, B. y Stülke, J., 2008; Deutscher, J., 2008; Fujita, Y., 2009; Marciniak, B. C. et al., 2012; Vinuselvi, P. et al., 2012).

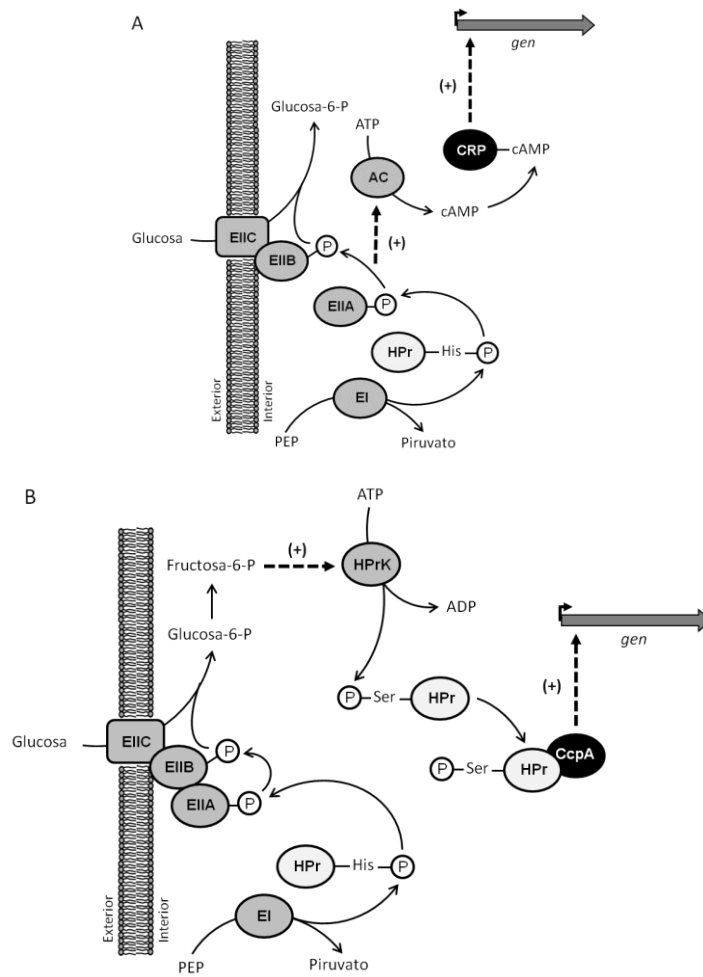


Figura 7: Representación esquemática del control por catabolito carbonado. A) Dependiente de CRP, se muestra sistema PTS para transporte de glucosa en organismo modelo *E. coli* (Gram-negativa). B) Dependiente de CcpA, se muestra sistema PTS para transporte de glucosa en organismo modelo *B. subtilis*, (*Firmicutes*, Gram-positivo). La proteína transportadora de fosfatos, HPr es fosforilada en un residuo de histidina por la enzima EI a expensas de fosfoenolpiruvato (PEP). El grupo fosforil es transferido a EIIA, la cual es citosólica en *E. coli* (A) o parte de un complejo multidominio EIIABC en *B. subtilis* (B). Desde EIIA el fosfato es transferido a EIIB, un dominio unido al transportador integral de membrana, EIIIC. La molécula de glucosa es transportada dentro de la célula al mismo tiempo que es fosforilada por EIIB, generando glucosa-6-fosfato en la célula. Los reguladores transcripcionales CRP (A) y CcpA (B) se muestran en negro. En (A) el grado de fosforilación de EIIA determina la actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC), consecuentemente la cantidad de cAMP en la célula. La formación del complejo CRP-cAMP resulta en la activación transcripcional de los genes blanco (regulación positiva). En (B) la fructosa-1,6-bifosfato producida a partir de la glucosa-6-fosfato durante la glicólisis, activa HPrK que fosforila HPr en el residuo serina. La unión de HPr-Ser-P a CcpA conduce a la formación de un complejo que es capaz de reconocer secuencias CRE (catabolite responsive element, elemento de respuesta a catabolito) presentes en las regiones promotoras de los genes regulados por CcpA (regulación positiva o negativa).

*B. subtilis* posee otros reguladores globales de CCR. CcpB controla la expresión de algunos genes catabólicos. Es también miembro de la familia de represores LacI/GalR, pero carece de las secuencias de aminoácidos específicas para la unión de P-Ser-HPr. CcpB podría ser solo regulada por catabolitos represores de bajo peso molecular. CcpC fue estudiado en *B. subtilis* y *Listeria monocytogenes*, es un miembro de la familia LysR que regula la expresión de *citB*, (aconitasa) y *citZ* (citrato sintasa), dos genes también controlados por CcpA. En *L.monocytogenes* CcpC además regula el gen codificante del transportador de glutatona. Finalmente, CcpN (anteriormente YqzB) en *B. subtilis* no solo media CCR de genes gluconeogénicos, sino que también controla la síntesis de SR1, un ARN pequeño no traducido (Deutscher, J., 2008).

La proteína bifuncional HprK/P, la cual controla los niveles de P-Ser-HPr en respuesta al estado metabólico celular, puede ser considerada como la principal enzima de transducción de señales en CCR en *Firmicutes*. En *B. subtilis* la desfosforilación de P-Ser-HPr parece ser catalizada principalmente por HprK/P. Esto sería distinto en *Mycoplasma pneumoniae*, el cual posee una HprK/P con baja actividad fosforilasa, siendo PrpC la encargada de desfosforilar la P-Ser (Deutscher, J., 2008; Fujita, Y., 2009; Marciniak, B. C. et al., 2012; Vinuselvi, P. et al., 2012).

### **1.3.1. Represión catabólica por carbono mediada por reguladores específicos.**

Los reguladores transcripcionales que median CCR de operones específicos generalmente contienen: dos dominos de regulación por PTS, PRDs (PTS regulation domains) y son anti-terminadores de unión a ARN (LicT o SacY en *B. subtilis*), o un dominio EIIB<sup>Gal</sup> y un dominio EIIA como los activadores de transcripción por unión a ADN tal como LevR en *B. subtilis*. El dominio EIIA puede ser de la familia manosa PTS o manitol/fructosa PTS. Estos reguladores de transcripción se encuentran principalmente en *Firmicutes*, pero aparecen también en *Enterobacteriaceae* y *Actinobacteria*. Ellos controlan la expresión de operones codificantes de componentes del PTS azúcar específicos y su actividad es regulada a través de la fosforilación catalizada por el PTS. La fosforilación en los PRDs (antiterminadores) o en los dominios EIIA (activadores de transcripción) dependiente de P-EIIB inhibe la actividad de estos reguladores transcripcionales. Si el sustrato correspondiente del PTS está

presente, P-EIIB transferirá su grupo fosforil principalmente al carbohidrato y no inactivará más el regulador transcripcional. Este mecanismo es usado para la inducción del operón correspondiente. Para ser completamente activo, algunos reguladores transcripcionales conteniendo PDRs necesitan ser fosforilados en uno de sus PDRs por P-His-HPr. Esta fosforilación activante es prevenida cuando una fuente de carbono rápidamente metabolizable, tal como glucosa, está presente y este mecanismo es usado para CCR. Los antiterminadores activados se unen a estructuras en el ARN y previenen la formación de un terminador adyacente (Deutscher, J., 2008; Vinuselvi, P. et al., 2012).

### 1.3.2. Mecanismos de CCR en otras bacterias.

Muchas bacterias no poseen CcpA, ni CRP/CyaA, ni PTS funcionales, pero sin embargo muestran CCR. Aunque algunas *Pseudomonas* poseen una proteína similar a CRP y un PTS para glucosa. *P. putida* carece de estas proteínas y su principal regulador de CCR es una única proteína de control de la represión catabólica Crc (catabolite repression control). CCR mediado por Crc controla la expresión de los genes *alkS* y *benR* en *P. putida*, los cuales codifican activadores de transcripción de los genes para la degradación de alcanos y las vías de conversión de benzoato/catecol, respectivamente. Crc se une a los mARNs de *alkS* y *benR* inhibiendo su traducción. Esta regulación es muy compleja e involucra también PtsN, una EIIA de la familia de PTS para fructosa/manitol (Deutscher, J., 2008). En *P. aeruginosa* la actividad de Crc es regulada por un ARN pequeño (CrcZ), el cual, al estar presente, secuestra a Crc evitando que puede ejercer su efecto represor. Cuando *P. aeruginosa* crece en succinato, una fuente de carbono preferida, resulta en represión catabólica de la expresión de *amiE* (codificante de una amidasa alifática) y otros genes regulados por Crc. En cambio, cuando la fuente de carbono es pobre, como ser manitol, aumentan los niveles de CrcZ y se libera la represión catabólica. Cuando esta bacteria crece en glucosa los niveles de CrcZ y de expresión de *amiE* son intermedios. La expresión de *crcZ* en *P. aeruginosa* depende del sistema de dos componentes CrcA/CrcB, permitiéndole el sistema CrcA-CrcB-CrcZ-Crc adaptarse diferencialmente a distintas fuentes de carbono (O'Toole, G. A., et al., 2000; Sonnleitner, E. et al., 2009).

En Streptomyces, CCR es llevada a cabo a través de la glucoquinasa (Glk), la cual no solo tiene un rol catalítico sino que, también, regulatorio. La evidencia propone que Glk se encuentra asociada a membrana cuando las células crecen en glucosa o cuando la glucosa permeasa GlcP es sobreproducida. Se cree que las modificaciones post-traduccionales harían que Glk funcione como enzima (interaccionando con GlcP) o como regulador, interaccionando con factores de transcripción (Deutscher, J., 2008).

### 1.3.3. CCR regula comportamientos sociales y patogenicidad en bacterias.

En *B. subtilis* la formación de comunidades microbianas, biofilms, responde a señales medioambientales. Uno de los fenómenos que regula la producción de biofilm es CCR, observándose que ante la presencia de carbohidratos rápidamente metabolizables (por ejemplo glucosa) reduce marcadamente la generación de biofilm. Esta inhibición por CCR depende de la proteína reguladora CcpA, ya que una cepa mutante en *ccpA* no responde a glucosa y produce un biofilm similar al observado en la cepa salvaje isogénica en ausencia de CCR por glucosa (Stanly, N. R. et al, 2003).

Para el caso del *Firmicutes*, *Streptococcus pneumoniae*, CcpA controla la expresión de varios factores de virulencia en respuesta a la disponibilidad de nutrientes. La producción de la streptolisina S es reprimida por glucosa de manera CcpA dependiente (Görke, B. y Stülke, J., 2008; Kinkel, T. L. y McIver, K. S., 2008).

La expresión de los genes necesarios para la entrada en la célula del hospedador, la liberación hacia el citosol a partir del fagosoma y para la movilidad intra e intercelular en *Listeria monocitogenes* son controlados por el activador transcripcional PrfA. La actividad de PrfA es fuertemente inhibida por glucosa u otros sustratos del PTS (CCR). Sin embargo, esta represión no depende de los componentes clásicos CcpA, HPrK y HPr-Ser-P (Görke, B. y Stülke, J., 2008).

En el caso de *P. aeruginosa* la forma de los biofilms que esta bacteria produce depende estrechamente de la fuente de carbono presente en el medio circundante. De acuerdo a las observaciones y estudios realizados, se ha propuesto el siguiente modelo que relaciona la movilidad sobre superficies con las primeras etapas de formación del biofilm. Bajo condiciones que promueven la movilidad tipo swarming, las células están en constante movimiento, se multiplican y continúan moviéndose, por lo que forman biofilm chatos y uniformes. En cambio cuando el swarming es limitado, tal como ocurre

cuando la bacteria es crecida en presencia de glucosa, se producen biofilms con agregados celulares. Por lo tanto, el proceso de CCR reprime el swarming en *P. aeruginosa* e indirectamente afecta la forma de las comunidades sociales que forma este microorganismo (Shrout, J. D. et al., 2006).

En *E. coli* uropatógena cepa 536WT, la formación de la fimbria S es esencial para la adherencia a las moléculas receptoras eucariotas conteniendo ácido siálico. La expresión del gen fimbrial correspondiente *sfaA* está sujeto a CCR y depende de la activación por cAMP-CRP (Görke, B. y Stülke, J, 2008).

#### **1.4. *Clostridium perfringens*.**

El género *Clostridium* (*Firmicutes*) consiste de un grupo de bacterias Gram-positivas, anaeróbicas y formadoras de esporas. Muchas de estas bacterias son patógenas para humanos y animales, siendo las enfermedades resultantes, como tétano, botulismo, gangrena gaseosa y colitis pseudomembranosa, resultado de la producción de potentes toxinas extracelulares (Dupuy, B. y Matamouros, S., 2006).

*Clostridium perfringens* es considerado el patógeno más ubicuo y ampliamente distribuido de la naturaleza (Shimizu, T. et al., 2002; Myers, G. S. et al., 2006). Las especies de este microorganismo han sido divididas en cinco tipos distintos que van del A al E (Tabla 1). Dentro de estos subgrupos, *C. perfringens* tipo A causa la mayoría de las infecciones en humanos. Aunque es clasificado como anaerobio, *C. perfringens* posee cierta tolerancia al oxígeno (aerotolerante). Bajo condiciones óptimas, el tiempo de generación puede ser de tan solo 8 a 10 minutos, y su crecimiento es acompañado por una gran producción de gas (Figura 8) (Stevens, D. L. y Bryant, A. E., 2002). Dos factores clave que han permitido la amplia distribución y patogenicidad de *C. perfringens* son su habilidad de producir numerosos factores relacionados a virulencia y su capacidad de formar esporas durmientes altamente resistentes (Shimizu, T. et al., 2002; Philippe, V. A. et al., 2006). Aislados virulentos de *C. perfringens* producen hasta trece toxinas proteicas diferentes (Shimizu, T. et al., 2002; Myers, G. S. et al., 2006; Philippe, V. A. et al., 2006) y un número similar de otras proteínas relacionadas a virulencia, como ser por ejemplo proteínas de unión a matriz extracelular (Shimizu, T. et al., 2002; Shimizu, T., Yaguchi, H. et al., 2002), las cuales son importantes para el desarrollo de las diferentes enfermedades (intoxicaciones alimentarias, diarrea asociada

al uso de antibióticos y gangrenas gaseosas fatales) producidas por este patógeno (Tabla 1) (Stevens, D. L. y Bryant, A. E., 2002; Myers, G. S. et al., 2006).

*C. perfringens* es uno de los agentes causantes más comunes de intoxicaciones por alimentos contaminados con esta bacteria, superado solo por *Salmonella* y *Staphylococcus* en frecuencia de enfermedades relacionadas a alimentos contaminados de etiología conocida en Estados Unidos. Los síntomas asociados con la intoxicación alimentaria por *C. perfringens* son causados por una enterotoxina denominada CPE (*Clostridium perfringens* enterotoxin) compuesta de un simple polipéptido de 36 kDa. La proteína CPE se une a un receptor localizado en la superficie de las células epiteliales de mamíferos, insertándose luego en la membrana. Una vez insertada, en asociación con polipéptidos de membrana propios del hospedador de 50 y 70 kDa, esta toxina forma un canal. Como resultado la membrana se hace permeable a electrolitos, llevando a la muerte celular y a los síntomas de la enterotoxemia, calambres intestinales y diarrea (Melville, S. B. et al., 1994).

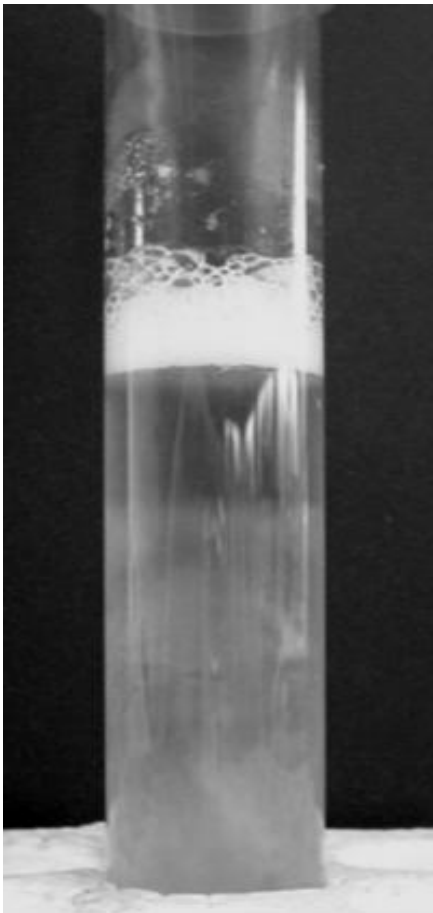


Figura 8: Foto ilustrativa de la generación de gases durante el crecimiento de *C. perfringens*. Puede observarse la gran cantidad de espuma superficial producida por los gases biosintetizados en tubo de ensayo estático con medio de cultivo FTG (sección 3.2.). Puede visualizarse, además, la coagulación del caldo. Esta gran producción de gases favorece la generación rápida de anoxia en el medio circundante de este patógeno, ya que el oxígeno es expulsado del medio de cultivo. Este fenómeno se produce en el tejido del hospedador infectado y da nombre a la patología necrótica provocada por *C. perfringens*, gangrena "gaseosa".

**Tabla 1: Principales toxinas producidas por *C. perfringens*.**

<b>Toxina</b>	<b>Actividad biológica y modo de acción</b>	<b><i>C. perfringens</i> Tipo</b>
<b>Toxina alfa (PLC)</b>	Fosfolipasa C y esfingomielasa. Citolítica, dermonecrótica, letal. Promueve la agregación plaquetaria, generando anoxia por obturación de vasos sanguíneos durante la gangrena gaseosa.	A, B, C, D, E
<b>Toxina beta (Beta-hemolisina)</b>	Citolítica, dermonecrótica y provoca necrosis hemorrágicas letales en la mucosa del intestino. Formación de poros y posible ruptura de membranas celulares.	B, C
<b>Toxina delta</b>	Actividad contra eritrocitos, GM2 específica.	B, D
<b>Toxina épsilon</b>	Alteración de la permeabilidad de membrana celular. Provoca edema en varios órganos: hígado, riñón y sistema nervioso central. Dermonecrótica y letal.	E
<b>Toxina theta (PFO)</b>	Citotóxica para macrófagos. Importante en los estadios iniciales de la infección. Involucrada en el escape de <i>C. perfringens</i> al fagosoma del macrófago.	B, C
<b>Toxina iota</b>	Compuesta de dos proteínas separadas, $\iota_a$ (ADP-ribosilación de G-actina) y $\iota_b$ componente de unión a receptor.	A, B, C, D, E
<b>Toxina kappa (Colagenasa)</b>	Degradación de colágeno. Destrucción de tejido y avance de la infección.	A, B, C, D, E
<b>Toxina lambda</b>	Metaloproteasa. Degrada proteínas del hospedador y activa proteolíticamente a las toxinas épsilon e iota.	B, D, E
<b>Toxina mu (Hialuronidasa)</b>	Endo-beta-N-acetilglucosaminidasa. Capaz de actuar sobre tejido conectivo. Permitiría avance de la infección.	A, B, C, D
<b>Toxina nu</b>	Desoxiribonucleasa	A, B, C, D, E
<b>Neuraminidasa (Sialidasa)</b>	Remueve ácido siálico de un gran número de glicoproteínas, glicolípidos y oligosacáridos. Estaría involucrada en la patogenia y nutrición de <i>Clostridium</i> .	A, B, C, D, E
<b>CPE (Enterotoxina)</b>	Citotóxica, eritematosa, provoca pérdida de agua e iones por enterocitos, diarrea. Forma poros en las membranas de las células epiteliales de intestino.	A, B, C, D, E

Referencias: Rood, J. I. y Cole, S. T., 1991; Cavalcanti, M. T. H. et al., 2004.

#### 1.4.1. Pili tipo IV, movilidad y formación de biofilms en *C. perfringens*.

*C. perfringens* había sido descrito inicialmente como una bacteria no móvil (Bergey, D. H. et al., 1986). Sin embargo, la secuenciación genómica de tres cepas

diferentes de *C. perfringens*: Cepa 13, ATCC13124 y SM101, arrojó datos que pondrían en duda esta afirmación. A pesar de que no presentan proteínas con homología a las necesarias para la síntesis de flagelo y para quimiotaxis, las tres contienen genes que codifican para los componentes del pili tipo IV, como ser *pilA*, *pilB*, *pilC*, *pilD*, *pilM*, *pilN*, *pilO* y *pilT* (Figura 9). Los genes para la síntesis del T4P no se restringe solo a *C. perfringens*; un análisis por BLAST, utilizando las proteínas PilB, PilC, PilD y PilT, indicó que otros clostridios como *C. beijerinchii*, *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. acetobutylicum* y *C. difficile* tendrían genes y arreglos de genes codificantes para componentes del T4P. *C. perfringens* y *C. beijerinchii* utilizan los T4P para desplazarse mediante la movilidad tipo gliding. Todas las cepas de *Clostridia* secuenciadas tendrían la capacidad de sintetizar pili tipo IV, siendo posiblemente capaces de desplazarse por gliding (Varga, J. J. et al., 2006).

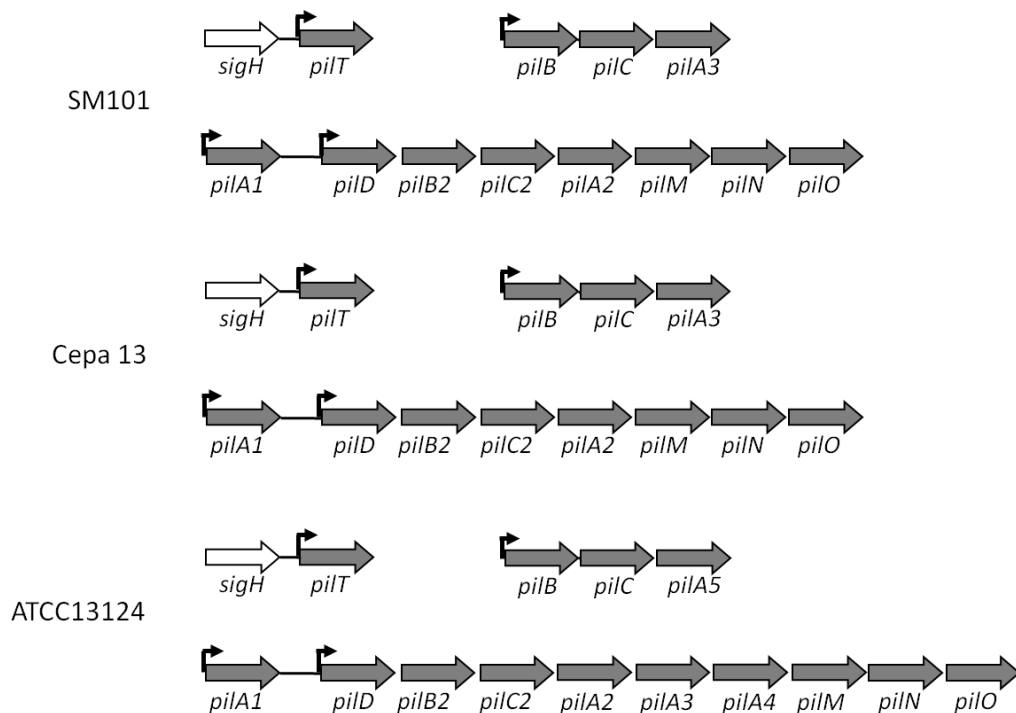


Figura 9: Genes involucrados en la síntesis y función del T4P en *C. perfringens*. Se muestra el arreglo génico de los genes *pil* (gris) en los cromosomas de tres cepas de este patógeno. *sigH* (blanco) codifica el factor sigma H alternativo de la ARN polimerasa (Varga, J. J. et al., 2006).

*C. perfringens* tiene una forma inusual de desplazarse a partir de la colonia: las bacterias están contenidas en una proyección o erupción empacada apretadamente, la cual, al tener una forma curvilínea, siempre contacta o el borde de la colonia u otra proyección. El movimiento recuerda a la movilidad S de *M. xanthus*, pero tiene algunas diferencias significativas. Si la base de estas proyecciones de células en movimiento son desacopladas del extremo de la colonia, las células en el punto del corte pueden verse revertiendo su dirección de avance, pero siempre como grupo, nunca como células individuales. Estas características de movilidad le permiten a la bacteria dispersarse a partir de la colonia establecida, donde los niveles de nutrientes han caído y podrían haberse acumulado metabolitos tóxicos (Varga, J. J. et al., 2006).

El arreglo de los genes codificantes para el pili de tipo IV en las cepas de *C. perfringens* indica que tienen varios aspectos en común con las bacterias Gram-negativas. Las proteínas centrales involucradas en la síntesis de la pilina y en su función, PilA-D y PilT están altamente conservadas. Esto sugiere que el ensamblado y desensamblado de los polímeros de PilA podrían funcionar de forma similar a la propuesta para Gram-negativas. La aparente similaridad en el plegado tridimensional de PilA en *C. perfringens* y en bacterias Gram-negativas sugiere un origen y mecanismos de ensamblado del pili comunes. La ausencia de homólogos a PilQ es de esperarse en bacterias Gram-positivas ya que carecen de membrana externa. Sin embargo, el pili debe atravesar una densa capa de peptidoglicano en la pared celular de *C. perfringens*. La apertura en la capa de peptidoglicano debe ser mantenida cuando el aparato basal del pili es sintetizado pero el pili no está aún extendido, ya que la extensión del pili por sí mismo no parece ser suficientemente fuerte para penetrar la capa de peptidoglicano. Algunas de los péptidos predichos asociados con los genes del T4P (en la Cepa 13, CPE1842-CPE1841 o CPE2280-CPE2277) podrían tener un rol en esta función. La proteína PilT ha demostrado estar involucrado en la extensión del pili. El fenotipo de un mutante *pilT* de *C. perfringens* coincide con el un mutante en *pilB* (PilB está involucrado en la extensión del pili); las proteínas PilB y PilT comparten un alto grado de homología en otras especies bacterianas. Sin embargo, el producto del gen *pilT* contiene motivos que están altamente conservados en otras proteínas PilT pero están ausentes en PilB. La falta de pili en la superficie de una mutante *pilT* sugiere que PilT tiene un rol diferente en *C. perfringens* que la retracción o ensamblado del pili, comparado con lo observado en bacterias Gram-negativas (Sección 1.1.8.), mostrando

un mecanismo de sensado que previene que la bacteria ensamble un pili no funcional (Varga, J. J. et al., 2006).

Se ha estudiado el rol del pili de *C. perfringens* en la virulencia, analizando el comportamiento de mutantes deficientes en la síntesis del T4P. Se utilizaron mutantes de la Cepa 13, productora de gangrena gaseosa, en los genes *pilT* y *pilC*. En modelo de infección por gangrena en ratón, las cepas mutantes en *pilT* y *pilC* mostraron un mismo fenotipo, en el cual el ratón moría a dosis similares a las usadas con la cepa isogénica salvaje de *C. perfringens*, Cepa 13. A pesar de no haber diferencia en la dosis letal entre las mutantes en pili y la cepa salvaje, sí se observó menores índices de daño durante el curso de la infección para el caso de las mutantes *pilT* y *pilC* (Varga, J. J. et al., 2006).

*C. perfringens* es capaz de formar biofilms. Las condiciones para en las cuales forma estas comunidades son cultivos estáticos crecidos en anaerobiosis durante 5 días. Los biofilms formados son de 30 a 40  $\mu\text{m}$  de espesor donde las bacterias se encuentran dentro de una denza matriz intercelular. Cepas de *C. perfringens* mutantes en pili tipo IV muestran biofilms con menos cantidad de bacterias y matriz intercelular. Debido a la falta de movilidad en los mutantes en el T4P, y que este pili parece ser un componente de la matriz del biofilm, la carencia del mismo parece ser la causa de que los biofilms formados por estos mutantes sean menos densos que los de las cepas salvajes. La matriz del biofilm está compuesta por carbohidratos y proteínas del T4P. El biofilm generado por *C. perfringens* le conferiría resistencia a las agregaciones externas, como ser los antibióticos. Esto podría explicar las enteritis asociadas al uso de antibióticos que puede producir este patógeno. La habilidad de formar estas estructuras multicelulares (biofilms) le darían la capacidad de persistir en el intestino a pesar de la terapia con antibióticos. *C. perfringens* tiende a formar rápidamente biofilms bajos condiciones de cultivo que asemejan el tejido del hospedador, indicando que es probable que la producción de biofilms ocurra *in vivo* (Varga, J. J. et al., 2008).

#### **1.4.2. La gangrena gaseosa producida por *C. perfringens*.**

La gangrena gaseosa provocada por *Clostridium* (mionecrosis clostridial) es una infección aguda y devastadora que se desarrolla luego de la entrada de células vegetativas o esporas de *C. perfringens* tipo A en el cuerpo a través de una herida o enfermedad predisponente (por ejemplo, diabetes o cáncer de colon) (Bryant, A. E.,

2003; O'Brien, D. K. y Melville, S. B., 2004; O'Brien, D. K. et al., 2007). Una vez establecida en el sitio de infección, las células vegetativas de *C. perfringens* o sus esporas germinadas crecen rápidamente, resultando en una invasión considerable y en la destrucción de tejidos sanos circundantes debido a la acción de proteínas extracelulares tóxicas, las cuales causan la necrosis del tejido del hospedador (Stevens, D. L. y Bryant, A. E., 2002; Bryant, A. E., 2003; Flores-Díaz, M. y Alape-Girón, A., 2003; Hickey, M. et al., 2008; Kennedy, C. L. et al., 2009). Dos toxinas son esenciales para el establecimiento y progresión de la gangrena gaseosa clostridial: la toxina alfa, también denominada PLC, la cual es una exo-enzima con actividad fosfolipasa C y esfingomielasa (Bryant, A. E., 2003; Flores-Díaz, M. y Alape-Girón, 2003; Hickey, M. J. et al., 2008), y la toxina theta o perfringolisina O (PFO), una citolisina thiol activada (Tabla 1) (Stevens, D. L. y Bryant, A. E., 2002; Bryant, A. E., 2003; O'Brien, D. K. y Melville, S. B., 2004). Ambas toxinas actuarían sinérgicamente para crear un medioambiente anóxico y proveer los nutrientes dentro del tejido del hospedador infectado a medida que la gangrena gaseosa avanza (varios centímetros por hora), a pesar de una apropiada terapia antibiótica (Stevens, D. L. y Bryant, A. E., 2002; Flores-Díaz, M. y Alape-Girón, 2003; O'Brien, D. K. y Melville, S. B., 2003; O'Brien, D. K. y Melville, S. B., 2004; O'Brien, D. K. et al., 2007; Hickey, M. J. et al., 2008).

La primera defensa del hospedador contra *C. perfringens* en las etapas tempranas de una infección post-traumática parece ser la de las células fagocíticas de la respuesta inmune innata, principalmente PMNs (polimorfonucleares) y monocitos/macrófagos. En las etapas más tardías de la infección, cuando las bacterias se han multiplicado y extendido haciendo la gangrena gaseosa clínicamente evidente, hay una importante carencia de fagocitos en la vecindad inmediata de las bacterias. Las infecciones por *C. perfringens* comienzan generalmente en tejidos hipóxicos, sin embargo la carencia de oxígeno no es una barrera para las funciones bactericidas dependientes de PMNs y macrófagos, ya que está bien documentado que ambos tipos de células retienen sus actividades bactericidas en condiciones de anaerobiosis. Por lo tanto, la resistencia a la muerte mediada por los fagocitos parece ser un factor importante en el curso de una infección gangrenosa. El número inicial de bacterias es probablemente bajo al principio, pero el crecimiento bacteriano en los tejidos isquémicos conduce al desarrollo del caso clínico de gangrena. El mecanismo de resistencia a la muerte mediada por PMNs es aún desconocida, aunque PFO y PLC han mostrado ser citotóxicas y deshabilitar la quimiotaxis de los PNM. Además de los PMNs, los monocitos y macrófagos, las otras

células fagocíticas de la respuesta inmune innata, juegan un papel en la inhibición del crecimiento de *C. perfringens* en los tejidos del hospedador. *C. perfringens* ha mostrado la capacidad de escapar del fagosoma de macrófagos, pero aún debe determinarse si puede replicarse dentro del citosol de los macrófagos. Este hallazgo conduce a la hipótesis de que *C. perfringens* encuentra tempranamente a las células fagocíticas, como ser los macrófagos, durante el curso de la infección en humanos, siendo capaz de resistir a la muerte mediada por el fagocito y, si el tejido es isquémico, puede crecer y desarrollar la gangrena gaseosa. Estudios *in vitro* con macrófagos ha mostrado que PFO tiene un rol más importante en el escape del fagosoma de macrófagos peritoneales que PLC. Estudios *in vivo* han demostrado que PFO no es necesaria para iniciar la gangrena cuando la relación bacterias-fagocitos es alta, mientras que cepas deficientes en PLC fallan en iniciar la patología en ratones. Estos resultados sugieren que PFO tiene un rol más significativo en el proceso infeccioso cuando el número relativo de bacterias, en relación a las células fagocíticas, es bajo. En contraste a PFO, PLC fue necesaria tanto para la iniciación de los síntomas de la gangrena como para la persistencia de *C. perfringens* en tejido muscular de ratón. Aunque PLC parece tener poco efecto citotóxico sobre macrófagos, una variedad de otras funciones que son importantes para la iniciación y la diseminación de la infección gangrenosa han sido asociadas a PLC. Estas incluyen: incrementar la producción de interleuquina 8 y la sobreproducción de moléculas de adhesión sobre la superficie de las células endoteliales, incrementar la coagulación mediante la activación de gpIIbIIa en plaquetas, y efectos sobre el estallido respiratorio de PMNs en respuesta a antígenos (Bryant, A. E., 2003; O'Brien, D. K. y Melville, S. B., 2004). PLC inicia una cascada de señales de afuera hacia adentro de la célula que comienza con la depleción de los depósitos de calcio y culmina con la activación funcional de gpIIbIIIa. Estudios de neutralización con anticuerpos monoclonales contra PLC sugieren que la activación de gpIIbIIIa es una consecuencia directa de la actividad PLC y/o esfingomielasa de la toxina y no por unión a receptor. Estos resultados sugieren que el bloqueo de canales de calcio y/o estrategias terapéuticas dirigidas contra gpIIbIIIa, tal como aquellas usadas de rutina para tratar infartos de miocardio agudos, podrían prevenir la oclusión vascular, manteniendo la viabilidad del tejido, proveyendo una alternativa a la radical amputación en pacientes con gangrena gaseosa (Bryant, A. E., 2003).

La gangrena gaseosa es una patología muy compleja, pero se piensa que es mediada por la destrucción en la perfusión del tejido, y está asociada con alteraciones en la

agregación plaquetaria y en la marginación de leucositos. Análisis histológicos de tejidos infectados de humanos y animales de experimentación, han revelado un patrón característico de extensiva mionecrosis, edema, trombosis y restricción de la infiltración leucositaria a la región perivascular en el sitio de la infección (Hickey, M. J. et al., 2008). Los hallazgos indican que las toxinas de *C. perfringens* inducen una rápida y severa reducción del flujo sanguíneo, observaciones correlacionadas con la habilidad de esta bacteria de inducir rápidamente mionecrosis. La visualización de la microcirculación indica que el flujo de sangre en los capilares se reduce dramáticamente. Considerando en rol central de esto capilares en la liberación de oxígeno y nutrientes, este efecto podría tener una importante contribución a la necrosis que ocurre en el tejido infectado. La reducción del flujo sanguíneo es debida en parte a que PLC induce la agregación plaquetaria y de leucositos, la que conduce a la obturación de los capilares (el agente anti-trombótico heparina protege del colapso vascular inducido por PLC). Leucostasis vacular y la ausencia de neutrófilos es una característica de los casos clínicos de mionecrosis clostridial, pero los mecanismos de esta leucostasis y su contribución al proceso de mionecrosis permanecen desconocidos (Ellenor, D. H. et al., 1999). En animales tratados con sobrenadantes de una cepa de *C. perfringens* no productora de PLC se observa una significativa atenuación del déficit en perfusión que ocasiona normalmente *C. perfringens*. De manera similar, sobrenadante de un mutante de *C. perfringens* que no produce PFO resulta en una completa abolición del colapso microvascular que se observa en respuesta a superfusiones con sobrenadantes de la cepa salvaje de *C. perfringens*. La ausencia de ambas toxinas conlleva a una mínima reducción de la perfusión, comparable con la observada luego de la superfusión de caldo de cultivo solo. Cuando se hicieron estudios de complementación de la doble mutante en PLC y PFO, se observó que la complementación de PLC induce una reducción de la perfusión similar a la observada cuando se utilizó sobrenadante de la cepa salvaje de *C. perfringens*. En cambio, la complementación solo de PFO resultó en una respuesta variable que no fue muy diferente a la evidenciada con sobrenadante de la cepa doble mutante que no produce ni PLC ni PFO (Hickey, M. J. et al., 2008).

### 1.4.3. Regulación de la producción de toxinas en *C. perfringens*.

*C. perfringens* es el más prolífico productor de toxinas dentro del género *Clostridium*. Se piensa que las toxinas de las distintas cepas de *C. perfringens* actúan de forma sinérgica en el desarrollo de la patogénesis, mostrando un alto grado de variabilidad fenotípica y patogénica. Por lo que el entendimiento del control de la expresión de los genes de las toxinas es crítico en la lucha contra las enfermedades causadas por este microorganismo (Frandi, A. et al., 2010).

Los patógenos generalmente tienen mecanismos de control precisos para la producción de toxinas de tal forma que la expresión tiene lugar solo cuando es requerida, como ser: cuando la densidad de la población bacteriana llega a cierto umbral, o cuando la bacteria llega a cierto órgano, tejido o tipo de célula (Frandi, A. et al., 2010). En *C. perfringens*, Cepa 13 (gangrena gaseosa), el rol principal en la integración de las señales medioambientales con los componentes de virulencia le corresponde al sistema de dos componentes VirR/VirS, donde VirR es el regulador de respuesta y VirS es la proteína sensora anclada en la membrana. El sistema VirR/VirS interviene en la regulación global de la producción de PLC, PFO, la toxina kappa (colagenasa), una sialidasa, una proteasa y una hemaglutinina en *C. perfringens*. VirR/VirS regula los niveles de ARN mensajeros de *plc* (PLC), *pfoA* (PFO) y *colA* (colagenasa), Figura 10 (Okumura, K. et al., 2008; Cheung, J. K. et al., 2009).

Las secuencias blanco de VirR en las regiones promotoras de los genes regulados directamente están formadas por un par de repeticiones directas imperfectas, separadas por 7 a 8 nucleótidos. Estas repeticiones son conocidas con “VirR box1” (VB1) y “VirR box2” (VB2) y se encuentran dentro de una región core de aproximadamente 50 pares de bases, localizada inmediatamente corriente arriba del elemento -35 de los promotores de los genes regulados por VirR. Tanto VB1 como VB2 son necesarias para mediar la activación transcripcional dependiente de VirR, la mutación de cualquiera de ellos reduce dramáticamente los niveles de expresión de los genes blanco. Se requiere de la unión de VirR a estas cajas para que la ARN polimerasa se posicione eficientemente. Concordante con esto, todos los genes regulados directamente por VirR tienen las dos cajas en la misma posición relativa respecto al promotor y están en la misma cara de la hélice de ADN. El espaciamiento entre VB1 y VB2 así como la cara en la que se encuentran es crucial para la activación transcripcional. Si se modifica la distancia entre VB1 y VB2 mediante la adición o deleción de 5 pares de bases colocando las cajas en

caras apuestas de la hélice se reduce pronunciadamente los niveles de expresión de los genes controlados por VirR (Frandi, A. et al., 2010).

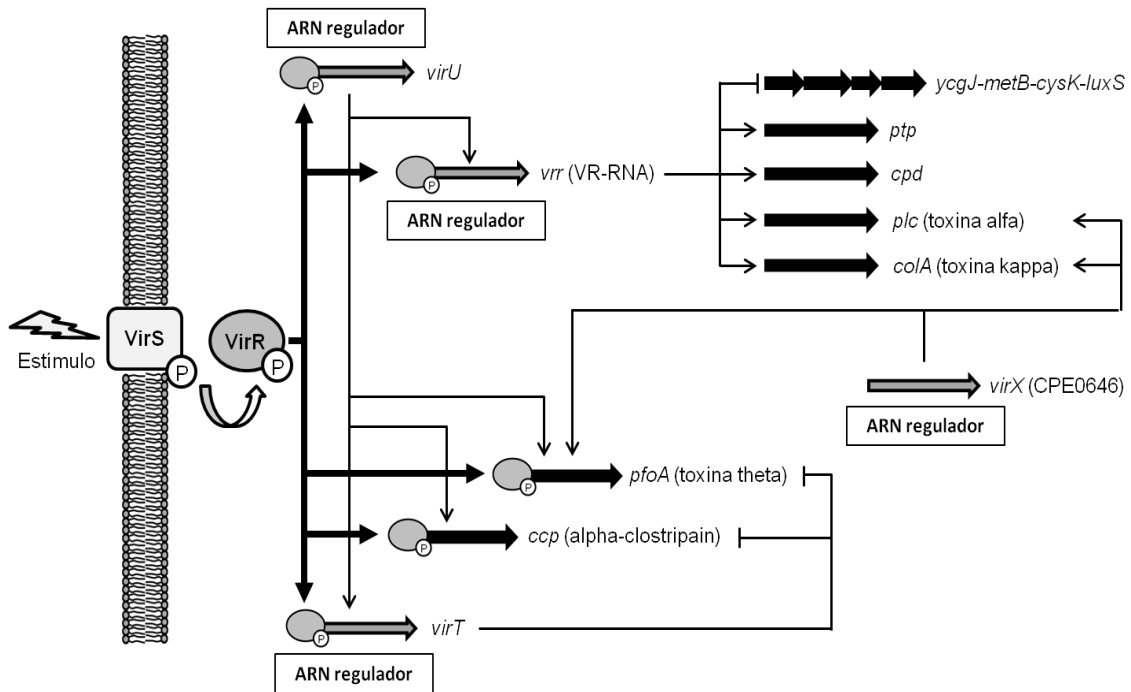


Figura 10: Esquema representando la regulación de toxinas mediante el sistema de dos componentes VirR/VirS en *C. perfringens* Cepa 13 (gangrena gaseosa). Las flechas gruesas grises representan genes codificantes de ARN reguladores. Las flechas gruesas negras representan genes codificantes de proteínas. La regulación positiva se representa con punta de flecha y la negativa con una pequeña barra perpendicular a la dirección de la línea.

El sistema VirR/VirS, sorprendentemente, regula directamente solo cinco genes en *C. perfringens* a través de VirR: *pfoA*, *vrr*, *virT*, *ccp* y *virU* (Figura 10). Sin embargo, este sistema influye la expresión de muchos otros genes, como ser *plc*, *colA*, *cpd* (codificante de una fosfodiesterasa de nucleótidos 2', 3'-cíclicos), *ptp* (codificante de una proteína tirosina fosfatasa), *ycgJ* (proteína hipotética), *metB* (codificante de una cistationa gamma-liasa), *cysK* (codificante una cisteína sintasa) y *luxS* (codificante de la proteína para la producción del autoinductor 2, AI-2) (Figura 10). Para *plc*, *colA*, *cpd*, *ptp*, y *ycgJ-metB-cysK-luxS*, es necesario el ARN regulador VR-RNA, codificado por *vrr* (bajo control de VirR). Existe, por otro lado, otro ARN regulador, *virX*, el cual controla los niveles de los ARN mensajeros de *pfoA*, *plc*, y *colA* independientemente de la cascada regulatoria de VirR/VirS. Además, la señalización célula-célula mediada por

AI-2 (sintetizado por LuxS), juega un importante rol en la producción de toxinas, siendo el sistema que media esta regulación desconocido. El regulón VirR/VirS incluye a otras dos moléculas de ARN regulatorias *virT* y *virU*. Dos genes parecen ser controlados por *virT* (*pfoA* y *ccp*), mientras que *virU* es activo en cuanto a la expresión de *pfoA*, *ccp*, *vrr* y *virT* (Figura 10). Es claro que VirR/VirS está en la cima de una cascada regulatoria donde directamente estimula la transcripción de varios genes relacionados con la virulencia de *C. perfringens*, incluyendo tres ARNs regulatorios diferentes, que a su vez son capaces de controlar la expresión de otros genes (Figura 10) (Okumura, K. et al., 2008; Frandi, A. et al., 2010).

Recientemente fue descubierto otro sistema de dos componentes que regula la producción de enzimas extracelulares y virulencia de forma independiente de VirR/VirS. Este regulador se denominó RevR y tienen similitud de secuencia con PhoB de *Clostridium kluyveri* (62 % de identidad de aminoácidos) y con YycF de *B. subtilis* (49 % de identidad). Estos dos reguladores generalmente forman parte de sistemas de transducción de señales de dos componentes, PhoB/PhoR y YycF/YycG, respectivamente. Pero a diferencia de estos sistemas, no se pudo identificar un gen que codificara para la proteína quinasa sensora ni corriente arriba ni corriente abajo de *revR*. RevR parece ser un regulador de respuesta huérfano, que sería fosforilado por una quinasa no identificada. Ortólogos de YycF/G (o WalR/K) han sido identificados en muchas bacterias Gram-positivas, incluyendo *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* (donde se la conoce como VicK/R). Estas proteínas son esenciales para la supervivencia, controlan funciones vitales como la biosíntesis de mureína y división celular, así como la expresión de factores de virulencia en un gran número de especies bacterianas. Parece ser que RevR en *C. perfringens*, y su supuesta histidín quinasa sensora, tendría la misma función que los sistemas YycF/G (WalR/K) y PhoB/R en otras bacterias. La delección del gen *revR* conduce a una morfología celular similar a la de una mutante en VicKR de *Streptococcus pyogenes*, sugiriendo la organización genética del gen *revR* que estaría involucrado en el metabolismo del fosfato. Ratones inyectados con la cepa de *C. perfringens* mutante en *revR* desarrollan los síntomas de la enfermedad más tarde que cuando son inyectados con la cepa salvaje Cepa 13, requiriendo eutanasia luego de 6 horas post-infección, comparado con las 3 a 4 horas aproximadamente a las que se lleva a cabo el sacrificio en ratones infectados con la cepa salvaje por presentar síntomas severos de la enfermedad. Las curvas Kaplan-Meier de supervivencia de ratones infectados

mostraron que la cepa mutante *revR* fue significativamente atenuada comparada con la cepa salvaje y la cepa mutante en *revR* complementada con RevR, quién mostró un comportamiento similar a la cepa salvaje (Hiscox, T. J. et al., 2011).

#### **1.4.4. Regulación catabólica de la producción de toxinas en *Clostridium*.**

De ha observado que para el caso de *C. difficile* la producción de las toxinas es afectada por la presencia de carbohidratos rápidamente metabolizables. Se determinó que la expresión de fusiones reporteras de los genes de las toxinas ToxA y ToxB (*toxA-gusA* y *toxB-gusA*, repectivamente), así como de su posible regulador TexR (*texR-gusA*) de *C. difficile*, introducidas en *C. perfringens*, fue menor en medio de cultivo conteniendo glucosa que en el mismo medio sin glucosa adicionada. Cuando se midió el nivel de mRNA para ToxA y ToxB directamente en *C. difficile* se observó el mismo efecto represor de la glucosa adicionada al medio de cultivo. La represión por glucosa de las toxinas A y B de este patógeno es dosis dependiente, siendo completamente inhibida a partir de una concentración de glucosa de 0,5 %. Se observó, además, que el efector represor de la glucosa sobre la expresión de los genes *tox* fue general, ya que cuatro cepas de *C. difficile* cuya producción de toxina varía dentro de un rango de 120 veces, mostraron reponder a la glucosa de igual manera. Debido a que la función de las toxinas es destruir células eucariotas para obtener nutrientes y energía, resultaría lógico pensar que la disponibilidad de una fuente de energía y carbono tan buena como la glucosa u otra azúcar rápidamente metabolizable, redujera la necesidad de producir estas dos toxinas, por lo que la expresión es reprimida por carbohidratos rápidamente metabolizables (Dupuy, B. y Sonenshein, A. L., 1998). Recientemente, fue demostrado que la expresión de las toxinas A (ToxA o TcdA) y B (ToxB o TcdB) es reprimida por CcpA en respuesta a la disponibilidad de azúcares del PTS (Antunes, A. et al., 2011).

### **1.5. Hipótesis de trabajo de la presente Tesis.**

La regulación de las toxinas PLC y PFO depende de un sistema complejo en el cual intervienen el sistema de dos componenetes VirR/VirS, ARN pequeños y el regulador recientemente hallado RevR. Por otro lado, la condición metabólica celular, la

disponibilidad y calidad de nutrientes afectan la expresión de factores de virulencia en muchos patógenos, llegando a ser consideradas algunas enzimas metabólicas como factores de virulencia (sección 1.2.1). En el caso de *C. difficile*, la producción de las toxinas A y B es reprimida por fuentes de carbono rápidamente metabolizables (Sección 1.4.4.). En *C. perfringens*, la formación de biofilm es reprimida por glucosa, y este fenómeno es independiente de CcpA (Varga, J. J. et al., 2008).

El pili tipo IV es fundamental para la movilidad de *C. perfringens* y muy importante para la formación de biofilm por esta bacteria. La regulación de la biosíntesis de esta estructura no es conocida en *C. perfringens*. En otros microorganismos, el T4P, la movilidad y la formación de biofilm es regulado por la calidad y cantidad de los nutrientes disponibles. En *B. subtilis* la formación de biofilm es reprimida por glucosa, en *P. aeruginosa* la movilidad y forma del biofilm dependen de la fuente de carbono (sección 1.3.3.). En *P. aeruginosa*, la forma del biofilm generado sobre la superficie colonizada también depende del T4P. El biofilm producido por una mutante en *pilA* de *P. aeruginosa* es similar al producida por la cepa salvaje en presencia de glucosa. Esto se debe a que la reducción de la movilidad bacteriana en esta bacteria hace que la misma forme biofilm irregulares y abultados (Klausen, M. et al., 2003).

*C. perfringens* provoca patologías infecciosas importantes para la salud humana. La gangrene gaseosa es una de las principales y más devastadora. Siendo muy grave en humanos, llegando a ser fatal o llevando la amputación o extripación de las zonas del cuerpo infectadas. La gangrena gaseosa puede considerarse como un proceso infeccioso multifactorial, cuyo desarrollo y progreso podría ser dividido en una serie de etapas. Estas etapas constarían de: ingreso al tejido de células o esporas de *C. perfringens* viable a través de una herida o trauma; sobrevivencia de la células en un ambiente anóxico generado por la incorrecta irrigación sanguínea que aporta oxígeno, y sobrevivencia al ataque del sistema inmune, donde la adherencia y la supervivencia dentro de macrófagos serían factores importantes; producción de toxinas que fomenten la anoxia, inhiban la extravación de células fagocíticas propias de la respuesta inmune y provean de nutrientes esenciales para el crecimiento; luego multiplicación y posible formación de biofilm para colonizar el sitio de entrada; posteriormente comenzaría el avance dentro del tejido infectado fomentado por la producción de toxinas necrotizantes y posiblemente favorecido por la capacidad de desplazarse voluntariamente de este patógeno (Figura 11).

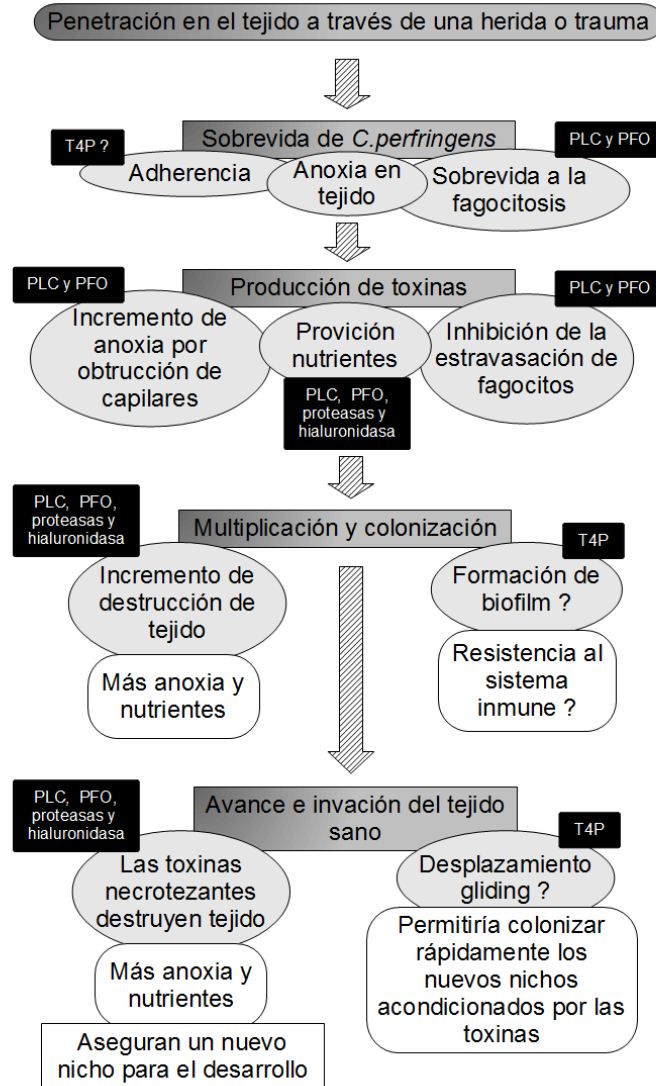


Figura 11: Esquema representando las etapas supuestas que seguiría el proceso infeccioso de la gangrena gaseosa provocada por *C. perfringens*. Luego de la entrada al tejido este patógeno sobreviviría debido a la anoxia del tejido traumatizado y mal irrigado, y a la capacidad de escapar del fagosoma de macrófagos (dependiente de las toxinas producidas por *C. perfringens* PLC y PFO), pudiendo ser importante en esta etapa la habilidad de adherirse y evitar ser removido del sitio de ingreso (el pili de tipo IV podría estar involucrado en este fenómeno como ocurre en otros patógenos). Luego de establecerse en el sitio de infección y resistir el ataque del sistema inmune comenzaría a dividirse y a producir diversas toxinas destinadas a garantizar el progreso de la gangrena gaseosa. Posterior a la colonización se iniciaría la etapa de diseminación promovida por las toxinas producidas y secretadas que proveerían nutrientes e incrementarían el área anóxica del tejido en el cual *C. perfringens* podría crecer. Tanto la colonización como el avance en el tejido dependerían de las toxinas producidas por este patógeno así como del T4P que sería importante en la formación de biofilm y le otorgaría la capacidad de desplazarse voluntariamente mediante el gliding (hecho no demostrado).

Las toxinas PLC y PFO tienen un rol fundamental en el establecimiento y progresión de esta enfermedad (Sección 1.4.2), participando en diferentes etapas dentro del proceso gangrenoso (Figura 11). El pili tipo IV mostró ser importante en la producción de biofilm y en la capacidad de desplazamiento de *C. perfringens* sobre superficies. Por otro lado, se observó que mutantes de este patógeno carentes de pili mostraban menor daño a los tejidos en modelos de ratón infectados, lo que podría estar relacionado con una menor movilidad (Sección 1.4.1.). La relevancia del T4P durante la gangrena gaseosa solo puede suponerse hasta el momento. Considerando que la capacidad de formar biofilms y de desplazarse sobre superficies son factores importantes para la patogenia de muchos microorganismos, podría pensarse que el pili tipo IV y la capacidad de llevar a cabo gliding en tejido serían importantes durante el desarrollo de la gangrena gaseosa (Figura 11).

Por lo expuesto, proponemos que es importante profundizar en el entendimiento de la regulación de los factores de patogenicidad relacionados con la gangrena gaseosa para así poder desarrollar mejores terapias para el tratamiento de esta afección y para salvar vidas. En este trabajo de tesis se estudió cómo están influenciadas y reguladas la movilidad gliding dependiente del T4P y la producción de las toxinas fundamentales para la generación de la gangrena gaseosa, PLC y PFO. Se investigaron los efectos de la glucosa y otros carbohidratos rápidamente metabolizables sobre la movilidad social tipo gliding de una colección de cepas patogénicas de *C. perfringens* aisladas de animales y humanos, en particular, de la Cepa 13, agente causal de la gangrena gaseosa. Paralelamente, se exploró la posibilidad de que los azúcares constituyan una señal nutricional importante que regule la producción de T4P y de las toxinas PLC y PFO relacionadas con la gangrena gaseosa en *C. perfringens*.

## **2. Objetivos.**

## **2. Objetivos.**

El objetivo primario de este trabajo de tesis es estudiar cómo las condiciones nutricionales afectan, modifican y regulan factores de patogenicidad de *C. perfringens*, como ser la capacidad de desplazarse sobre superficies (gliding) y de producir toxinas relacionadas con la gangrena gaseosa.

### **2.1. Objetivos secundarios destinados al cumplimiento del objetivo principal:**

- 2.1.1. Determinar si la movilidad tipo gliding es afectada por la fuente de carbono disponible en el medio de cultivo.
- 2.1.2. Establecer si la expresión del T4P, necesario para la movilidad gliding (Varga J. et al., 2006), experimenta algún tipo de regulación dependiente de la fuente de carbono presente.
- 2.1.3. Analizar si la producción de las toxinas involucradas en el desarrollo de la gangrena gaseosa, PLC y PFO, son reguladas por la calidad de fuente de carbono disponible en el medio de cultivo.
- 2.1.4. Discernir cómo se lleva a cabo la regulación de la expresión del T4P y de las toxinas PLC y PFO, a nivel de la expresión de los genes para la biosíntesis del pili y de las toxinas.

### **3. Materiales y Métodos.**

### 3. Materiales y métodos.

#### 3.1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.

En el estudio realizado se emplearon las cepas y plásmidos listados a continuación en la Tabla 2.

**Tabla 2: Cepas y plásmido usados en este estudio.**

Cepa o plásmido	Fuente del aislado o fenotipo	Referencias
<i>Clostridium perfringens</i>		
<u>Patógenos de humanos</u>		
Cepa 13	Gangrena gaseosa	(Shimizu, 2002)
KO13	Mutante derivada de Cepa 13	Este estudio
NCTC8239	Intoxicación alimentaria	(Collie, 1998)
NCTC10239	Intoxicación alimentaria	(Collie, 1998)
SM101	Intoxicación alimentaria	(Zhao, 1998)
191-10	Intoxicación alimentaria	(Sparks, 2001)
F4406	Diarrea esporádica	(Collie, 1998)
F4969	Diarrea esporádica	(Collie, 1998)
F5603	Diarrea esporádica	(Collie, 1998)
B11	Diarrea asociada al uso de antibióticos	(Collie, 1998)
B41	Diarrea asociada al uso de antibióticos	(Collie, 1998)
NB16	Diarrea asociada al uso de antibióticos	(Collie, 1998)
<u>Aislados animales</u>		
JGS1807	Diarrea en cerdos	(Waters, 2003)
JGS1818	Diarrea en cerdos	(Waters, 2003)
294442	Diarrea en perros	R. Carman
317206	Diarrea en perros	R. Carman
AHT327	Diarrea en caballos	(Waters, 2003)
AHT2911	Diarrea en caballos	(Waters, 2003)
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	$\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA</i> )U169 <i>endA1 hsdR17</i> ( $r_K^- m_K^-$ ) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1</i>	Stock laboratorio
<b>Plásmidos</b>		
pJIR750	Vector replicativo en <i>C. perfringens</i> - <i>E. coli</i> , resistencia a Cloranfenicol	(Bannam, 1993)
pJIR751	Vector replicativo en <i>C. perfringens</i> - <i>E. coli</i> , resistencia a Eritromicina	(Bannam, 1993)
pMRS127	<i>sigK-gusA</i> en pJIR751	(Raju, 2006)

Cepa o plásmido	Fuente del aislado o fenotipo	Referencias
pEJZ2	Promotor <i>pilT</i> (SM101) fusionado con <i>gusA</i> en pMRS127	Este estudio
pPilDgus-127	Promotor <i>pilD</i> (SM101) fusionado con <i>gusA</i> en pMRS127	Este estudio
ppilT-gusA	Promotor <i>pilT</i> (Cepa 13) fusionado con <i>gusA</i> en pMRS127	Este estudio
ppilD-gusA	Promotor <i>pilD</i> (Cepa 13) fusionado con <i>gusA</i> en pMRS127	Este estudio
pplc-gusA	Promotor <i>plc</i> fusionado con <i>gusA</i> en pMRS127	Este estudio
ppfoA-gusA	Promotor <i>pfoA</i> fusionado con <i>gusA</i> en pMRS127	Este estudio
pKO1	pUC18 con fragmento interno <i>ccpA</i> 760 pb	Este estudio
pKO2	pKO1 con cassette de resistencia a Eritromicina ( <i>ermBP</i> ) en HincII. Plásmido mutador de <i>ccpA</i>	Este estudio
pIH100	Copia funcional <i>ccpA</i> en KpnI/XbaI de pJIR750. Plásmido complementante	Este estudio

### 3.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Los medios de cultivo empleados para la propagación de las cepas de *C. perfringens* fueron: FTG (Britania), TGY (Czczulin, J. R. et al., 1996; Sarker, M. et al., 2000) y Cooked Meat (Oxoid) (Tabla 3). El resto de los medios empleados en este estudio son listados en la Tabla 3, donde se detalla su composición. Todos los cultivos en placa de *C. perfringens* fueron realizados bajo condiciones de anaerobiosis en jarras de anaerobiosis (Oxoid) conteniendo sobres GasPack (BD, Difco) y a 37°C. Los cultivos líquidos se realizaron en tubos de ensayo y se incubaron en estufa a 37°C. La tripteína de soja y el extracto de levadura son BD, Difco. La glucosa anhidra es Merck. La infusión cerebro corazón agar (BHIA) es Britania.

Para el caso de *E. coli* el medio de cultivo utilizado fue LB (BD, Difco) (Tabla 3) y las incubaciones se realizaron a 37°C en estufa termostatazada o en agitador orbital con control de temperatura.

Tabla 3: Medios de cultivo.

Medio de cultivo.	Composición.	Cantidad.
<b>FTG</b> Caldo tioglicolato fluído, (Fluid thioglycollate).	Extracto de levadura Digerido pancreático de caseína Dextrosa (anhidra) L-cistina Cloruro de sodio Tioglicolato de sodio Resazurina Agar	5 g/l 15 g/l 5 g/l 0,5 g/l 2,5 g/l 0,5 g/l 0,001 g/l 0,75 g/l
<b>BHIA</b> Infusión cerebro corazón agar, (Brain Heart Infusion agar).	Infusión cerebro corazón Digerido péptico de tejido animal Digerido pancreático de caseína Cloruro de sodio Glucosa Fosfato disódico Agar	8 g/l 5 g/l 16 g/l 5 g/l 2 g/l 2,5 g/l 7 o 15 g/l
<b>BHIGA</b> Infusión cerebro corazón glucosa agar, (Brain Heart Infusion glucose agar).	Infusión cerebro corazón Digerido péptico de tejido animal Digerido pancreático de caseína Cloruro de sodio Glucosa Fosfato disódico Agar	8 g/l 5 g/l 16 g/l 5 g/l 22 g/l 2,5 g/l 7 o 15 g/l
<b>TGY</b> Trypteína de soja, glucosa, extracto de levadura (Tryptein soy, glucose, yeast extract).	Trypteína de soja Glucosa Extracto de levadura	30 g/l 20 g/l 10 g/l
<b>TGYA</b> Trypteína de soja, glucosa, extracto de levadura, agar (Tryptein soy, glucose, yeast extract, agar).	Trypteína de soja Glucosa Extracto de levadura Agar	30 g/l 20 g/l 10 g/l 7 o 15 g/l
<b>TY</b> Trypteína de soja, extracto de levadura (Tryptein soy, yeast extract).	Trypteína de soja Extracto de levadura	30 g/l 10 g/l
<b>TYA</b> Trypteína de soja, extracto de levadura, agar (Tryptein soy, yeast extract, agar).	Trypteína de soja Extracto de levadura Agar	30 g/l 10 g/l 7 o 15 g/l
<b>Cooked Meat</b> Carne cocida deshidratada en granallas.	Granallas	10 g/ 10 ml agua
<b>LB</b> Luria Bertani	Extracto de levadura Cloruro de sodio Bacto Peptona	5 g/l 5 g/l 10 g/l

### **3.3. Mantenimiento de las cepas bacterianas.**

Para la preservación de las cepas de *C. perfringens* se procedió a crecerlas en 10 ml de medio TGY en tubos de ensayo con los antibióticos correspondientes, de ser necesario, durante 16 h. Posteriormente se inoculó 300 µl de medio TGY crecido en tubos de ensayo conteniendo 10 ml de medio Cook Meat con el agregado del antibiótico apropiado, si correspondiera. Luego se incubó en estufa a 37°C durante 24 a 48 h hasta que se observó buen crecimiento, se congelaron los tubos en gradillas a -20°C.

Para la preservación de *E. coli* se la creció en medio LB líquido y luego se congeló en glicerol 20% a -80°C.

### **3.4. Ensayos de movilidad en placa.**

Las cepas de *C. perfringens* fueron crecidas 16 h en FTG (Tabla 3) a 37° C, luego de lo cual 300 µl de este cultivo fue inoculado y propagado en TGY (Tabla 3) durante 5 h a la misma temperatura. Posteriormente, 1 ml de cultivo fue centrifugado y concentrado 2 veces. 5 µl de este concentrado celular fue inoculado en un punto sobre la placa de Petri con el medio de cultivo correspondiente, previamente secadas en estufa (1 h at 37° C). Los medios de cultivo utilizados para realizar los ensayos de movilidad de *C. perfringens* en placas de Petri fueron los siguientes: BHIA, BHIG, TYA y TGYA (Tabla 3) contiendo en todos los casos 0,7% de agar. Las places inoculadas fueron incubadas anaeróbicamente por 48-96 h a 37° C. Las fotografías de las places fueron tomadas una cámara digital Canon Power Shot SD550 a los tiempos indicados por cada uno de los experimentos.

#### **3.4.1. Generación de gradiente de glucosa en placa.**

Para generar un gradiente de glucosa en placa de Petri se procedió de la siguiente manera. Primeramente se preparó la placa con TYA, 20 ml aproximadamente para placa de 10 cm de diámetro, luego se que solidificara el medio de cultivo se procedió a cortar y retirar de la placa un tercio del medio sólido de uno de los extremos. El tercio retirado fue posteriormente reemplazado por 7 ml de TGYA fundido (conteniendo glucosa 2%) y se dejó solidificar. El gradiente de glucosa se estableció luego de la difusión de las

moléculas de glucosa desde el tercio conteniendo TGYA hacia la porción de la placa sin glucosa (TYA). La placa conteniendo un tercio de TGYA y dos tercios de TYA se secó en estufa durante 1 h a 37°C. Una vez que la placa estuvo seca se procedió a sembrar las cepas de *C. perfringens* como se indica arriba (Sección 3.4.).

### 3.5. Plásmidos empleados en este trabajo.

En la Figura 12 se muestra las características más relevantes de algunos de los plásmidos utilizados en este trabajo de tesis (Tabla 2). pJIR751 es un vector lanzadera con replicación en *E. coli* y en *C. perfringens*, con expresión de resistencia a Eritromicina ( $Em^R$ ) en ambos microorganismos (gen *ermBP*). El plásmido pMRS127 (Figura 13) deriva de pJIR751 (Figura 12) mediante la inserción del fragmento *sigK-gusA* (fusión entre el promotor del gen condificante para el factor sigma K, *sigK*, y el gen reportero de la  $\beta$ -glucuronidasa, *gusA*) entre los sitios *Sall* y *HindIII* (Dr. I-Hsiu Huang).

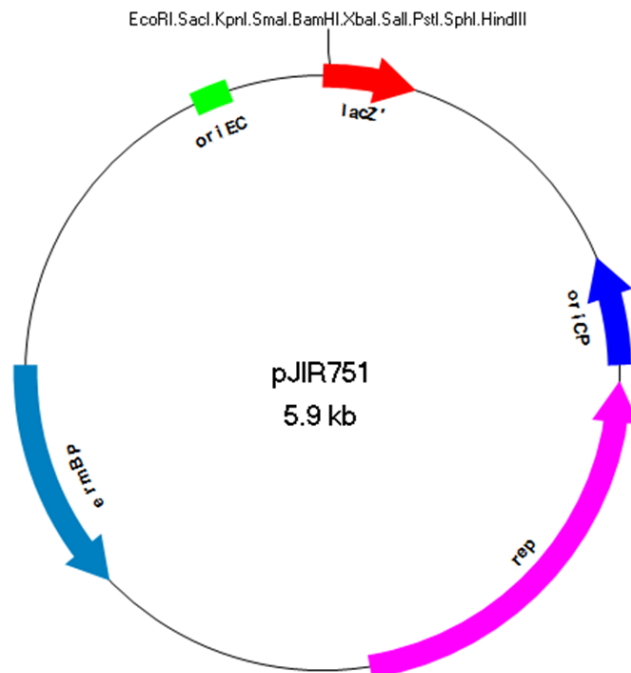


Figura 12: Plásmido pJIR751, vector de replicación en *E. coli* y en *C. perfringens*. *lacZ'*, fragmento gen de la  $\beta$ -galactosidasa; *oriCP*, origen de replicación en *C. perfringens*; *rep*, gen proteína replicación; *ermBP*, gen de resistencia a Eritromicina; *oriEC*, origen de replicación en *E. coli*.

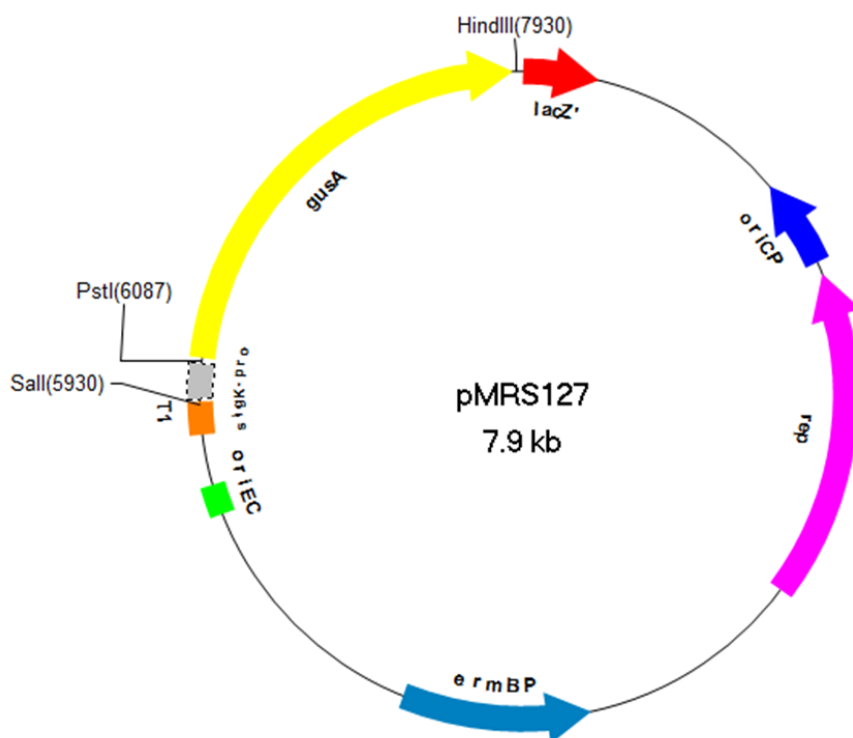


Figura 13: Plásmido reportero pMRS127, vector de replicación en *E. coli* y en *C. perfringens*. *lacZ'*, fragmento gen de la β-galactosidasa; *oriCP*, origen de replicación en *C. perfringens*; *rep*, gen proteína replicación; *ermBP*, gen de resistencia a Eritromicina; *oriEC*, origen de replicación en *E. coli*; T1, sitio de unión de ARN polimerasa; *sigK-pro*, promotor del gen *sigK*; *gusA* gen de la β-glucuronidasa.

### 3.5.1. Construcción de los plásmidos reporteros *gusA*.

Los productos de PCR amplificados conteniendo la región corriente arriba de *pilD* o *pilT* fueron primero clonados dentro del vector pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO<sup>®</sup> usando el kit de clonado TOPO<sup>®</sup>-XL (Invitrogen). Brevemente, los fragmentos de ADN llevando la región promotora de *pilD* o *pilT* de las cepas SM101 y Cepa 13, fueron amplificados por PCR usando los cebadores CPP230/ CPP231 y CPP53/ CPP55, respectivamente (Tabla 4). El sitio *SalI* fue incorporado dentro del cebador corriente arriba (forward) y el sitio *PstI* dentro del cebador corriente abajo (reverse) de cada par de cebadores. Estos productos de PCR fueron clonados en el vector pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO<sup>®</sup>. Los clones

recombinantes llevando los fragmentos de ADN esperados fueron confirmados por digestión con enzimas de restricción, análisis por PCR y luego secuenciando el ADN. Los fragmentos *SalI-PstI* llevando las regiones promotoras de *pilD* o *pilT* provenientes de clones pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO<sup>®</sup> fueron posteriormente sub-clonados en los sitios *SalI/PstI* de pMRS127 (cortesía del Dr. I-hsiu Huang) para crear las fusiones reporteras *pilD-gusA* or *pilT-gusA* derivadas cada una a partir de las cepas SM101 o Cepa 13 (Tabla 2). Estos plásmidos reporteros fueron introducidos por electroporación (ver Sección 3.9.) y seleccionados los transformantes Em<sup>r</sup> (Czeczulin et al, 1996). Esto se llevó a cabo para cada cepa: la salvaje *C. perfringens* SM101, Cepa 13 y su mutante isogénica derivada deficiente en CcpA, KO13 (Tabla 2).

Los plásmidos reporteros conteniendo las regiones promotoras de *plc* y *pfoA* fueron construidos amplificando las mismas desde la Cepa 13 de *C. perfringens* usando las cebadores Pro-*plcup*/Pro-*plcdw* para el promotor del gen *plc*, y Pro-*pfoAup*/Pro-*pfoAdw* para el promotor del gen *pfoA* (Tabla 4). Los productos de PCR fueron clonados en pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> usando el kit TOPO TA Cloning<sup>®</sup> (Invitrogen). El fragmento de restricción EcoRI-PstI de la región promotora obtenido a partir los pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> con insertos de PCR fueron sub-clonados en pMRS127 (Tabla 2). Las construcciones *pplc-gusA* y *ppfoA-gus* fueron introducidos por electroporación (Sección 3.9.) y seleccionados los transformantes Em<sup>r</sup> (Czeczulin, J. R. et al., 1996). Esto se llevó a cabo para cada cepa: la salvaje *C. perfringens* Cepa 13 y su mutante isogénica derivada deficiente en CcpA, KO13 (Tabla 2) (Philippe, V. A. et al., 2006).

### 3.5.2. Construcción del plásmido complementante de CcpA, pIH100.

Un fragmento de 1.539 pb conteniendo el marco abierto de lectura *ccpA* y su región corriente arriba de 450 pb se amplificó por PCR usando los cebadores CPP265 y CPP266 (Tabla 4). Este fragmento fue clonado en pCR-TOPO-XL (Invitrogen) para generar pCcpA-comp-XL. Posteriormente un fragmento *KpnI/XbaI* de 1,5 Kb fue subclonado en los sitios *KpnI/XbaI* del vector pJIR750 (resistencia a Cloranfenicol, Cm<sup>R</sup>, Tabla 2) para generar el plásmido complementante pIH100 (Dr. I-Hsiu Huang).

### **3.6. Ensayos de actividad $\beta$ -glucuronidasa.**

#### **3.6.1. Determinación cuantitativa.**

Para los ensayos cuantitativos de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa de cepas portadoras de fusiones transcripcionales se utilizó una modificación del protocolo propuesto por Miller (Miller, J. H., 1972), adaptado para bacterias Gram-positivas que utiliza p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucurónido (PNPG) como sustrato cromogénico (Philippe, V. A. et al., 2006).

Para ello se crece el cultivo en un medio líquido adecuado, se toman alícuotas en los tiempos deseados y luego se procesan para determinar la actividad  $\beta$ -glucuronidasa.

#### **3.6.2. Recolección de las muestras.**

Las cepas portando las fusiones *gusA* fueron crecidas en FTG a 37°C, luego 150  $\mu$ l de estos se inoculó en medio líquido de cultivo determinado según el experimento realizado. Para realizar la curva de crecimiento se tomaron 2,5 ml del cultivo a distintos tiempos y se colocaron en hielo durante 10 minutos, después se leyó la densidad óptica a  $\lambda=525\text{nm}$  ( $\text{DO}_{525\text{nm}}$ ). Luego dos alícuotas de 1 ml se distribuyeron en tubos de polipropileno de 1,5 ml (tipo Eppendorf) y se centrifugaron 5 minutos a 5000 rpm para bajar las células. Se removió el sobrenadante y los precipitados celulares se congelaron a -20°C para luego utilizarlos en los ensayos de actividad enzimática.

#### **3.6.3. Medición de la actividad $\beta$ -glucuronidasa:**

Ensayo piloto: los precipitados celulares obtenidos se resuspendieron en 1 ml de buffer Z, cuya composición es la siguiente (Griffith, K. L. y Wolf, R. E. Jr., 2002; Philippe, V. A. et al., 2006):

<u>Componente:</u>	<u>Cantidad:</u>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,06 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,04 M
KCl	0,01 M
MgSO <sub>4</sub>	0,001 M
β-mercaptoetanol	0,05 M (stock 1,12 g/ml)

Luego se tomó una alícuota de cada suspensión de 230 µl y se lleva a volumen final de 730 µl con buffer Z. Posteriormente, se agregaron 10 µl de una solución de lisozima (10 mg/ml) preparada en el momento y se incubó entre 15 y 30 minutos a 37°C. Después se añadió 10 µl de Tritón X-100 para completar la lisis celular. Una vez completados estos pasos, se adicionaron 100 µl de una solución de PNPG (6 mM) y se incubó a 37°C durante exactamente 15 minutos. Al cabo de este tiempo se agregaron 150 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,2 M) para cortar la reacción y se leyó la densidad óptica a λ=420nm (DO<sub>420</sub>) contra un blanco de reacción (buffer Z sin células procesado de la misma manera).

Ensayo definitivo: se realiza igual que el ensayo piloto pero en este caso se ajustó el volumen inicial de suspensión tomada (antes era de 230 µl) de forma tal que el valor de DO<sub>420</sub> se encuentre en el rango lineal de absorvancia, entre 0,15 y 0,6. El valor de DO<sub>420</sub> obtenido depende de la densidad celular del cultivo al momento de tomar la muestra, considerando esto la actividad β-glucuronidasa específica se calculó según la fórmula modificada de Miller: Unidades Miller, UM=(DO<sub>420nm</sub> x 66,7) / (DO<sub>525nm</sub> x ml de la alícuota) (Lancero, H. et al., 2004).

### 3.7. Antibióticos.

Los antibióticos empleados fueron preparados según describe Maniatis y colaboradores (1982).

Para el caso de *E. coli* las concentraciones de antibióticos fueron:

Cloranfenicol (Cm)	60 µg/ml
Eritromicina (Em)	150 µg/ml

Las concentraciones de antibióticos utilizadas para *C. perfringens* durante los ensayos, experimentos y selección de transformantes, salvo que se aclare lo contrario, fueron las siguientes:

Cloranfenicol (Cm)	30 µg/ml
Eritromicina (Em)	25 µg/ml

### 3.8. Determinación del número de células vegetativas y esporas.

Para determinar el número de células viables por mililitro de cultivo se tomó una alícuota de 100 µl del mismo y se la diluyó en un tubo con 0,9 ml de agua estéril, luego se tomaron 100 µl de la dilución y se diluyeron nuevamente en 0,9 ml de agua estéril, y así sucesivamente (dilución seriada). Después de realizadas las diluciones, se tomaron 100 µl de cada tubo y se plaquearon con espátula de Drigalski sobre placas de Petri conteniendo medio sólido BHIA (Tabla 3) y se incubaron toda la noche a 37°C en jarra de anaerobiosis. Al día siguiente se contaron las colonias formadas sobre la placa (el número de colonias debe ser mayor a 30 UFC/placa, y no mayor a 500 UFC/placa, para que el resultado sea estadísticamente significativo y poder contarlas, no deben superponerse, de lo contrario se puede cometer un error por defecto en el recuento). Cuando se quiso determinar el número de esporas se procedió de la misma manera que para el recuento de viables, pero antes de la etapa de plaqueado se sometió a las distintas diluciones a un tratamiento con calor, 80°C durante 15 minutos, o a un tratamiento con cloroformo al 10 % (v/v) final por 10 minutos; esto tiene por objeto inactivar irreversiblemente (matar) a las células vegetativas de manera de que sólo las esporas presentes den colonias en las placas de BHIA. Con este procedimiento se pudo obtener (antes del tratamiento con calor o CH<sub>3</sub>Cl) el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de células viables totales, vegetativas más esporas, y determinar (después del tratamiento con calor o CH<sub>3</sub>Cl) el porcentaje de esporulación definido como: (esporas/ml) / (viables totales/ml) x 100 %.

### 3.9. Electroporación de *C. perfringens*.

Para electroporar *C. perfringens* se procedió de la siguiente manera. Se inoculó 300 µl de la cepa a electroporar en 10 ml de medio FTG en tubo de ensayo desde medio Cook Meat congelado, y se incubó 16 h a 37°C en estufa. Posteriormente, se tomaron 300 µl a partir del FTG y se inocularon 10 ml de medio TGY en tubo de ensayo (conteniendo el antibiótico apropiado si corresponde) y se dejó creciendo la cepa en este medio durante 12 h a 37°C en estufa. Luego se tomaron los 10 ml de TGY con la cepa crecida y se centrifugaron a 8000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en glicerol 15 % (solución de electroporación) frío para lavarlo, luego se centrifugó a 8000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de glicerol 15 % frío (se mantuvo en hielo). Se tomaron 400 µl de esta resuspensión y se colocaron en un tubo plástico de 1,5 ml tipo ependorff. Se adicionaron 8 µl del plásmido a ser incorporado (mantenido en hielo). Esta mezcla se colocó inmediatamente (para evitar la posible degradación del ADN por ADNasas que permanezcan activas) en una cubeta de electroporación de 4 mm de paso, previamente enfriada en hielo. Se electroporó a 2500 volts. Luego de realizado el pulso se transfirió el contenido de la cubeta de electroporación inmediatamente a 8 ml de medio TGY fresco precalentado a 37°C para recuperar las células tratadas. Se dejó incubando a 37°C en estufa durante 4 a 5 h, luego de esto se centrifugó y se resuspendió el pellet en 100 ml medio TGY y se plaqueó en placa de BHIA con el antibiótico correspondiente para realizar la selección de los transformantes (Allen, S. y Blaschek, H., 1988; Phillips-Jones, M. K., 1990; Jirásková, A. et al., 2005; Philippe, V. A. et al., 2006).

### 3.10. Transformación de *E. coli*.

Para la incorporación de los plásmidos en *E. coli* DH5α (Tabla 2) se utilizó el protocolo de transformación química. Primeramente se realizó un cultivo en medio LB líquido, 2 ml, de la cepa DH5α y se creció toda la noche a 37°C en agitador orbital. Luego de transcurrido este tiempo se realizó un subcultivo en medio líquido LB realizando una dilución 1/10 colocanado 1 ml de cultivo crecido en 10 ml de LB líquido fresco. Se incubó el mismo durante 3 h aproximadamente o hasta una densidad óptica de 0,3 a 0,4 en agitador a 37°C. Posteriormente se tomaron alícuotas de 1 ml y se

centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos. Se descartaron los sobrenadantes y se resuspendió los pellets con 500 µl de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M, previamente enfriado en hielo, por cada mililitro centrifugado. Se dejó reposar en hielo las resuspensiones durante 10 minutos, para luego centrifugarlos a 4000 rpm por 10 minutos. Se descartó los sobrenadantes y los pellets se resuspendieron en 50 µl de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M frío y se mantuvo en hielo. En este punto se adicionó 8 a 10 µl de ADN plasmídico y se dejó en hielo durante 15 minutos. Transcurrido este período de tiempo se realizó un shock térmico colocando a las mezclas de DH5α con el ADN a 42°C durante 45 segundos. Pasado este tiempo se transfirieron los tubos a hielo para reducir la temperatura durante 1 a 2 minutos. Los tubos con 50 µl de las bacterias transformadas se incorporaron a 1 ml de LB líquido y se incubó durante 1 a 1,5 h a 37°C en agitador orbital, para recuperar y amplificar los transformantes. Cada mililitro de LB conteniendo los transformantes se centrifugó para concentrar, removiendo 800 µl y resuspendiendo el pellet en los 200 µl restantes. Se sembraron los concentrados (100 µl) en placas de LB agar conteniendo el antibiótico correspondiente (ver sección 3.7.).

### 3.11. Preparación de ADN genómico de *C. perfringens*.

Para la extracción del ADN cromosomal se creció la cepa de *C. perfringens* correspondiente en 10 ml de medio FTG (suplementado con el antibiótico adecuado) durante 16 h a 37°C. Luego se transfirió 300 µl a medio líquido TGY (suplementado con el antibiótico adecuado) durante 8 h a 37°C. Se obtuvieron las células por centrifugación durante 10 minutos a 7000 rpm y 4°C. El precipitado celular obtenido se resuspende en 2 ml de solución TE:

Tris-HCl (pH=8)	10 mM
EDTA (pH=8)	1 mM

Luego se agregó lisozima a una concentración final de 5 mg/ml y 8 µl de ARNasa (10 mg/ml). Se incubó en un baño termostático a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se adicionó Pronasa (proteasa) a una concentración final de 1 mg/ml y se incubó nuevamente a 37°C por 1 hora. Después se agregaron 200 µl de SDS al 10 %

y, una vez que se logró la lisis total de la células, se realizaron extracciones sucesivas con 2 ml de fenol, luego 2 ml de fenol:cloroformo 1:1 (volumen:volumen) y finalmente dos lavados con 2 ml cloroformo cada uno. Una vez culminado el último lavado se retiró la fase acuosa conteniendo el ADN cromosomal y se le adicionó 4 ml de etanol absoluto frío para precipitar el ADN. Luego se centrifugó para decantar el ADN precipitado a 8000 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se colocó el precipitado de ADN en estufa a 37°C para secarlo. Una vez que el etanol se evaporó, el ADN obtenido se solubilizó en agua destilada o solución de TE estéril y se congeló a –20°C hasta su utilización.

### **3.12. Obtención de ADN plasmídico de *E. coli*.**

El ADN plasmídico se obtuvo usando el sistema de purificación de ADN comercial “Wizard<sup>(R)</sup> Plus SV Minipreps” de Promega, y se partió de 10 ml de cultivo crecido durante toda la noche a 37°C en medio LB suplementado con antibióticos. La cepa de *E. coli* empleada para la amplificación de los plásmidos de interés fue DH5 $\alpha$  ( $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA*)U169 *endA1 hsdR17* (*r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>-</sup>*) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1*) (Tabla 2). La extracción se realizó según lo indica el protocolo del fabricante.

### **3.13. Digestión con enzimas de restricción.**

Los tiempos de incubación, la temperatura, las soluciones amortiguadoras y las demás condiciones de digestión se eligieron de acuerdo a las indicaciones descriptas en los manuales de los fabricantes (Promega o New England Biolabs). Los volúmenes de reacción variaron entre 25 a 50  $\mu$ l. La temperatura utilizada fue de 37°C (u otra especificada por el fabricante) y los tiempos de incubación fueron de 2 a 5 horas según la enzima.

### **3.14. Determinación de la actividad de las toxinas producidas por *C. perfringens*.**

Las actividades de los toxinas PLC y PFO de *C. perfringens* se determinaron a través de ensayos de actividad lipasa para PLC (Fernandez-Miyakawa, M. R. et al., 2007) y actividad hemolítica para PFO (O'Brien, D. K. y Melville, S. B., 2004).

#### **3.14.1. Medición de la actividad lipasa.**

Para determinar la actividad lipasa del sobrenadante de un cultivo de *C. perfringens* debido a la toxina PLC, se comenzó inoculando 300 µl en el medio de cultivo a ensayar a partir de cultivo crecido de FTG (16 h de incubación). A distintos tiempos se tomaron alícuotas de 600 µl, una de ellas para determinar la densidad óptica del cultivo y la otra para analizar la actividad PLC. Para realizar la medición de la actividad lipasa se tomaron los 600 µl y se centrifugaron para así obtener un sobrenadante libre de células. A 300 µl de este sobrenadante se le adicionó 300 µl de una solución de yema de huevo al 20 %, la cual fue preparada en el momento diluyendo 2 ml de yema en buffer PBS (buffer fosfato salino), pH 7,4. Luego de esto se incubó la mezcla a 37°C durante 2 h. Después de la incubación la muestra se diluyó 1/10 en PBS y se determinó la densidad óptica a 620 nm. El control se realizó usando 300 µl de el medio de cultivo a ensayar al cual no se le agregaron células, en lugar de sobrenadante del cultivo (Fernandez-Miyakawa, M. R. et al., 2007).

#### **3.14.2. Medición de la actividad hemolítica.**

Para determinar la actividad hemolítica del sobrenadante de un cultivo de *C. perfringens* debido a la toxina PFO se comenzó inoculando 300 µl en medio de cultivo a ensayar a partir de cultivo crecido de FTG (16 h). A distintos tiempos se tomaron alícuotas de 600 µl, una de ellas para determinar la densidad óptica del cultivo y la otra para analizar la actividad PFO. Para realizar la medición de la actividad hemolítica se tomaron los 600 µl y se centrifugaron para así obtener un sobrenadante libre de células. A 100 µl de este sobrenadante se le adicionó 200 µl de una solución de hemólisis.

Luego de esto se incubó la mezcla a 37°C durante 2 min y se centrifugó la mezcla a 1500 rpm durante 5 min para separar los glóbulos rojos no lisados. Se tomó el sobrenadante y se diluyó 1/10 en H<sub>2</sub>O destilada y se determinó la densidad óptica a 550 nm. La solución de hemólisis fue preparada en el momento a partir de glóbulos rojos de sangre humana, obtenidos de sangre total por centrifugación y posterior descarte del plasma sobrenadante. Los glóbulos rojos luego se lavaron con solución fisiológica NaCl 156 mM, se centrifugó y se resuspendió en buffer de hemólisis (EDTA 2 mM, ditiotreititol 20 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 64 mM, 156 mM NaCl; pH 6,8). El control se realizó usando 100 µl del medio de cultivo sin inocular con bacterias en lugar de sobrenadante del cultivo (O'Brien, D. K. y Melville, S. B., 2004).

### **3.14.3. Preparación de medios de cultivo tamponados para estudio de las toxinas PLC y PFO.**

Para regular el pH de los medios de cultivo utilizados, se empleó Tris-HCl y MOPS (morpholinepropanesulfonic acid, ácido morfolinopropanosulfónico) a la concentración necesaria para mantener el pH en torno de 7 tanto en caldo suplementado o no con azúcar durante el crecimiento de *C. perfringens* (Philippe, V. A. et al., 2006). Para lo cual se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de Tris-HCl o MOPS en las dos condiciones de cultivo (con o sin carbohidrato adicionado). Tanto el Tris-HCl como el MOPS fueron adicionados separadamente a los medios de cultivo, seguidamente se llevó a pH aproximadamente de 7 y luego se esterilizó mediante autoclavado los distintos caldos de cultivo.

## **3.15. Estudio de expresión génica mediante evaluación de ARN mensajeros específicos.**

### **3.15.1. Extracción y cuantificación de ARN de *C. perfringens*.**

La extracción del ARN total de *C. perfringens* se comenzó recolectando por centrifugación a 16.300 g a 4°C 10 ml de cada uno de los cultivos correspondientes, crecidos bajo las condiciones especificadas en cada experimento, y descartando los

sobrenadantes. Los pellets celulares fueron resuspendidos en 1 ml de solución buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM, sacarosa 0,4 M pH 7,5, lizocima 5 mg/ml) e incubados por 15 minutos a 37 °C, luego de lo cual se colectaron nuevamente las células por centrifugación, y el sobrenadante fue removido. El ARN total fue luego extraído y purificado usando el reactivo TRIzol (Invitrogen) como describe el fabricante. Para remover el ADN contaminante, las muestras de ARN fueron tratadas con 1 unidad de RQ1 ADNasa I libre de ARNasas (Promega) en presencia de 0,1 volúmenes de 10X ADNasa I buffer (Tris-HCl 40 mM pH 7,9, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM) por 1 h a 37 °C. Las muestras tratadas con ADNasa fueron luego re-extraídas con TRIzol de acuerdo a las instrucciones del fabricante, utilizando solo la mitad de los volúmenes originales de reactivo (Cheung, J. K. y Rood, J. I., 2000). El ARN total de cada muestra fue cuantificado espectrofotométricamente usando la absorbancia a 260-280 nm en un espectrofotómetro Genova (Jenway, UK). Se realizó una corrida en gel de agarosa 1 % para determinar la integridad de ARN (revelado con bromuro de etidio). Para determinar que el ADN fue totalmente digerido se hizo un control mediante PCR utilizando el ARN total obtenido tratado con ADNasa y los oligonucleótidos cebadores a ser empleados luego en el ensayo de RT-PCR (Tabla 4), no obteniéndose banda de amplificación en el ARN tratado.

### **3.15.2. Transcripción reversa y amplificación a partir de ARN total.**

La reacción de transcripción reversa fue llevada a cabo usando la retrotranscriptasa M-MLV (Promega). Se procedió de la siguiente manera: 8 µl de ARN total (solución 0.1 µg/µl) fue mezclado con 6 µl de cada cebador corriente abajo específico (40 µM) (Tabla 4), llevando a volumen final de 19 µl. La mezcla fue calentada a 70 °C por 5 minutos, enfriada en hielo y luego se le adicionó 11 µl de la solución de retrotranscripción (M-MLV, dNTPs y buffer de retrotranscripción). La reacción fue llevada a cabo en un termociclador Techgene (Techne, USA) por 2 minutos a 42 °C y 55 minutos a 37 °C. Las muestras de ADN complementarios (ADNcs) obtenidas de esta manera fueron luego almacenadas a -20 °C hasta su posterior uso. La amplificación por PCR de los ADNcs fue realizada usando los cebadores up y dw mostrados en la Tabla 4 (RT-PCR). La mezcla de reacción de PCR consistió de 10 µl de la reacción de transcripción reversa (ADNc, molde), 2 mM de cada oligonucleótido, 3 µl buffer PCR

10x (Invitrogen), 1.8 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM (Invitrogen), 3 µl de dNTPs 2.5 mM (Invitrogen), 1 unidad de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen) y agua destilada estéril para un volumen total de 30 µl. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador Techgene (Techne, USA) usando las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, apareamiento de cebadores a 52 °C durante 90 segundos y extensión a 72 °C por 2 minutos, repitiéndose estos pasos por 30 ciclos. ARNr 16S fue usado como control y las reacciones de transcripción reversa fueron realizadas en las mismas condiciones que las descritas más arriba. Los niveles de ARNr 16S fueron determinados usando los cebadores *cp16Sup* y *cp16Sdw* (Tabla 4).

### **3.15.3. Determinación de la intensidad de banda en gel por análisis de imagen.**

Los productos obtenidos a partir de la transcripción reversa amplificados por PCR fueron resueltos y visualizados mediante geles electroforéticos de agarosa 1% con Bromuro de Etidio (1:10000). Luego de la corrida, los geles fueron fotografiados mediante cámara digital montada sobre un transiluminador UV para geles (el Bromuro de Etidio fluoresce naranja), y las imágenes obtenidas se procesaron mediante el software de análisis de imágenes GelPro para determinar las intensidades de las bandas observadas y así compararlas entre ellas. Como control se tomo la intensidad de las bandas obtenidas de la amplificación del ARNr 16S en las mismas condiciones.

### **3.16. Construcción de la cepa mutante en CcpA.**

Para disrumpir el gen *ccpA* en la Cepa 13, se procedió a la amplificación de un fragmento interno de 760 pb del gen *ccpA* mediante PCR usando los cebadores CCP-F y CCP-R (Tabla 4). El fragmento así obtenido fue clonado en el sitio *Sma*I del plásmido pUC18 para crear el plasmido mutador pKO1 (Tabla 2). Luego se insertó un cassette de resistencia a Eritromicina (*ermBP*) en el sitio *Hinc*II de pKO1 para poder realizar la selección de transformantes, creando así el plásmido pKO2 (Tabla 2). pKO2 (el cual no tiene origen de replicación en *C. perfringens*) se introdujo por electroporación (Sección 3.9.) y posterior selección con Eritromicina (Sección 3.7.) en la Cepa 13. Una vez obtenido el clon mutante denominado KO13, este fue analizado para determinar la

correcta inserción mediante un simple evento de recombinación homóloga entre el vector mutador suicida pKO2 y el gen *ccpA* (Figura 14). La inactivación insercional del gen *ccpA* en KO13 se demostró primeramente por análisis del ADN de la mutante por PCR. Se amplificó un fragmento de 1,6 Kb a partir de ADN de KO13 usando los cebadores P1 y M13F (Figura 14B, calle 2, Tabla 4) y un fragmento de 2,5 kb usando P2 y M13R (Figura 14B, calle 3, Tabla 4). Sin embargo, no se obtuvo producto de PCR utilizando los cebadores P1 y M13R o P2 y M13F (Figura 14B, calles 1 y 4 respectivamente, Tabla 4). Estos resultados de PCR fueron consistentes con una integración del plásmido suicida pKO2 dentro del gen *ccpA* salvaje en KO13. Los análisis por Southern blot (Sección 3.16.1.) mostraron que un fragmento de 2,4 kb de ADN digerido con *HindIII* de la Cepa 13 hibridizó con la sonda específica *ccpA*. Por otro lado, se obtuvieron dos bandas de hibridización cuando se utilizó ADN-*HindIII* de la cepa KO13, de 2,9 Kb y 4,3 Kb (Figura 14C). Este perfil fue consistente con un resultado esperado debido a que el plásmido pKO2 insertado tiene un sitio *HindIII*, generando en el cromosoma tres sitios de corte por *HindIII* (Figura 14A), los cuales darían origen a dos bandas luego de la digestión con esta enzima de restricción.

### 3.16.1. Southern blot de la mutante KO13.

Se amplificó por PCR un fragmento interno de ADN del gen *ccpA* de 350 pb a partir de la Cepa 13, usando los cebadores KO-F y KO-R (Tabla 4) marcados con fosfatasa alcalina empleando el sistema de marcado directo y detección Gene Images AlkPhos (Amershan Bioscience) (Waters, M. et al., 2005; Philippe, V. A. et al., 2006). La sonda así obtenida fue usada para determinar la inserción del plásmido mutador (Figura 14). Las muestras de ADN de las cepas de *C. perfringens* (Cepa 13 y KO13) se prepararon como describe Czczulin, J. R. y colaboradores, 1996, y Sparks, S. G. y colaboradores, 2001. El ADN obtenido fue digerido con *HindIII* y separado por tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El ADN digerido fue transferido mediante Southern blotting. El film conteniendo el ADN-*HindIII* transferido fue hibridizado con la sonda *ccpA* marcada con AlkPhos, realizándose la detección de la sonda hibridada mediante CDPstar chemiluminescence (Amershan Bioscience) (Dr. Kaori Ohtani).

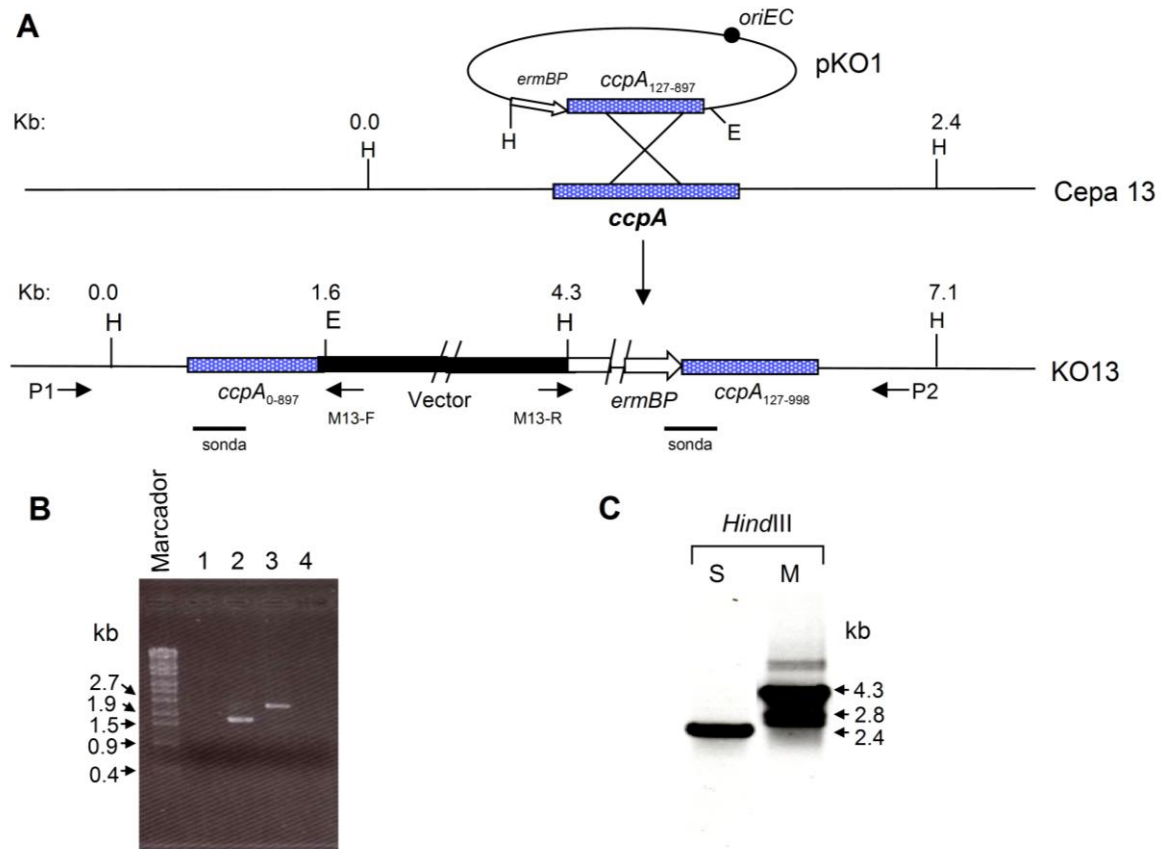


Figura 14: Construcción y caracterización molecular de la cepa mutante knock-out en *ccpA* de *C. perfringens* (KO13, Tabla 2). (A) Diagrama esquemático mostrando la estrategia utilizada para construir la cepa mutante *ccpA*. P1, P2, M-13F y M-13R indican la localización de los cebadores usados para los análisis por PCR (Tabla 4). H y E indican los sitios *HindIII* y *EcoRI*, respectivamente. Se muestra la localización de la sonda específica para la porción perteneciente al N-terminal de la proteína codificada por *ccpA*. (B) Análisis por PCR del ADN aislado de la mutante KO13 usando los cebadores P1 y M13R (calle 1), P1 y M13F (calle 2), P2 y M13R (calle 3) y P2 y M13F (calle 4). Se indica en el gel el peso molecular de las distintas bandas del marcador en kilobases (Kb). (C) Análisis por Southern blot de ADN extraído de la Cepa 13 (salvaje) y de la cepa KO13 (mutante isogénica en *ccpA* de la Cepa 13) digerido con *HindIII*. El Southern blot fue analizado con la sonda específica de *ccpA* de 350 pb marcada con AlkPhos (Sección 3.16.1.). S y M indican las calles donde se colocó ADN de la Cepa 13 (salvaje) y de la mutante KO13, respectivamente. La migración según el peso molecular de las bandas de hibridización derivadas de las dos cepas (Cepa 13 y KO13) se indican a la derecha del blot (Cortesía del Dr. Kaori Ohtani).

**Tabla 4. Cebadores oligonucleótidos usados en este estudio.**

Cebador	Secuencia del cebador <sup>a</sup>	Posición <sup>b</sup>	Gen	Uso <sup>c</sup>
<b>CPP53</b>	5' GCGTCGACGAGATATGGTCTTTTAGATGG 3'	- 333 a -312	<i>pilT</i> promotor	GUS
<b>CPP55</b>	5' GCTGCAGCAGATGCTCCTTCTTAACTG 3'	+ 28 a + 48	<i>pilT</i> promotor	GUS
<b>CPP230</b>	5' GCGTCGACCTTGAAGATTTAGATAAGCCTC 3'	+19 a +41	<i>pilD</i> promotor	GUS
<b>CPP231</b>	5' GCTGCAGCCTTCCAATTATTAATCCAAATAA 3'	-361 a -341	<i>pilD</i> promotor	GUS
<b>Pro-plcup</b>	5'ATAAGTGAATTCTAGGTTAAAACTG3'		<i>plc</i> promotor	GUS
<b>Pro-plcdw</b>	5'ACAAATCTGCAGCTTACAAATCTTTCTTTTC3'		<i>plc</i> promotor	GUS
<b>Pro-pfoup</b>	5'TAGTGAATTCAAATTCATAAATGGAAC3'		<i>pfoA</i> promotor	GUS
<b>Pro-pfodw</b>	5'GCCACTGCAGTACTTGCTATTAATTTTG3'		<i>pfoA</i> promotor	GUS
<b>CCP-F</b>	5' AACTAGGATATAGACCTAAT 3'	+ 172 a + 192	<i>ccpA</i>	PM
<b>CCP-R</b>	5' TGATCCCATATCATACTTG 3'	+ 876 a + 896	<i>ccpA</i>	PM
<b>KO-F</b>	5' CTGGAGTGTCAATGAACAAC 3'	+ 34 a + 53	<i>ccpA</i>	SONDA
<b>KO-R</b>	5' TCTCCTAGTGATGAACTCAT 3'	+366 a + 386	<i>ccpA</i>	SONDA
<b>CPP265</b>	5' ATATCCATCAAGTTCATCTATAGAG 3'	- 505 a - 481	<i>ccpA</i>	COMP
<b>CPP266</b>	5' TATGTTACCTAATGATTATGCATT 3'	+ 1012 a + 1036	<i>ccpA</i>	COMP
<b>P1</b>	5' ATGCTGATTACTCAGAAGCT 3'	- 774 a - 754	<i>ccpA</i>	PCR
<b>P2</b>	5' CTCATAAGCCCTTGATGAAC 3'	+ 1461 a + 1484	<i>ccpA</i>	PCR
<b>M13-F</b>	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'		PUC18 vector	PCR
<b>M13-R</b>	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'		PUC18 vector	PCR
<b><i>pilA1up</i></b>	5' AATGGTTATGGATCCAAATTTTTC 3'		<i>pilA1</i>	RT-PCR
<b><i>pilA1dw</i></b>	5' AAGTATATTTAAGCTTCAGACACTG 3'		<i>pilA1</i>	RT-PCR
<b><i>pilA2up</i></b>	5' CAATAGCGGTACCAATTTCTTGTC 3'		<i>pilA2</i>	RT-PCR
<b><i>pilA2dw</i></b>	5' TTGCTGAAGCTTATGTATTTGAAGG 3'		<i>pilA2</i>	RT-PCR
<b><i>pilTup</i></b>	5' GAAAAGTATGATGCTATTGG 3'		<i>pilT</i>	RT-PCR
<b><i>pilTdw</i></b>	5' AGTTGAAAATACTAAGTGCC 3'		<i>pilT</i>	RT-PCR
<b><i>plcup</i></b>	5'CAATTAGGTTCTACTTATCCAG3'		<i>plc</i>	RT-PCR
<b><i>plcdw</i></b>	5'AGTTAGCTAAAGTTACCTTTGC3'		<i>plc</i>	RT-PCR
<b><i>pfoup</i></b>	5'CATTACAACCTGCAGATAAAGC3'		<i>pfoA</i>	RT-PCR
<b><i>pfodw</i></b>	5'TCCATAAGCTACATTTGAAACC3'		<i>pfoA</i>	RT-PCR
<b><i>cp16Sup</i></b>	5'TTTCGAAAGGAAGATTAATACC 3'		ARN 16S	Control RT-PCR
<b><i>cp16Sdw</i></b>	5'CAACTTAATGGTAGTAAC3'		ARN 16S	Control RT-PCR

En la página siguiente se muestran las referencias de esta tabla.

<sup>a</sup> Los sitios de restricción que han sido adicionadas están subrayados (CTGCAG, PstI; GAATTC, EcoRI).

<sup>b</sup> La posición de los cebadores dentro de la secuencia respectiva de cada gen comenzando a numerar desde el primer codón. (Shimizu, T. et al., 2002).

<sup>c</sup> GUS, construcción del plásmido para el ensayo de la  $\beta$ -glucuronidasa (Sección 3.5.1.); PM, construcción del plásmido matador (Sección 3.16.); SONDA, construcción de ADN sonda para el análisis por Southern blot (Sección 3.16.1); COMP, construcción del plásmido complementante (Sección 3.5.2.); PCR (amplificación por reacción en cadena de la polimerasa), chequeo construcción mutante KO13 (Sección 3.16.); RT-PCR (transcripción reversa y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa), determinación niveles de ARNm (Sección 3.15.2.).

### **3.17. Análisis de secuencias genómicas para determinar la presencia de sitios CRE.**

Las regiones promotoras y codificantes de los genes seleccionadas fueron estudiadas en busca de secuencias tipo CRE utilizando el programa DNAMAN (edición libre de prueba). DNAMAN es un paquete de análisis de secuencia que permite entre otras cosas buscar secuencias consenso determinadas, dentro de las cuales los nucleótidos pueden ser variables (codificación: W puede ser A o T, Y puede ser C o T, R puede ser A o G y N pueden ser cualquiera de las cuatro bases). La búsqueda de secuencias tipo CRE se basó en los consensos reportados en la bibliografía (Tabla 5, Sección 6.1.1.). Se comenzó empleando las secuencias consenso completas: WWTGNA ARCGNWWCAWW, WTGNAANCGNWWNCA, WTGAAARCGYTTWNN, WTGNNARCGNWWCAW, RRGAAANGTTTTTCWWW, WTGNAANCGNWN NCW (Abdou, L. et al., 2008; Fujita, Y., 2009; Antunes, A. et al., 2012; Crooke, A. et al., 2013). Luego se utilizaron fragmentos de las secuencias consenso, para así poder encontrar posibles secuencias CRE que no se ajustaran exactamente a ninguno de los seis consensos usados en el análisis (Tabla 5).

## **Resultados.**

## **4. Capítulo Primero.**

**Represión catabólica de la movilidad  
tipo gliding en *Clostridium perfringens*.**

Considerando que la capacidad de desplazarse sobre superficies de *C. perfringens* podría ser un factor importante para la diseminación de este microorganismo patógeno a distintos tejidos durante la patología necrótica gangrena gaseosa, así como en otras enfermedades causadas por esta bacteria. Se decidió analizar las propiedades móviles de *C. perfringens* y como éstas son afectadas por el entorno nutricional donde se encuentra, como ha sido estudiado para otros patógenos (Shrout, J. D. et al., 2006).

#### **4.1. La glucosa reprime la movilidad tipo gliding de cepas salvajes de *C. perfringens* aisladas de infecciones humanas y animales.**

Un estudio reciente había demostrado que la movilidad gliding depende del T4P en tres cepas aisladas de patologías humanas, para las cuales se conoce la secuencia nucleotídica genómica (Varga, J. J. et al., 2006). La movilidad tipo gliding dependiente del T4P constituye un importante comportamiento bacteriano también conocido como twitching (Henrichsen, J., 1972; McBride, M., 2001; Harshey, R., 2003). Teniendo en cuenta que en el estudio referido (Varga, J. J. et al., 2006) solo se analizaron cepas de tres aislados humanos, cuando existen una gran diversidad de *C. perfringens* causantes de diversas infecciones en humanos y animales (gangrena gaseosa, intoxicaciones alimentarias, diarrea asociada al uso de antibióticos y diarrea esporádica), se consideró importante y relevante evaluar si la movilidad del tipo gliding es una propiedad intrínseca y general de los aislados salvajes de *C. perfringens*. Para ello se realizaron análisis de movilidad gliding de 17 cepas derivadas de patologías humanas y animales causadas por *C. perfringens*, incluidas aquellas cepas previamente analizadas en el trabajo publicado antes mencionado (Varga, J. J. et al., 2006; Tabla 2, Sección 3.1.). En nuestro estudio la movilidad es definida como la habilidad de las células de diseminarse a partir del punto de inoculación en al menos 4 mm después de 72 h de incubación a 37°C. Bajo estas condiciones se estudió primeramente el gliding de la Cepa 13, SM101 y NCTC8239; las dos primeras cepas analizadas previamente (Varga, J. J. et al., 2006) y NCTC8239 (intoxicaciones alimentarias, al igual que SM101) cuyas capacidades de movilidad sobre superficies no eran conocidas. Primeramente se trató de reproducir la movilidad reportada por Varga, J. J. y colaboradores. Alícuotas de cultivos de estas tres cepas se colocaron en placas de agar 0,7 % de distintos medios de cultivo comúnmente usados para la propagación de *C. perfringens* (Sección 3.2.). Cuando las bacterias

fueron colocadas en placas de BHIA o TYA estas fueron capaz de desplazarse a partir del punto de inoculación de forma similar a la reportada (Varga, J. J. et al., 2006), mostrando un patrón de desplazamiento distintivo. Interesantemente, cuando la Cepa 13, SM101 y NCTC8239 fueron inoculadas en los medios BHIGA y TGYA (los cuales contienen glucosa al 2 %) éstas fueron incapaces de moverse a partir del sitio de siembra, indicando que el gliding fue inhibido. Además, cabe destacar que el grado de movilidad fue más evidente en TYA que en BHIA el cual había sido empleado en el trabajo publicado (Varga, J. J. et al., 2006) (Figura 15 y dato no mostrado). Por lo tanto, se decidió que todos los experimentos de movilidad se realizarán usando placas de TYA o TYA suplementado con azúcar.

Cuando los ensayos de movilidad gliding fueron realizados sobre la colección completa de aislados de *C. perfringens* (Tabla 2, Sección 3.1.), todas las cepas presentaron la capacidad de moverse a partir del sitio de inoculación mediante una movilidad del tipo gliding en placas de TYA. Contrariamente el gliding fue completamente inhibido en presencia de glucosa 2 % (Figura 16 y dato no mostrado). Por lo tanto, teniendo en cuenta que la glucosa es un inhibidor conocido de otros comportamientos sociales bacterianos, tal como esporulación (Philippe, V. A. et al., 2006; Raju, D. et al., 2006), formación de biofilms (Stanley, N. R. et al., 2003) y movilidad (Shrout, J. D. et al., 2006) se concluyó que la glucosa adicionada al BHIA y al TYA, dando BHIGA y TGYA, respectivamente, fue responsable del efecto represivo de las movilidades tipo gliding de todas las cepas de *C. perfringens* analizadas.

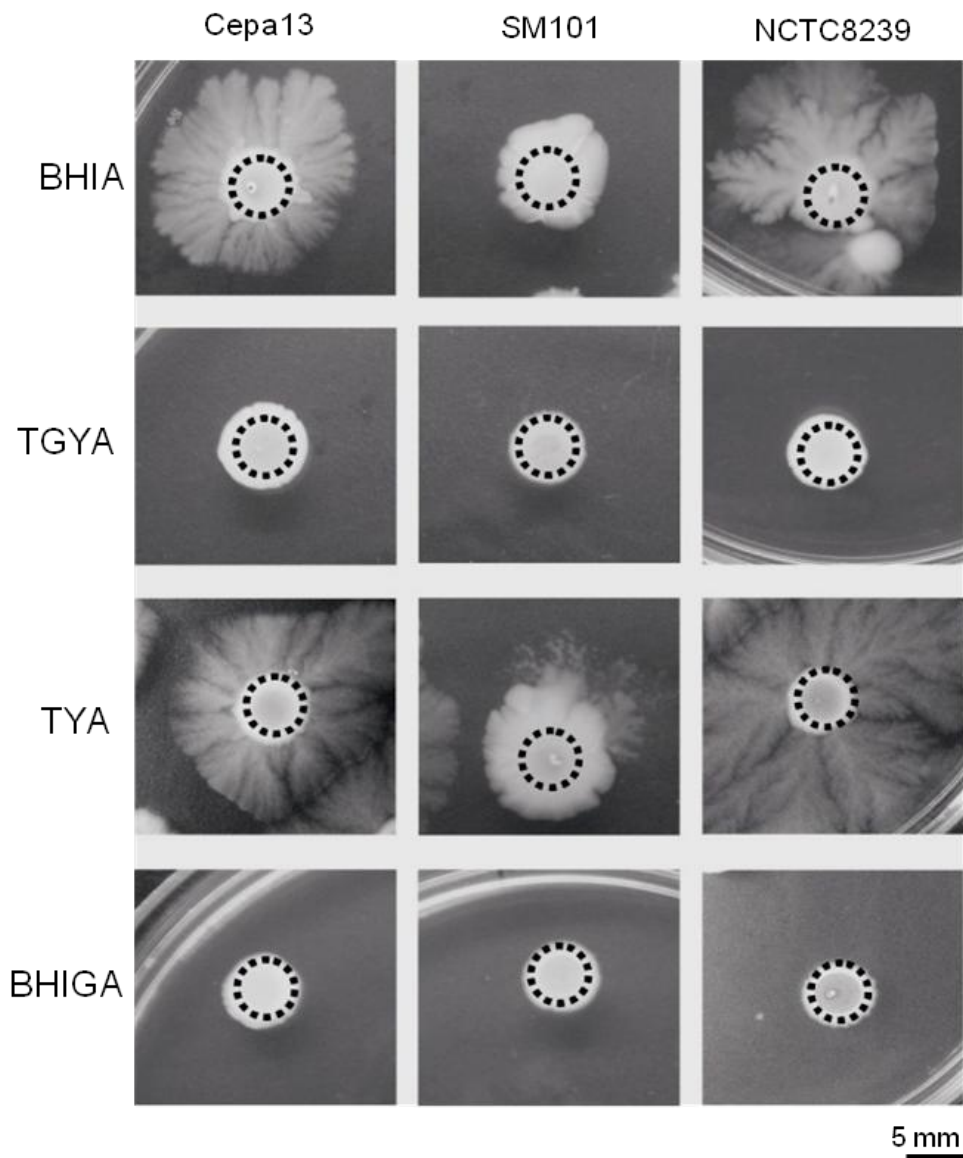


Figura 15: La glucosa reprime la movilidad gliding de *C. perfringens*. Fenotipos de movilidad gliding de tres cepas de *C. perfringens* patógenas humanas, Cepa 13, SM101 y NCTC8239. El gliding se desarrolló después de la incubación de una gota de 5  $\mu$ l de un cultivo concentrado en fase logarímicamente media de crecimiento de cada cepa sobre los medios BHIA o TYA con o sin suplementación con glucosa 2 % (Sección 3.4.). Todas las fotos fueron tomadas después de 72 h de incubación anaeróbica a 37°C. BHIA y TYA medios sin glucosa; BHIGA y TGYA, medio suplementado con glucosa 2 %. Los círculos punteados negros muestran los diámetros de los puntos de inoculación iniciales.

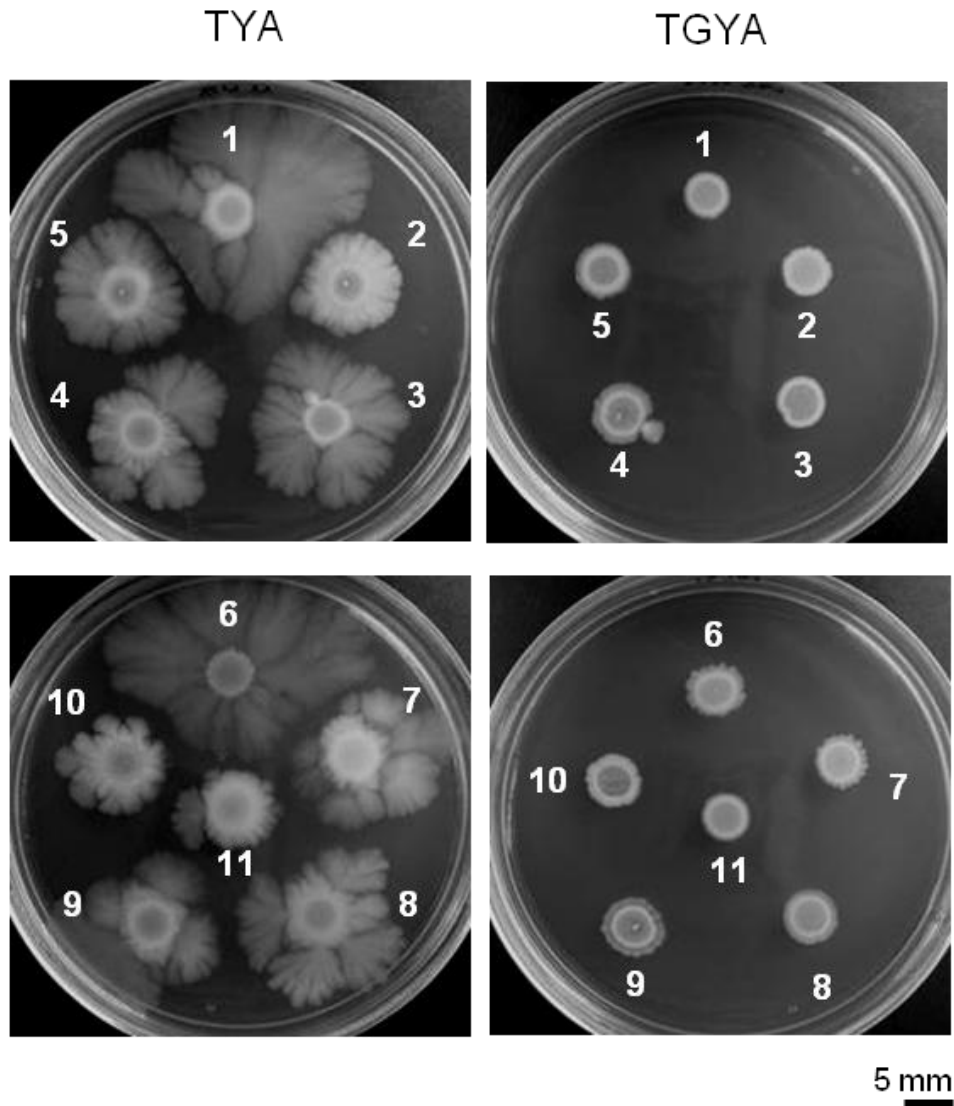


Figura 16: La glucosa reprime la movilidad gliding de distintas cepas de *C. perfringens* aisladas de diferentes patologías y hospedadores. Fenotipos de gliding de una colección de cepas de *C. perfringens* patógenas de humanos y animales: 1, NB16 (diarrea asociada al uso antibióticos); 2, JGS1818 (diarrea en cerdos); 3, 294442 (diarrea en perros); 4, NCTC10239 (intoxicación alimenticia); 5, 317206 (diarrea en perros); 6, AHT327 (diarrea en caballos); 7, B11 (diarrea asociada al uso antibióticos); 8, B41 (diarrea asociada al uso antibióticos); 9, F5603 (diarrea esporádica); 10, F4969 (diarrea esporádica); y 11, AHT2911 (diarrea en caballos). Ver Tabla 2, Sección 3.1. para más detalle.

Para determinar cómo la movilidad del tipo gliding es afectada por diferentes niveles de glucosa, un gradiente de glucosa fue generado en una placa de TYA (Sección 3.4.1.). Se inocularon 5  $\mu$ l de un cultivo concentrado de la cepa contaminante de alimentos SM101 en diferentes posiciones distribuidas a lo largo del gradiente de concentración de glucosa generado en la placa. Se utilizó esta cepa debido a que el gliding desarrollado por ésta no es muy extenso y permite hacer inoculaciones paralelas seguidas y adyacentes en placa de Petri. Como se observa en la Figura 17, la extensión del gliding mostrado por esta cepa patógena de humanos fue inversamente proporcional a la concentración de glucosa; cuando la concentración de glucosa disminuye se incrementa la movilidad gliding a partir del punto de siembra.

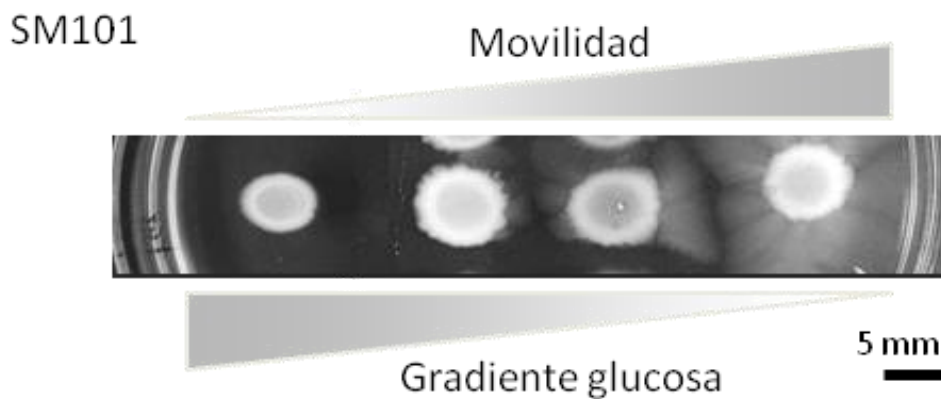


Figura 17: Efecto repressivo dosis respuesta de la glucosa (Glu) sobre la capacidad de movilidad gliding de *C. perfringens*. Efecto de gradiente de glucosa sobre la movilidad gliding de la cepa enterotoxigénica *cpe*<sup>+</sup> contaminante de alimentos SM101 (Tabla 2). Un tercio de una placa TYA se cortó y se reemplazó con TGya fundido, el cual contiene 2% de glucosa. Después de la solidificación del TGya adicionado, se generó un gradiente natural de glucosa (como se muestra de izquierda a derecha) debido a la difusión de moléculas de glucosa desde la sección de TGya (la cual contiene 2% de glucosa adicionada) hacia la porción de TYA de la placa (la cual no contiene glucosa adicionada) (Sección 3.4.1.). Toda las fotos fueron tomadas a las 72 h de incubación de las placas en condiciones anaeróbicas a 37°C.

Para establecer la concentración mínima de glucosa requerida para inhibir la movilidad gliding, cinco concentraciones de glucosa fueron independientemente ensayadas: 0,1 %, 0,25 %, 0,5 %, 1 % y 2 %. Las cepas usadas para este estudio de inhibición del gliding dosis respuesta fueron la Cepa 13 y NCTC8239. La Cepa 13 de *C. perfringens* es un aislado natural que es capaz de causar gangrena gaseosa experimental, puede ser manipulada genéticamente, la secuencia de su genoma está completa y publicada, y es ampliamente utilizada como cepa de referencia de *C. perfringens* para estudios de investigación alrededor del mundo (Shimizu, T. et al., 2002; Shimizu, T., Yaguchi, H. et al., 2002; Ohtani, K. et al., 2002). Por lo cual es importante determinar como su movilidad es afectada por distintas concentraciones de glucosa. La cepa NCTC8239 se usó en paralelo debido a la gran extensión del gliding que realiza en superficie, lo que permitiría ver modificaciones sutiles dependientes de la adición de glucosa sobre el desplazamiento en placa. Como se muestra en la Figura 18, a una concentración de glucosa del 1 %, no se observa movilidad del tipo gliding tanto en la cepa productora de la gangrena gaseosa Cepa 13, como en la cepa aislada de intoxicaciones alimentarias NCTC8239. En contraste, estas dos cepas son capaces de desplazarse escasamente mediante gliding en placas de TYA suplementadas con 0,5 % de glucosa. Cuando las placas de TYA fueron suplementadas con 0,25 % y 0,1 % no se observó inhibición del gliding (Figura 18). Por lo tanto, la represión de la movilidad social tipo gliding en *C. perfringens* causante de la patología necrótica de tejido, gangrena gaseosa, es concentración dependiente y se hace efectiva a una concentración de glucosa del 0,5 %.

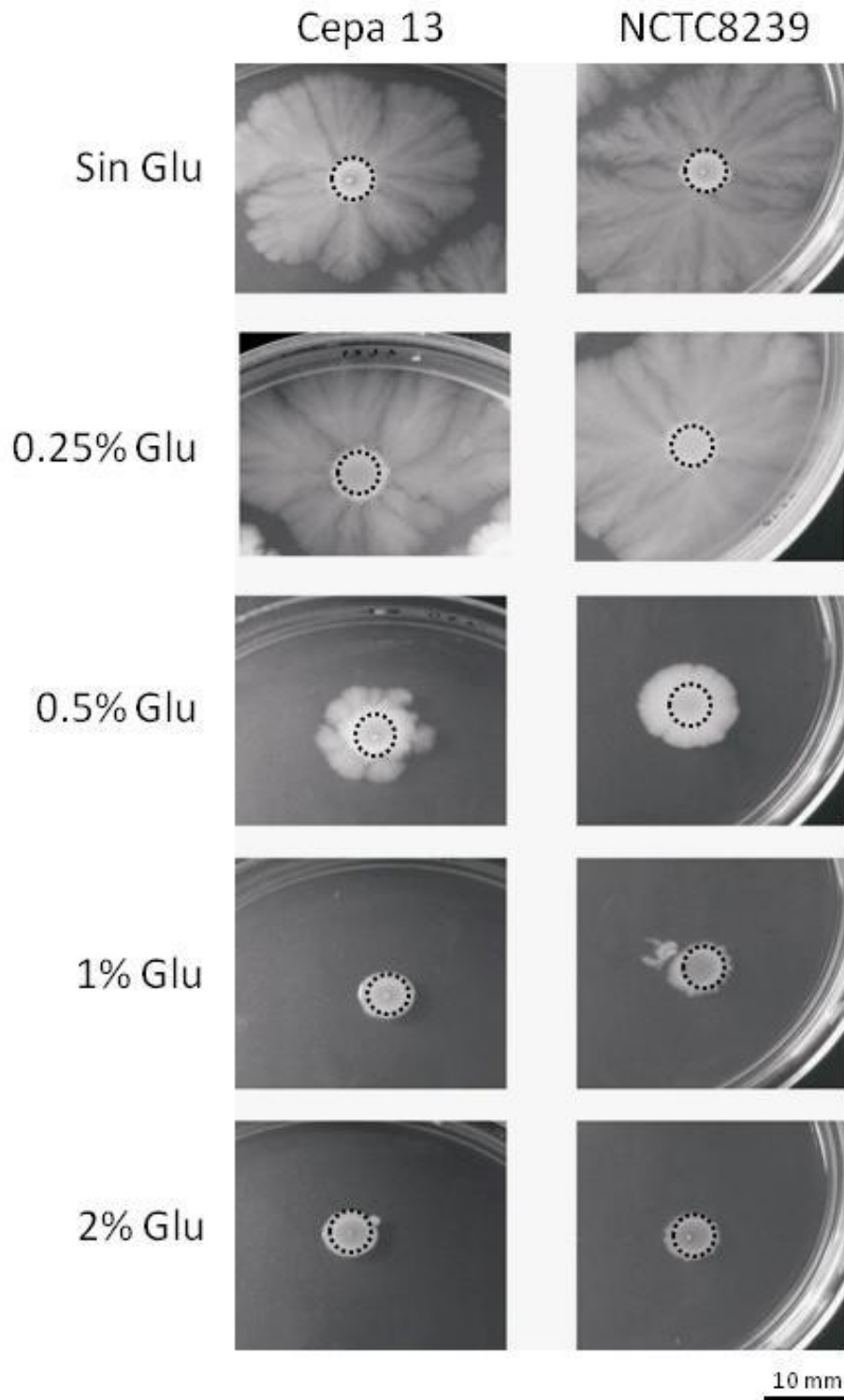


Figura 18: Evaluación de la concentración mínima de glucosa requerida para inhibir el desarrollo del gliding de *C. perfringens*. Las cepas utilizadas fueron NCTC8239 y Cepa 13, productora de intoxicaciones alimentarias y gangrena gaseosa, respectivamente. Las cepas fueron crecidas en placas de TYA y TYA suplementado con concentraciones crecientes de glucosa (Glu) como se indica. Toda las fotos fueron tomadas a las 72 h de incubación de las placas en condiciones anaeróbicas a 37°C.

#### **4.2. Represión catabólica por carbono de la movilidad gliding de *C. perfringens*.**

Para tratar de establecer si el efecto inhibitorio observado de la glucosa sobre la movilidad gliding es un fenómeno general de regulación catabólica por carbono (represión), se ensayaron otros carbohidratos rápidamente metabolizables, tal como galactosa, fructosa, lactosa y sacarosa. El gliding de la Cepa 13 (gangrena gaseosa) y de la cepa NCTC8239 (contaminante de alimentos, gliding extenso) fue inhibido cuando se crecieron en placas con 2 % de fructosa, galactosa, lactosa, o sacarosa (Figura 19). La Cepa 13 muestra un gliding insipiente con galactosa 2 % (Figura 19, izquierda). A continuación se analizó el efecto sobre la movilidad tipo gliding de carbohidratos más complejos, como ser rafinosa y almidón, los cuales son lentamente metabolizables. Estos dos carbohidratos son necesarios para una eficiente esporulación de *C. perfringens* y para la producción de la enterotoxina CPE (*C. perfringens* enterotoxin). Cuando se adiciona 2 % de rafinosa a las placas de TYA no se observa inhibición de la movilidad gliding (Figura 19). Con 2 % de almidón, la extensión del desplazamiento de ambas cepas se vio disminuía pero no inhibida, aunque a una concentración de almidón del 0,4 % (concentración comúnmente usada en medios de esporulación de *C. perfringens*; Sacks, L. E., 1983) el gliding no se vio afectado (Figura 19). Cuando este ensayo fue realizado con el resto de las cepas de *C. perfringens* provenientes de disitintos aislados, listadas en la Tabla 2, Sección 3.1., no se observó movilidad gliding para ninguna de todas las cepas testeadas cuando fueron crecidas en placas de TYA suplementadas con 2 % de fructosa, galactosa, lactosa, o sacarosa; mientras que el gliding no fue afectado cuando se suplementó con 2 % de rafinosa. Sin embargo, en placas de TYA suplementadas con 2 % de almidón, todas las cepas analizadas fueron no móviles sobre la superficie del agar, con la excepción de las cepas NCTC10239 (intoxicaciones alimentarias), la cual exhibió una movilidad gliding parcial, y JGS1807 (diarrea en cerdos) la cual fue altamente móvil aún en presencia de almidón 2 % (datos no mostrados).

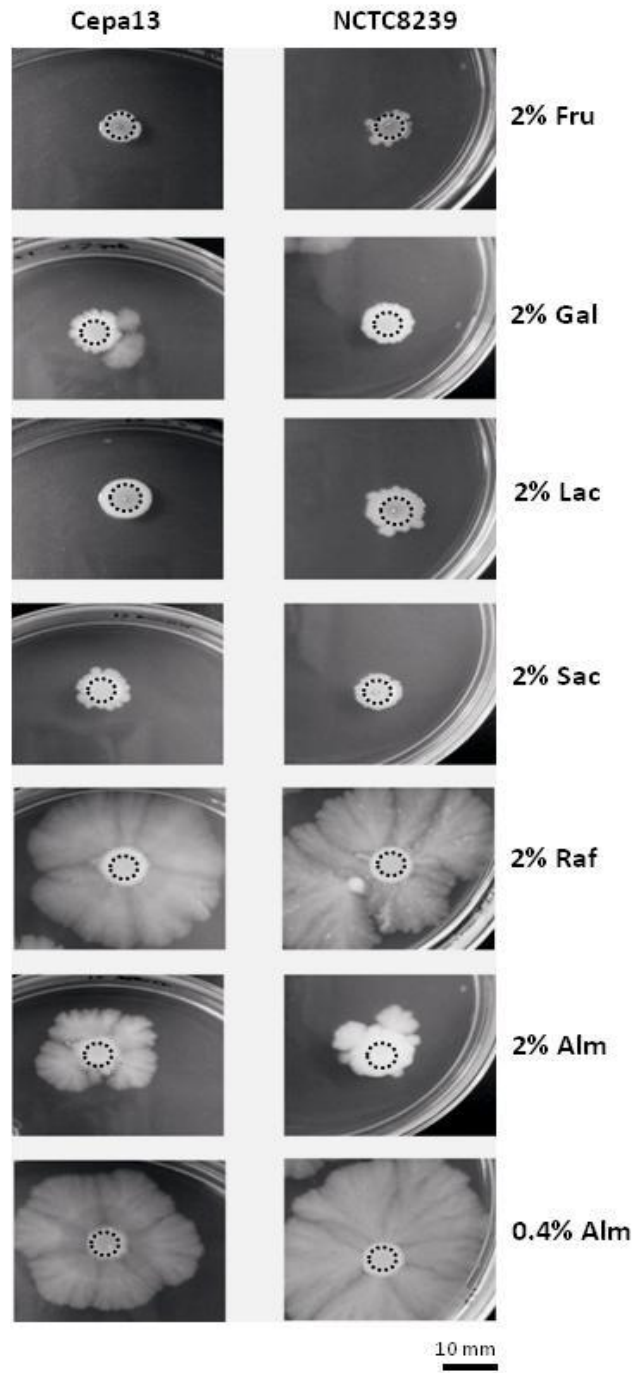


Figura 19: Efecto de carbohidratos simples y complejos sobre la movilidad gliding de *C. perfringens*. Carbohidratos rápidamente metabolizables (Fru, fructosa; Gal, galactosa; Lac, lactosa; Sac, sacarosa) y carbohidratos complejos (Raf, rafinosa; Alm, almidón), comúnmente usados para incrementar la esporulación y producción de CPE en cepas de *C. perfringens*, fueron ensayados por su habilidad de afectar la movilidad gliding. Se muestran los fenotipos de gliding de la Cepa 13 productora de gangrena gaseosa y la cepa NCTC8239 contaminante de alimentos. Las fotos fueron tomadas después de 96 h de incubación anaeróbica a 37°C sobre placas de TYA suplementadas con los distintos carbohidratos según se indica.

Los resultados generales indican que los carbohidratos complejos rafinosa y almidón no afectan la movilidad tipo gliding a concentraciones rutinariamente usadas (2 % y 0,4 %, respectivamente) para la formación de esporas y producción de CPE en *C. perfringens* (Labbe, R. G. et al., 1976; Labbe, R. G. et al., 1979; Philippe, V. A. et al., 2006). Lo más importante de estos ensayos es que demuestran que la movilidad gliding está sujeta a represión catabólica por carbono, siendo un fenómeno general y que modifica la capacidad de desplazarse sobre superficies del patógeno causante de la gangrena gaseosa, *C. perfringens* Cepa 13.

### **4.3. Cinética de la movilidad tipo gliding dependiente de T4P en *C. perfringens*.**

La capacidad de la movilidad asociada a superficie es una importante características de muchos patógenos humanos y animales (Davey, M. E. y O'Toole, G. A., 2000; Macfarlane, S. et al., 2001; McBride, M., 2001; Harshey, R., 2003; Bakaletz, L. O. et al., 2005). En los casos de virulencia y capacidad de invadir de los aislados de *C. perfringens*, un eficiente mecanismo de traslación sobre superficies sólidas y semisólidas puede ser favorable para el escape de las defensas del hospedador y para la rápida diseminación de la infección. Para el caso de la Cepa 13, agente causal de la gangrena gaseosa, la capacidad de desplazarse rápidamente por los tejidos favorecería una rápida dispersión y colonización (una gangrena gaseosa agresiva puede avanzar a una velocidad de hasta  $1 \text{ cm h}^{-1}$ ). Se caracterizó la cinética y eficiencia de la movilidad gliding de la Cepa 13 sobre placas semisólidas de TYA en ausencia y presencia de glucosa adicionada. Como se observa en la Figura 20, hay dos fases claras de crecimiento y expansión de la colonia. Inicialmente, la expansión de la colonia en crecimiento sobre la superficie de TYA, a partir del punto de inóculo, fue a una velocidad comparable a la esperada para una colonia bacteriana en crecimiento, que no se mueve por swimming o swarming. Durante las primeras 20 h de incubación, el tamaño de la colonia en crecimiento se incrementó por un factor de 1,75 como consecuencia de la división celular, alcanzando una velocidad de expansión de  $125 \mu\text{m h}^{-1}$  (Figura 20 y dato no mostrado). Después de esta etapa inicial de expansión de la colonia, un notorio cambio ocurre: se inicia el gliding social por un grupo de células localizadas en el borde de la colonia (ver las células emergentes en la Figura 20 al tiempo de desarrollo de 20 h,

flechas blancas). Después de la aparición de este primer signo de movilidad superficial activa tipo gliding (la aparición de células emergentes a partir de los sitios puntuales en el borde de la colonia), un gliding robusto y uniforme es fuertemente inducido, llegando a una velocidad máxima de 600 a 700  $\mu\text{m h}^{-1}$  (Figura 20), un valor de velocidad de gliding comparable con los valores promedio (200  $\mu\text{m h}^{-1}$  a 1.000  $\mu\text{m h}^{-1}$ ) para velocidades de gliding y twitching social previamente reportados para otros microorganismos (Davey, M. E. y O'Toole G. A., 2000; McBride, M., 2001; Harshey, R., 2003).

Interesantemente, en presencia de glucosa 2 %, no se aprecia movilidad del tipo gliding aún luego de largos períodos de incubación (Figura 20 y dato no mostrado). La morfología de la colonia de *C. perfringens* desarrollada en placas de TYA suplementadas con glucosa (fenotipo deficiente en movilidad gliding) fue muy similar a la observada para las colonias desarrolladas en placa de TYA no suplementadas con glucosa, justo antes de mostrar una movilidad activa. En la Figura 20 se observa, además, que la morfología de las colonias cuyo desplazamiento por gliding está inhibido por la glucosa es similar a la de la parte central de las colonias maduras que se han movilizadas por gliding durante más de 40 h en placa de TYA sin glucosa (Figura 20 y dato no mostrado). Esta observación indica que la glucosa así como otros azúcares rápidamente metabolizables (dato no mostrado) no afectan la fase inicial de diseminación vegetativa de la colonia. Sin embargo, los experimentos anteriores mostraron que los carbohidratos rápidamente metabolizables bloquean completamente (represión catabólica por carbono) la puesta en marcha de la segunda fase de traslación sobre la superficie, la cual conlleva al desarrollo de una activa movilidad gliding.

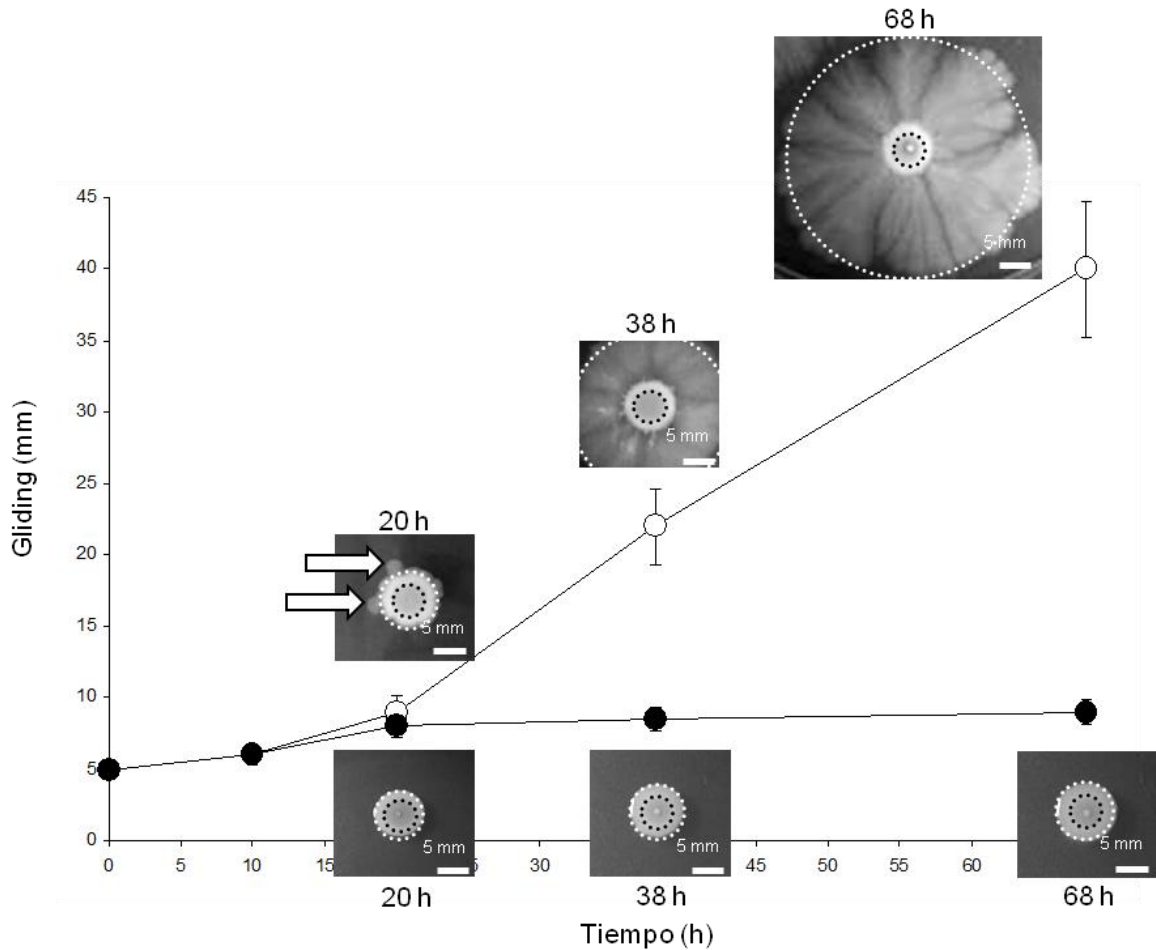


Figura 20: Cinética del desarrollo del gliding de la Cepa 13 de *C. perfringens* productora de gangrena gaseosa en ausencia y presencia de glucosa. 5  $\mu$ l de un cultivo concentrado de fase logarítmica de la Cepa 13 crecida en medio TY fue inoculado en el centro de una placa de Petri de 100 mm de diámetro, conteniendo medio TYA con o sin suplementación con glucosa 2 %. Las placas de Petri inoculadas fueron incubadas anaeróbicamente a 37°C, y el desarrollo del gliding fue registrado a diferentes tiempos, midiendo la distancia avanzada (en mm) desde el punto inicial de inoculación (círculo punteado negro) hasta al extremo de la colonia en expansión (círculo punteado blanco). Los símbolos blancos y negros representan los experimentos realizados en presencia y ausencia de 2 % de glucosa adicionada, respectivamente. Las flechas blancas indican el comienzo del desarrollo del gliding. El comienzo de la movilidad gliding solo se observó en las placas de TYA sin suplementación con glucosa, mientras que en presencia de glucosa, el gliding no se inició nunca. Las fotografías son representativas de cinco experimentos independientes, y los valores graficados son el promedio de esos experimentos.

#### 4.4. Efecto de la glucosa sobre la expresión de los genes *pilT* y *pilD* en cepa de *C. perfringens* productora de la gangrena gaseosa.

El reciente estudio de Varga y colaboradores demostró que la movilidad gliding de la Cepa 13 de *C. perfringens* depende de los productos de los genes *pilT* y *pilC*, los cuales son requeridos para el ensamblado y funcionalidad del T4P, como ya se mencionó en la introducción (Varga, J. J. et al., 2006). La Cepa 13 mutante en *pilT* no es capaz de desplazarse a partir del punto de inoculación a diferencia de la Cepa 13 salvaje, no observándose pili en la superficie de esta mutante mediante microscopía de emisión de campo electrónica de barrido (Varga, J. J. et al., 2006). Ya que la glucosa así como otros carbohidratos rápidamente metabolizables suprimen completamente la movilidad tipo gliding en todas las cepas de *C. perfringens* (Tabla 2, Sección 3.1.) analizadas en este trabajo (Figuras 15 a 19 y datos no mostrados), se consideró un escenario donde los genes *pil* para la biosíntesis del T4P podrían ser afectados por represión catabólica por carbono. Por lo tanto, para testear esta hipótesis, se midió la expresión de dos genes necesarios para el ensamblado y funcionalidad del T4P, *pilD* y *pilT*, en medio líquido TY con y sin el agregado de glucosa. La elección de estos dos genes para estudiar se basó en el hecho de que *pilD* se encuentra situado en el primer lugar de un conjunto de genes destinados a la síntesis del T4P que posiblemente conformarían un operón (Figura 9). Por otro lado, la elección de *pilT* radica en que este gen se sabe necesario para el gliding, como lo demostrara Varga y colaboradores. Las fusiones reporteras  $\beta$ -glucuronidasa *pilD-gusA* y *pilT-gusA* fueron introducidas separadamente en las Cepa 13 (gangrena gaseosa) y SM101 mediante electroporación con los plásmidos *ppilD-gusA*, *ppilT-gusA* y *pPilDgus-127*, *pEJZ2* respectivamente (Tabla 2, Sección 3.1.); luego de lo cual se ensayo la actividad  $\beta$ -glucuronidasa de las fusiones mencionadas, como se detalla en las Secciones 3.5. y 3.6. En este estudio se utilizó la cepa SM101 (intoxicación alimentaria) como contrapartida, debido a que produce un gliding con menor extensión que la Cepa 13 en placa de TYA; siendo además considerada en el estudio de Varga, J. J. y colaboradores del 2006. No se observó diferencias significativas en el crecimiento de las cepas llevando las fusiones *pil-gusA* en medios con y sin glucosa adicionada (dato no mostrado), aunque el rendimiento celular fue un poco superior en medio TY suplementado con glucosa que en el no suplementado (dato no mostrado). Interesantemente, en presencia de 1 % de

glucosa, hubo una dramática reducción de la actividad de los promotores de los genes *pilD* y *pilT* en ambas cepas de *C. perfringens* analizadas (Figura 21).

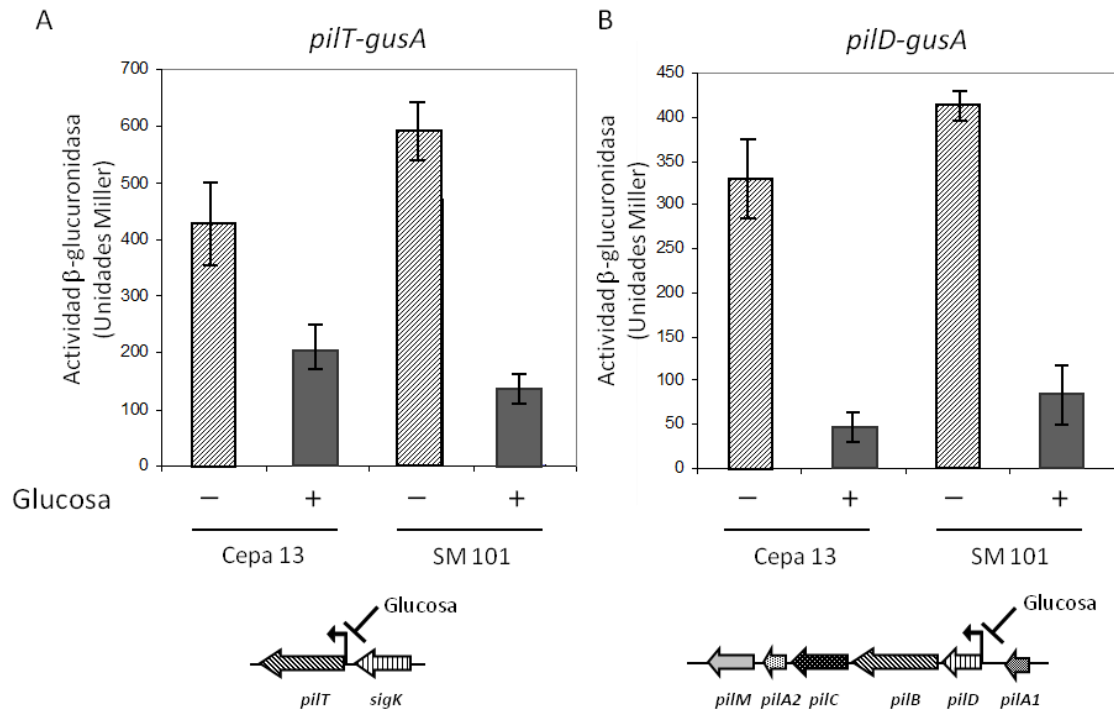


Figura 21: La glucosa reprime la transcripción de *pilT* y *pilD* en cepas de *C. perfringens* productoras de la gangrena gaseosa y contaminación de alimentos. Transcripción de los promotores de *pilT* (A) y *pilD* (B) medidos mediante el ensayo  $\beta$ -glucuronidasa de la Cepa 13 y SM101 llevando las fusiones reporteras transcripcionales *pilT-gusA* (A) y *pilD-gusA* (B). Las cepas fueron crecidas en medio TY líquido con y sin la adición de glucosa 1% como se indica en la figura (+ o - respectivamente). La actividad  $\beta$ -glucuronidasa acumulada fue medida luego de 30 h de crecimiento (Philippe, V. A. et al., 2006). Se muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes. En la parte inferior de la figura, se muestra el arreglo génico de las regiones cromosomales de *pilT* (A) y *pilD* (B) en la Cepa 13 y SM101 de *C. perfringens*, indicándose el efecto represivo de la glucosa sobre la transcripción génica.

Los niveles de expresión de *pilT* se redujeron en un 60 % en la cepa causante de la gangrena gaseosa Cepa 13, y en un 75 % en la cepa SM101 productora de intoxicaciones alimentarias cuando estas cepas fueron crecidas en presencia de 1 % de glucosa (Figura 21). Similarmente, una significativa reducción de la expresión de *pilD-gusA* se observó en los cultivos de la Cepa 13 (~80 % de reducción) y SM101 (~75 % de reducción) cuando estas cepas fueron incubadas en medio con glucosa 1 % en

comparación en comparación con los niveles observados en ausencia de glucosa (Figura 21). Estos resultados demostraron que la glucosa regula negativamente la expresión de los genes *pilD* y *pilT* en *C. perfringens* causante de la gangrena gaseosa.

Se decidió extender el estudio a otros genes implicados en la biosíntesis del T4P, tanto en la Cepa 13 como en la SM101. Esto se realizó a través de la determinación semicuantitativa de los niveles de mensajeros por RT-PCR de los genes *pilA1*, *pilA2* y *pilT* (Figura 22). Las células fueron crecidas en medio TY y TGY hasta fase estacionaria de crecimiento (16h de incubación a 37°C). Como control de las reacciones de transcripción reversa y PCR se usó el ARNr 16S. Como puede observarse en la Figura 22, la cantidad de transcripto de los genes *pilA1*, *pilA2* y *pilT* es mayor en medio sin glucosa, con la excepción de *pilA1* para el caso de la Cepa 13, cuya cantidad de mensajero parece no ser disminuída por la presencia de glucosa en el medio de cultivo.

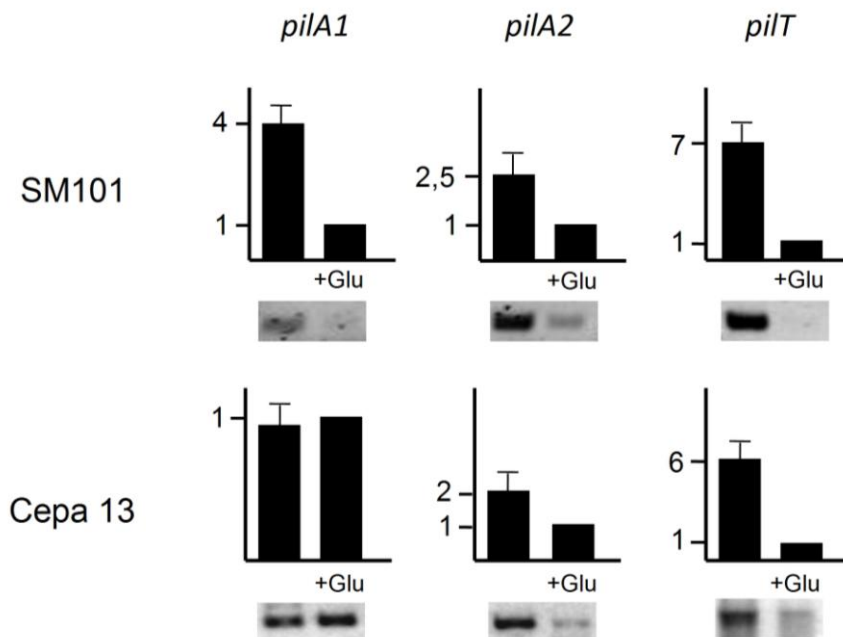


Figura 22: Medición por RT-PCR de la expresión de genes para la biosíntesis del pili Tipo IV en *C. perfringens*. RT-PCR realizada sobre ARN total, extraído de células de cultivos en medios TY con y sin glucosa 2 % (glu) adicionada, amplificado con cebadores específicos para los transcriptos de los genes *pilA1*, *pilA2* y *pilT* (Masayama, A. et al., 2006). El ARN total fue extraído en fase estacionaria de crecimiento (16 h). Los valores del eje Y corresponde a intensidades relativas obtenidas con el programa GelPro (unidades arbitrarias) normalizados a la intensidad de banda del control realizado con ARNr 16S. Se define como 1 (una) unidad a la intensidad de la banda de amplificación obtenida para cada ARNm en medio con glucosa adicionada.

Todo esto sugiere que el efecto inhibitorio de la regulación catabólica por carbono sobre la movilidad tipo gliding tiene lugar, al menos en parte, a nivel de la expresión de genes implicados en la biosíntesis y funcionalidad del T4P.

#### **4.5. Rol dual de la proteína reguladora CcpA en la movilidad gliding de *C. perfringens*.**

Como se detalló en la introducción, la proteína de control por catabolito CcpA (catabolite control protein) juega un papel crucial en bacterias Gram-positivas de bajo contenido de G+C, interconectando el metabolismo del carbono con varias respuestas celulares, tales como virulencia, formación de esporas y desarrollo de biofilms (Stanley, N. R et al., 2003; Warner, J. B. y Lolkema, I., 2003; ShROUT, J. D. et al., 2006). En *C. perfringens*, CcpA es necesario para la eficiente esporulación y expresión de la enterotoxina (CPE), la cual es responsable por los síntomas observados en las intoxicaciones alimentarias y en las diarreas tanto en humanos como animales (Varga, J. J. et al., 2004). Se ha determinado recientemente que CcpA es también necesaria para una eficiente formación de biofilms en este patógeno (Varga, J. J. et al., 2008). Debido al efecto represor ejercido por la glucosa sobre los niveles de expresión de los genes *pil* (Figuras 21 y 22), los cuales son esenciales para que *C. perfringens* se desplace sobre sustratos sólidos (Varga, J. J. et al., 2006), se consideró analizar si CcpA tiene un rol en la represión catabólica por carbono de la movilidad de *C. perfringens* causante de la infección necrotizante gangrena gaseosa. Para explorar esta posibilidad, se utilizó una cepa mutante en *ccpA* (KO13, Tabla 2, Sección 3.1.) para ensayar los fenotipos de movilidad gliding y la actividad de los genes para el T4P (*pilD* y *pilT*). Las cepas isogénicas de *C. perfringens ccpA*<sup>+</sup> y *ccpA* fueron crecidas en presencia y ausencia de glucosa. Cuando se analizó la capacidad de desplazarse mediante gliding en presencia de 1 y 2 % de glucosa, la cepa CcpA<sup>+</sup> Cepa 13 fue incapaz de moverse a las dos concentraciones de azúcar, como ya se había observado anteriormente, permaneciendo en el lugar de inoculación. En contraste, la mutante isogénica derivada KO13, deficiente en la producción de CcpA, incubada en las mismas placas fue capaz de retener más del 50 % de su habilidad de moverse en 1 % de glucosa y mostró un pequeño pero perceptible nivel de movilidad gliding en placas TYA suplementadas con 2 % de glucosa (Figura 23A). Bajo similares condiciones, no se observó movilidad tipo gliding

en presencia de 1 % de glucosa cuando la mutante CcpA complementada con el plásmido pIH100, el cual posee una copia funcional del gen *ccpA* (Tabla 2, Sección 3.1. y dato no mostrado). Lo observado sugiere que se necesita de CcpA funcional para la represión catabólica por carbono del gliding en *C. perfringens*.

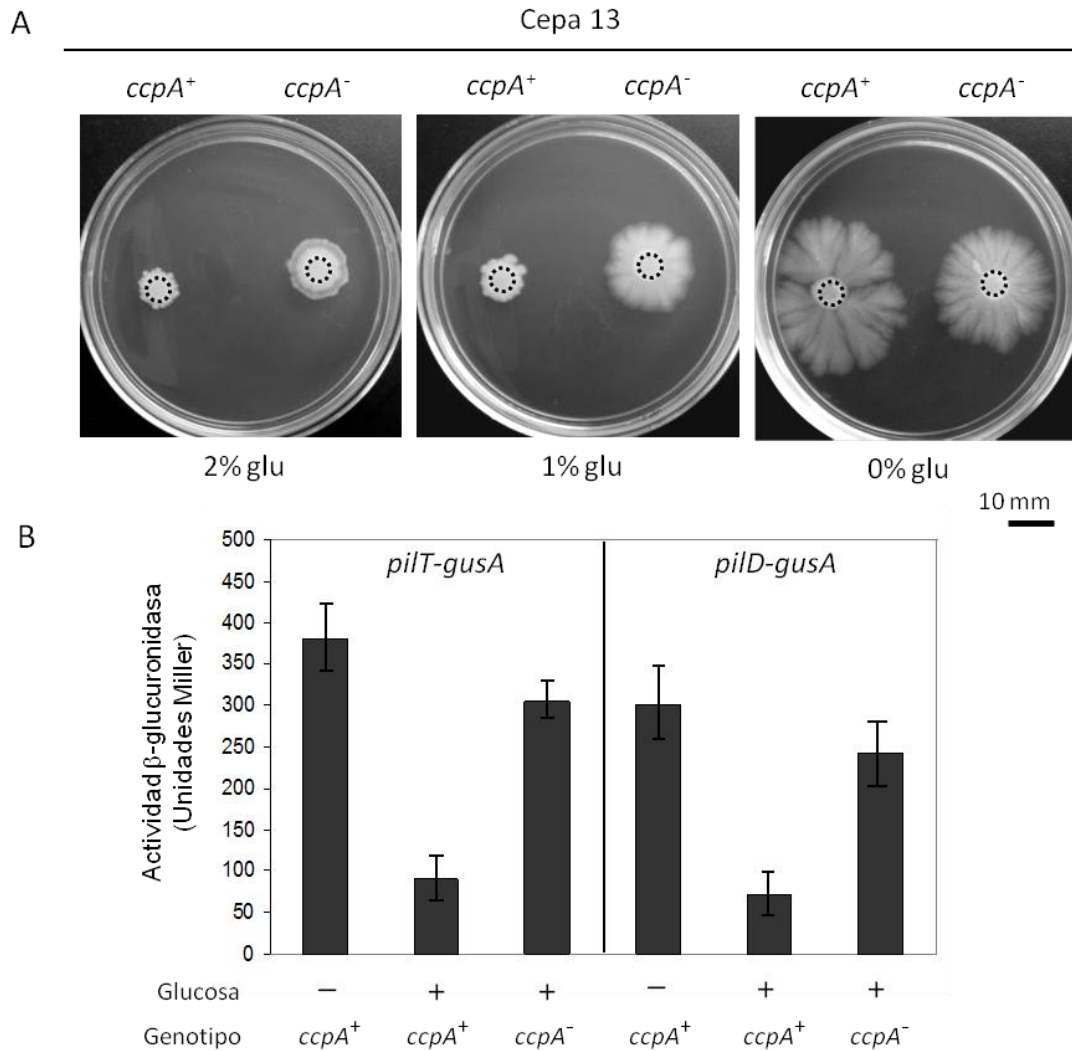


Figura 23: CcpA media la represión por catabolito de carbono del gliding en *C. perfringens*. A) Fenotipos de movilidad gliding de la Cepa 13 (*ccpA*<sup>+</sup>) y su mutante isogénica derivada deficiente en CcpA (KO13). El ensayo de movilidad se realizó como se detalló anteriormente. Las fotografías fueron tomadas luego de 40 h de incubación anaeróbica sobre placas de TYA suplementadas o no con glucosa según se detalló en la Sección 3.4. B) Expresión de las fusiones reporteras *pilT-gusA* y *pilD-gusA* en cultivos de las cepas de *C. perfringens* *ccpA*<sup>+</sup> y su mutante *ccpA* isogénica, KO13. Los cultivos se crecieron por 30 h en TY en ausencia (-) o presencia (+) de 1 % de glucosa. La actividad  $\beta$ -glucuronidasa acumulada fue medida luego de 30 h de crecimiento (Philippe, V. A. et al., 2006). Se muestra un set representativo de los resultados obtenidos de cinco experimentos independientes.

Para confirmar el rol de CcpA en la represión catabólica de la movilidad gliding de *C. perfringens*, se compararon los niveles de expresión de *pilT* y *pilD* en cultivos crecidos en TY con y sin glucosa 1 % de cepas de *C. perfringens* isogénicas que expresan o no CcpA. Como se muestra en la Figura 23B, los cultivos deficientes en CcpA, pero no los cultivos que expresan CcpA, mostraron una activa expresión de los genes *pilT* y *pilD* en presencia de glucosa en un nivel similar al observado para los cultivos de la cepa salvaje crecidos en ausencia de glucosa. Este fenómeno fue corroborado cuando se realizó la determinación semicuantitativa a través de RT-PCR de los mensajeros para las genes *pilA1*, *pilA2* y *pilT*. Como se observa en la Figura 24, en la cepa mutante KO13 la glucosa no ejerce su acción represora sobre la expresión de genes involucrados en la biosíntesis del T4P. Colectivamente, estos resultados demuestran que CcpA está activamente involucrada en la represión catabólica por carbono de la movilidad gliding de *C. perfringens* y que induce una regulación negativa de los genes para la biosíntesis del T4P.

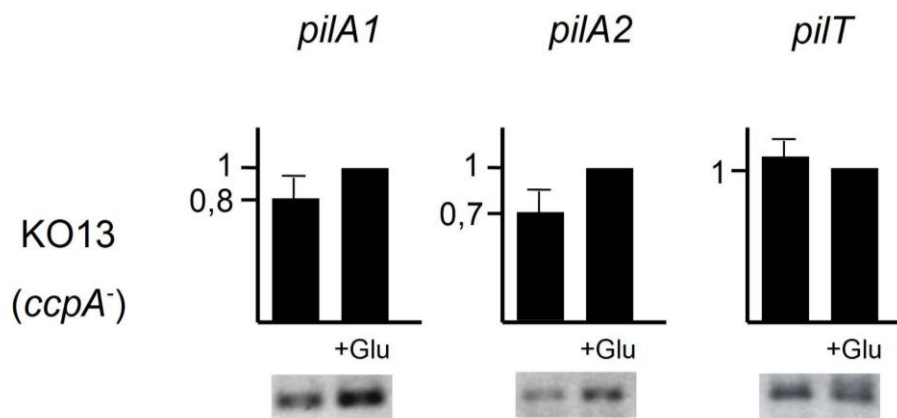


Figura 24: RT-PCR para los niveles de transcritos de *pilA1*, *pilA2* y *pilT* en la cepa mutante *ccpA*. El ARN total fue extraído en fase estacionaria de crecimiento (16 h) en medios de cultivo TY con y sin glucosa 2 % (glu) adicionada (Masayama, A. et al., 2006). Los valores del eje Y corresponde a intensidades obtenidas con el programa GelPro (unidades arbitrarias) normalizados a la intensidad de banda del control realizado con ARNr 16S. Se define como 1 (una) unidad a la intensidad de la banda de amplificación obtenida para cada ARNm en medio con glucosa adicionada.

Una observación intrigante fue que la habilidad moverse por gliding de la cepa de *C. perfringens* KO13, deficiente en CcpA, crecida en ausencia de suplementación con azúcar presentó un retraso comparada con la Cepa 13 (*ccpA*<sup>+</sup>) (observar panel derecho, sin agregado de glucosa, en la Figura 23A). Esta observación puso de manifiesto un requerimiento positivo independiente de la fuente de carbono adicional, e inesperado, de CcpA para que se lleve a cabo una movilidad gliding completa en *C. perfringens*. Es importante indicar que este pequeño, pero reproducible, efecto positivo de CcpA, independiente del catabolito, sobre comportamientos sociales ha sido anteriormente documentado durante la formación de biofilms en *B. subtilis* (Stanley, N. R. et al., 2003), y en el desarrollo de la espora y formación de biofilm en *C. perfringens* (Varga, J. J. et al., 2004; Varga, J. J. et al., 2008). En estas bacterias, la ausencia de la actividad de CcpA se vio reflejada en un bajo nivel de producción de biofilm y formación de esporas en comparación con las habilidades de las cepas salvajes (CcpA<sup>+</sup>).

Se confirmó esta hipótesis (rol positivo de CcpA en la movilidad) cuantificando el gliding desarrollado por la cepa *ccpA*<sup>+</sup> (Cepa 13) y su mutante isogénica en *ccpA* (KO13) sobre placas de TYA en ausencia de agregado de glucosa. Previamente, se determinó que la introducción de la mutación en *ccpA* en la Cepa 13 no afectó su habilidad para crecer y ni el rendimiento celular final alcanzado en medio líquido TY (Figura 25A). A diferencia de lo observado durante el crecimiento, donde los cultivos de la cepa salvaje y la mutante deficiente en CcpA fueron iguales; se observó claras diferencias en la velocidad y en la cinética de la movilidad gliding entre las cepas *ccpA*<sup>+</sup> y *ccpA*. La movilidad gliding de la cepa mutante en *ccpA* mostró una velocidad menor comparada con la velocidad de gliding de la cepa salvaje (Cepa 13), siendo de 250  $\mu\text{m h}^{-1}$  y 670  $\mu\text{m h}^{-1}$  para la cepa deficiente en CcpA y la CcpA<sup>+</sup>, respectivamente (Figura 25B). Esta diferencia en velocidad da como resultado que el gliding de la cepa *ccpA* mutante alcance una menor extensión que el de la cepa salvaje (Figura 23A, derecha y Figura 25B). Esta observación sugiere fuertemente un nuevo y superpuesto rol positivo de CcpA sobre la eficacia de la movilidad tipo gliding de *C. perfringens* en ausencia de suplementación con azúcar. Para confirmar esta conclusión, se midieron los niveles de expresión de *pilD* y *pilT* (cuyos productos serían esenciales para la movilidad gliding dependiente de T4P) en cultivos de *C. perfringens* salvaje (Cepa 13) y mutante en *ccpA* (cepa KO13) crecidos en medio líquido TY sin suplementar con glucosa.

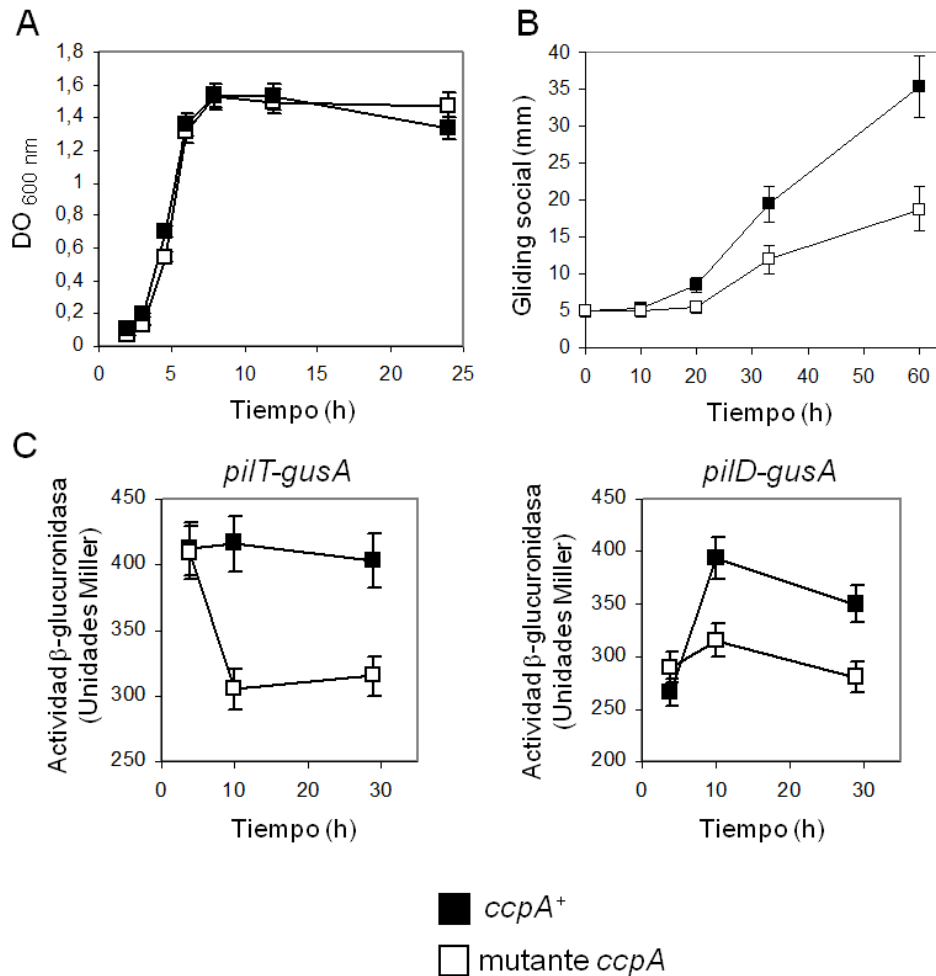


Figura 25: CcpA tiene un nuevo rol positivo independiente de catabolito en la movilidad gliding de *C. perfringens*. (A) Curva de crecimiento de la Cepa 13 *ccpA*<sup>+</sup> y su mutante *ccpA* isogénica, KO13. Los dos cultivos se crecieron en TY a 37°C. Cuadrados negros, Cepa 13, cuadrados blancos, cepa KO13. (B) Cinética de la movilidad gliding de la Cepa 13 (salvaje) y su mutante isogénica deficiente en CcpA KO13 (mutante *ccpA*) desarrollado en placas de TYA sin suplementación con azúcar. El gliding fue registrado como se describió anteriormente (Figura 20). Se graficaron los valores promedios obtenidos de cinco experimentos independientes. (C) Requerimiento de la actividad de CcpA para la expresión completa de los genes *pilT* y *pilD* en la Cepa 13 de *C. perfringens* creciendo en TY líquido sin suplementación con glucosa. Se muestra las actividades β-glucuronidasa obtenidas en cultivos del *C. perfringens* *ccpA*<sup>+</sup> y mutante en *ccpA* (Cepa 13 y KO13, respectivamente), llevando las fusiones *pilT-gusA* (izquierda) y *pilD-gusA* (derecha). Los cuatro cultivos fueron crecidos en TY líquido sin la adición de glucosa; la actividad β-glucuronidasa acumulada fue medida a los tiempos indicados en la figura (Philippe, V. A. et al., 2006). Los símbolos negros representan a la cepa salvaje (con actividad CcpA) y los símbolos blancos a la cepa isogénica deficiente en CcpA. Se muestra un set de cinco experimentos representativos independientes.

Como se observa en la Figura 25C, hay una regulación negativa de la expresión de *pilD* y *pilT* en cultivos deficientes en la producción de CcpA. Este rol positivo de CcpA en la expresión de genes importantes en la biosíntesis del T4P (Figura 25C) y en la eficiencia del gliding social (Figura 23A y 25B ) en ausencia de agregado de azúcar, y su efecto opuesto (negativo) sobre el mismo comportamiento social (movilidad gliding) bajo condiciones de represión catabólica por carbono (Figura 23A, en presencia de glucosa), sugieren un nuevo rol dual para CcpA en la regulación de la movilidad tipo gliding en el patógeno causante de la gangrena gaseosa, *C. perfringens* (Figura 23).

Colectivamente se observó que la movilidad tipo gliding de *C. perfringens* gangrenogénico, Cepa 13 (así como en otras cepas patógenas), es reprimida por glucosa y otros azúcares rápidamente metabolizables. Esto podría ser debido, en parte, a una inhibición dependiente de CcpA (rol represor) de los genes para la biosíntesis y funcionalidad del pili tipo IV. Por otro lado, CcpA también mostró ser necesaria para un eficiente gliding de *C. perfringens*, cumpliendo de esta manera un rol positivo en el desarrollo de la movilidad sobre superficies sólidas.

## **5. Capítulo Segundo.**

**Los carbohidratos inhiben la  
producción de toxinas esenciales para  
la iniciación y establecimiento de la  
gangrena gaseosa.**

A pesar de la importancia clínica y la relevancia sanitaria de la infección por gangrena gaseosa humana, nuestro conocimiento de las señales que afectan la producción de toxinas en el proceso de la gangrena gaseosa es escaso. Muchas bacterias regulan la expresión de los genes de virulencia en respuesta a la densidad poblacional, mediante un fenómeno producido como censado del quórum (QS, quorum sensing), y señales medioambientales (Xavier, K. B. y Bassler, B. L., 2003; Lombardía, E. et al., 2006; Gobbetti, M. et al., 2007). Estudios recientes han demostrado el rol clave de los diferentes mecanismos de QS en la producción de toxinas en la Cepa 13 de *C. perfringens* causantes de gangrena gaseosa en humanos. (Shimizu, T., Yaguchi, H. et al., 2002; Ohtani, K. et al., 2002; Okumura, K. et al., 2008; Cheung, J. K. et al., 2009; Ohtani, K. et al., 2009). De forma intrigante, estos sistemas regulatorios de QS actúan positivamente en la producción de toxinas en *C. perfringens* mientras que la naturaleza de posibles señales negativas permanece completamente desconocida.

Una red regulatoria global inexplorada que podría regular la homeostasis de la producción de toxinas relacionadas con la gangrena gaseosa es la disponibilidad de carbono (Görke, B. y Stülke, J., 2008). Efectivamente el azúcar y sustancias relacionadas (por ejemplo melazas y miel) han sido usadas desde tiempos milenarios para promover el sanado de heridas y prevenir infecciones (Forrest, R., 1982; Forrest, R., 1982; Beading, L., 1997; Keith, J. F. y Knodel L., 1988; Cooper, R. et al., 2002; Lisle, J., 2002). La explicación del rol de los azúcares en el tratamiento de heridas para prevenir infecciones y acelerar el curado es complejo y tal vez imposible de reducir a un simple mecanismo. En el capítulo anterior se demostró que los carbohidratos rápidamente metabolizables como la glucosa, sacarosa y otros median la represión catabólica por carbono, CCR, de la movilidad tipo gliding en *C. perfringens*, un comportamiento social que tendría un significativo rol durante la dispersión de la gangrena a través de los tejidos. En *C. difficile* la glucosa, así como otros carbohidratos rápidamente metabolizables, reducen la expresión de los genes de las toxinas *toxA* y *toxB* (Sección 1.4.4.). Considerando que la producción de toxinas, particularmente PLC y PFO, es crucial para el desarrollo de la gangrena gaseosa por *C. perfringens*, se decidió explorar la posibilidad de que los azúcares también puedan constituir una señal nutricional importante (CCR) que regulara la producción de toxinas necesarias para el establecimiento de la gangrena gaseosa en *C. perfringens*.

### **5.1. La producción de toxina alfa y toxina theta es inhibida por la presencia de azúcares en *C. perfringens*.**

Para determinar el efecto de la presencia de azúcar sobre la producción de las toxinas PLC y PFO. Primeramente se examinó el efecto de diferentes concentraciones de carbohidratos rápidamente metabolizables por *C. perfringens* Cepa 13 como la sacarosa y glucosa en un rango desde 0,25 % a 3 %, (Shimizu, T. et al., 2002; Capítulo primero). La sacarosa o la glucosa fue añadida al principio de cada experimento al medio de cultivo TY, caldo que contiene concentraciones de azúcares libres menores a 0,1 % (Sección 3.2.). Las actividades de PLC y PFO fueron medidas usando los sobrenadantes filtrados de cultivos de la Cepa 13 suplementados o no con azúcar, a diferentes tiempos durante el crecimiento. La habilidad de estos sobrenadantes de degradar yema de huevo (actividad PLC) y de lisar glóbulos rojos humanos (actividad PFO) fue determinada como se describe en la Sección 3.14. En la Figura 26 se muestra que la producción de PLC y PFO, medida titulando las actividades enzimáticas, no fueron significativamente afectadas por la adición de 0,25 % de glucosa (Figura 26A y 26B) o 0,25 % de sacarosa (Figura 26C y 26D) a cultivos de *C. perfringens* crecidos en TY. Sin embargo, concentraciones de azúcar superiores, en el rango de 0,5 % a 3 %, producen una significativa y reproducible regulación negativa dosis dependiente de la producción de PLC y PFO a lo largo del ciclo de crecimiento de *C. perfringens* Cepa 13 (Figura 26). La producción de PLC y PFO fue reducida en un 30 %, 50 % y 80 % cuando *C. perfringens* Cepa 13 fue crecida en la presencia de 0,5 %, 1 % y 2 % de glucosa (o sacarosa) respectivamente, en comparación con los niveles de toxina producida en ausencia de azúcar (Figura 26). El ciclo de crecimiento no fue afectado significativamente, siendo las velocidades de crecimiento de la Cepa 13 prácticamente iguales tanto en medio TY como en medio TY suplementado con glucosa o sacarosa (dato no mostrado).

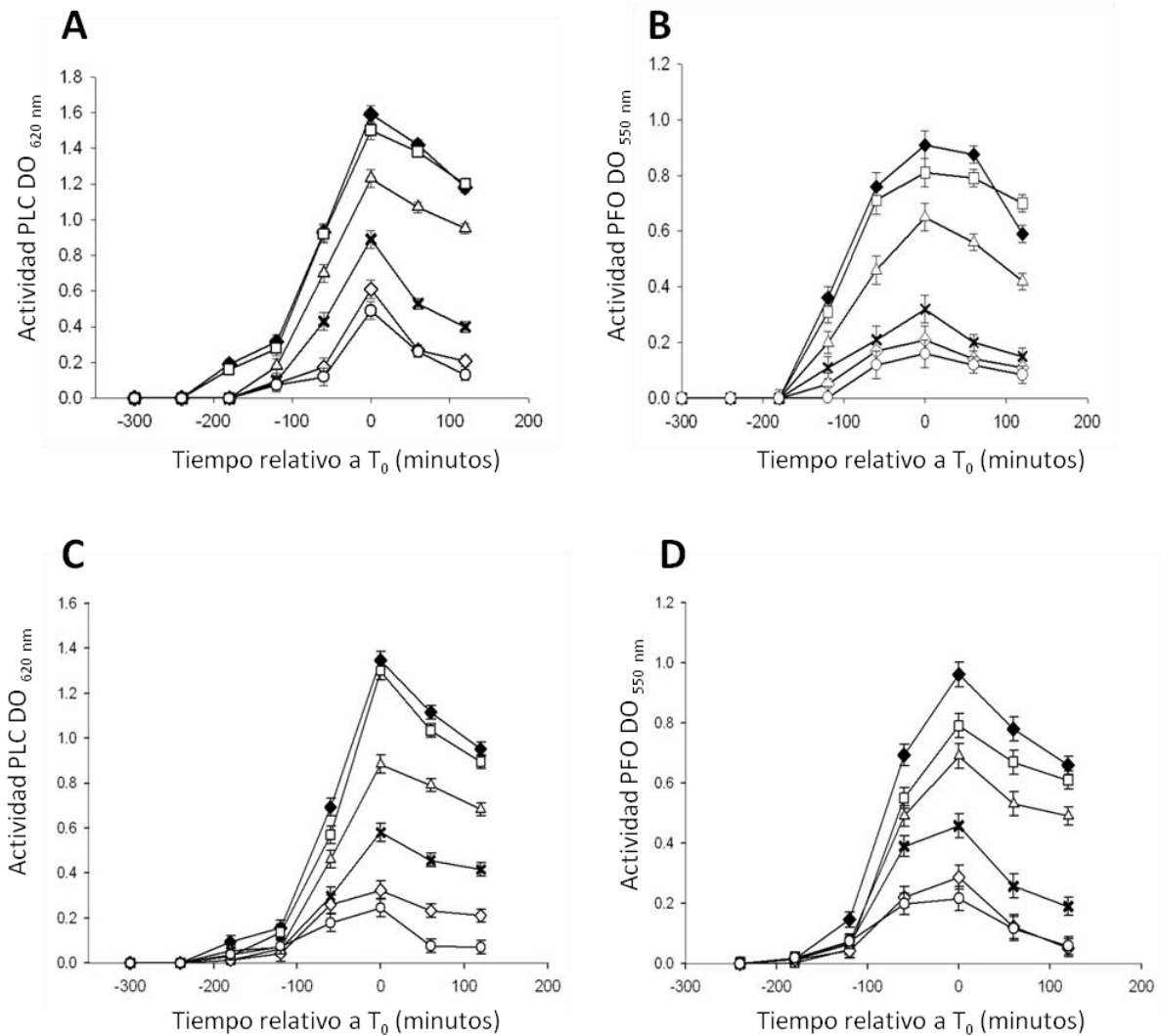


Figura 26: Los azúcares regulan la producción de PLC y PFO en *C. perfringens*. Respuestas dosis dependientes de la actividad fosfolipasa de PLC (toxina alfa) (A y C) y actividad hemolítica de PFO (toxina theta) (B y D) de sobrenadantes de cultivos de la Cepa 13 de *C. perfringens* crecidos en TY con (símbolos blancos) o sin (símbolos negros) suplementación con glucosa (A y B) o sacarosa (C y D). Las concentraciones de azúcar ensayadas son las siguientes: 0,25 % (cuadrado), 0,5 % (triángulo), 1 % (cruz), 2 % (rombo) y 3 % (círculo). Las muestras fueron tomadas a los tiempos indicados y la reacción enzimática fue llevada a cabo como se menciona en la Sección 3.14. (O'Brien, D. K. y Melville, S. B., 2004 y Fernandez-Miyakawa, M. et al., 2007). La adición de glucosa o sacarosa, a las diferentes concentraciones, no afectó el crecimiento vegetativo mientras que el rendimiento celular final de los cultivos de la Cepa 13 de *C. perfringens* en presencia de azúcar fueron escasamente superiores.  $T_0$  representa el final de la fase de crecimiento exponencial. Se muestra un set de resultados obtenidos de tres experimentos independientes.

Para distinguir si los efectos observados sobre la producción de las toxinas PLC y PFO fue debido a la presencia del azúcar (regulación por carbono) o la variación de pH (fermentación del azúcar), se analizó el efecto de la glucosa y la sacarosa sobre la producción de las toxinas PLC y PFO en sobrenadantes libres de células derivados de cultivos de *C. perfringens* crecidos en presencia de azúcar y diferentes concentraciones de los buffer Tris-HCl o MOPS para regular el pH del medio de cultivo (Sección 3.14.3.) (Philippe, V. A. et al., 2006). Bajo estas condiciones experimentales (crecimiento en TY-Tris o TY-MOPS), la suplementación con 2 % o 3 % de glucosa o sacarosa produce esencialmente el mismo efecto de reducción de las actividades de PLC y PFO mostrados en la Figura 26 (datos no mostrados). Por lo tanto, los catabolitos de carbono, y no el pH, regula la capacidad de *C. perfringens* Cepa 13 para producir las toxinas PLC y PFO. Un resultado similar se obtuvo cuando la glucosa y la sacarosa fue reemplazada por fructosa, otro carbohidrato rápidamente metabolizable (Stülke, J. y Hillen, W., 2000; Görke, B. y Stülke, J., 2008; Capítulo Primero), pero no cuando se utilizaron carbohidratos complejos (datos no mostrados). Estos resultados demuestran la regulación por catabolito de carbono (azúcar) de las actividades de PLC y PFO en una cepa de *C. perfringens* causante de gangrena gaseosa en humanos.

## **5.2. La expresión de los genes codificantes de las toxinas PLC y PFO es reprimida por azúcares.**

Se analizó si la disminución en las actividades fosfolipasa C y hemolítica debida a PLC y PFO de los cultivos de *C. perfringens* crecidos en presencia de azúcares (glucosa o sacarosa) se debía a una represión transcripcional mediada por el carbohidrato adicionado sobre la expresión de los genes de las toxinas (CCR). Para ello, se estudió la expresión de *plc* y *pfoA*, codificantes para PLC y PFO respectivamente, en cultivos de *C. perfringens* crecidos en presencia y ausencia de azúcares catabolitos, usando dos estrategias. Primeramente, se construyeron fusiones reporteras transcripcionales del gen sin promotor *gusA*, el cual codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, a la región promotora de *plc* y *pfoA* (Sección 3.5.). Las fusiones reporteras  $\beta$ -glucuronidasa *plc-gusA* y *pfoA-gusA* fueron introducidas separadamente en la Cepa 13 de *C. perfringens* a través de electroporación con ADN (Sección 3.9.) (Philippe, V. A. et al., 2006). Los

cultivos de la Cepa 13 llevando *plc-gusA* y *pfoA-gusA* fueron crecidos separadamente en medio TY con o sin suplementación con azúcar, y las actividades  $\beta$ -glucuronidasa de los reporteros fue ensayada como se describe en la Sección 3.6. Para este análisis se escogió la concentración de azúcar del 2 % ya que produce un claro efecto inhibitorio sobre la producción de toxina (Figura 26) y además, esta concentración de azúcar inhibe completamente la movilidad tipo gliding dependiente de T4P de *C. perfringens* Cepa 13, como se describió en el Capítulo Primero. Interesantemente, en los cultivos de *C. perfringens* Cepa 13 crecidos en presencia de glucosa adicionada (o sacarosa, dato no mostrado), hubo una sustancial y reproducible regulación negativa (dos a tres veces) de las actividades de los promotores *plc* y *pfoA* durante todo el ciclo de crecimiento (Figura 27A y 27B, respectivamente). Este efecto observado de CCR sobre la expresión de los genes relacionados con la gangrena gaseosa (Figura 27A y 27B) fue confirmado por RT-PCR cualitativa específica para los transcritos (ARNm) de *plc* y *pfoA* obtenidos de cultivos de la Cepa 13 de *C. perfringens* en presencia y en ausencia de suplementación con azúcar. Como se muestra en la Figura 27C, el agregado de glucosa al medio de cultivo (o sacarosa, dato no mostrado) produce una significativa reducción de ARNm<sub>*plc*</sub> y ARNm<sub>*pfoA*</sub> (dos y cinco veces respectivamente). Estos resultados confirman que el efecto inhibitorio producido por catabolitos carbonados sobre la generación de toxinas relacionadas con la gangrena gaseosa en *C. perfringens* histotóxico tiene lugar a nivel transcripcional.

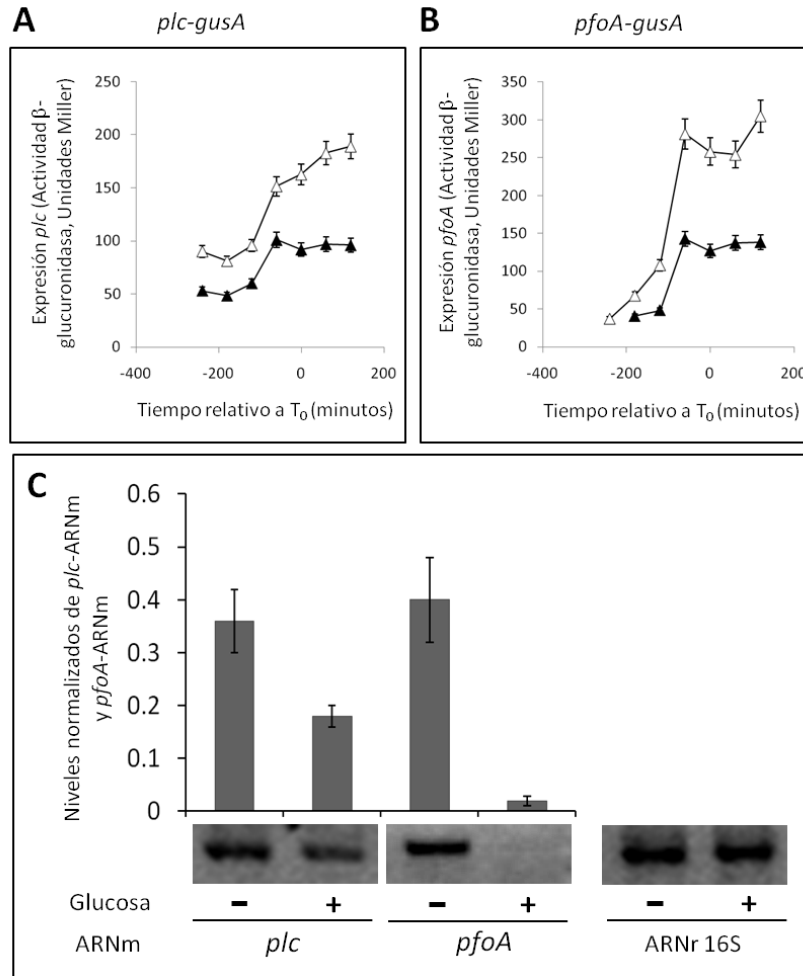


Figura 27: Los azúcares producen represión por catabolito de carbono de la expresión de los genes *plc* y *pfoA* en *C. perfringens* causante de gangrena gaseosa. (A y B) Actividad  $\beta$ -glucuronidasa de los fusiones transcripcionales reporteras *plc-gusA* (A) y *pfoA-gusA* (B) en cultivos de la Cepa 13 crecida en TY, con (triángulo negro) o sin (triángulo blanco) 2 % de glucosa adicionada al medio de cultivo. A los tiempos indicados se tomaron muestras y se procesaron para medir la actividad  $\beta$ -glucuronidasa. Resultados similares se obtuvieron cuando la glucosa 2 % fue reemplazada por sacarosa 2 % (dato no mostrado). Un set representativo de cinco experimentos independientes es mostrado. (C) RT-PCR semi-cuantitativa de ARNm para *plc* y *pfoA* en presencia o ausencia de glucosa adicionada al caldo de cultivo. Los cultivos de *C. perfringens* Cepa 13 fueron crecidos en TY con o sin la suplementación de 2 % de glucosa (indicado en la figura por el signo “más” y el signo “menos” respectivamente). Las muestras para la extracción del ARN fueron tomadas al final de la fase de crecimiento exponencial ( $T_0$ ) y procesadas para la amplificación por RT-PCR y posterior semi-cuantificación (Masayama, A. et al., 2006). Las cantidades relativas de los ARNs específicos detectados fueron normalizadas a la intensidad de banda de amplificación de ARNr 16S determinada a partir del gel por densitometría óptica (Sección 3.17.3.). Un set representativo de cinco experimentos independientes es mostrado.

### 5.3. La represión por catabolito de carbono de la toxina alfa y la toxina theta está bajo el control de CcpA en *C. perfringens*.

La proteína de control por catabolito de carbono, CcpA, juega un rol clave en las bacterias Gram-positivas con bajo contenido de G+C conectando el metabolismo del carbono con varias respuestas celulares (Görke, B. y Stülke, J., 2008; Fujita Y., 2009). Evidencia creciente sobre diversos patógenos, incluyendo *Streptococcus* patogénicos (Abranches, J. et al., 2008; Görke, B. y Stülke, J., 2008; Kinkel, T. L. y McIver, K. S., 2008), sugieren que CcpA juega un importante rol en la expresión de los genes asociados a virulencia. En *C. perfringens*, CcpA regula la esporulación, la producción de la enterotoxina CPE, la formación de biofilm y, como se describe en el Capítulo Primero, la movilidad tipo gliding (Varga, J. J., et al., 2004; Varga, J. J., et al., 2008; Capítulo Primero). Considerando el efecto represivo observado sobre la expresión de los genes *plc* y *pfoA* (Figura 27), se estudió si CcpA tenía un rol en la CCR mediada por azúcares de la producción de toxinas relacionadas con la gangrena gaseosa (PLC y PFO) en *C. perfringens*. Para ello se comparó las actividades y los niveles de expresión de las toxinas PLC y PFO en cultivos de la Cepa 13, salvaje, y su mutante isogénica *ccpA* derivada KO13 (Capítulo Primero), crecidas en presencia y ausencia de azúcar añadida. Como se esperaba, cuando la actividad PLC fue evaluada en la Cepa 13 la cual expresa CcpA, cultivada en presencia de glucosa 2 % o sacarosa 2 %, se detectaron bajos niveles de actividad PLC (Figura 28A, arriba). En contraste, la mutante en *ccpA* KO13 retenía el 100 % de su actividad PLC en presencia de glucosa o sacarosa 2 % (Figura 28A, abajo). Para confirmar si el rol de CcpA sobre la CCR mediada por azúcar de la toxina alfa (PLC) en *C. perfringens* se lleva a cabo a través de la regulación de la transcripción génica, se comparó los niveles de expresión del promotor *plc*. Para lo cual se midió la actividad  $\beta$ -glucuronidasa de una fusión reportera transcripcional *plc-gusA* en cultivos de la cepa CcpA<sup>+</sup> y en la cepa deficiente en CcpA (CcpA<sup>-</sup>) crecidas en medio TY con o sin glucosa 2 % o sacarosa 2 %. Como puede observarse en la Figura 28B, en los cultivos deficientes en CcpA (abajo), pero no en los que expresan CcpA (arriba), la transcripción de *plc* no fue inhibida por la adición de glucosa o sacarosa al caldo de cultivo. Este resultado fue confirmado a través de RT-PCR cualitativa, analizando los niveles relativos de ARNm<sub>*plc*</sub> en la cultivos de *C. perfringens* deficientes en CcpA (cepa KO13) crecidos en medio TY con suplementación de azúcar. Se observó que no hay

diferencia en los niveles relativos de  $ARNm_{plc}$  tanto en cultivos con y sin azúcar adicionada (dato no mostrado).

Similarmente a PLC, no hubo una significativa reducción en la actividad PFO, o la actividad  $\beta$ -glucuronidasa conducida por el promotor *pfoA*, en cultivos de *C. perfringens* CcpA<sup>-</sup> crecidos en presencia de azúcares adicionados (Figura 28C y 28D, parte inferior), comparado con la regulación negativa observada sobre la actividad y expresión de PFO en cultivos de la cepa CcpA<sup>+</sup> de *C. perfringens* en las mismas condiciones de crecimiento (Figura 28C y 28D, parte superior, respectivamente). Los análisis por RT-PCR de los niveles relativos de  $ARNm_{pfoA}$  también confirman la completa ausencia de regulación sobre la expresión de *pfoA* en células de la cepa de *C. perfringens* KO13 deficiente en CcpA (dato no mostrado). Ya que la única diferencia entre la Cepa 13 y la cepa KO13 es la habilidad de producir una CcpA funcional (Sección 3.16. y Capítulo Primero), es posible concluir que CcpA es la principal, o única, proteína regulatoria involucrada en la regulación por catabolito de carbono (CCR) mediada por azúcar de la producción de las toxinas PLC y PFO en *C. perfringens*.

Un resultado inesperado pero no menos interesante fue, que en ausencia de suplementación con carbohidratos rápidamente metabolizables, los cultivos de *C. perfringens* deficientes en CcpA (cepa KO13) mostraron un significativo incremento en las actividades de PLC y PFO, así como una pronunciada inducción (tres a cinco veces) de la expresión de *plc* y *pfoA*, comparado con la actividad y los niveles de expresión PLC/PFO de cultivos isogénicos productores de CcpA (Cepa 13, salvaje), crecidos en condiciones similares (comparar las barras sin suplementación con azúcar entre la Cepa 13 y la KO13 en la Figura 28). En concordancia con lo observado, como se muestra en la Figura 29, hay una clara y reproducible regulación positiva de la síntesis de los ARNms específicos para *plc* y *pfo* (tres y cinco veces respectivamente) en la cepa mutante *ccpA* KO13 comparado con los niveles de  $ARNm_{plc}$  y  $ARNm_{pfoA}$  producidos por la cepa salvaje isogénica Cepa 13, crecidas, ambas, bajo las mismas condiciones de ausencia en suplementación con azúcar.

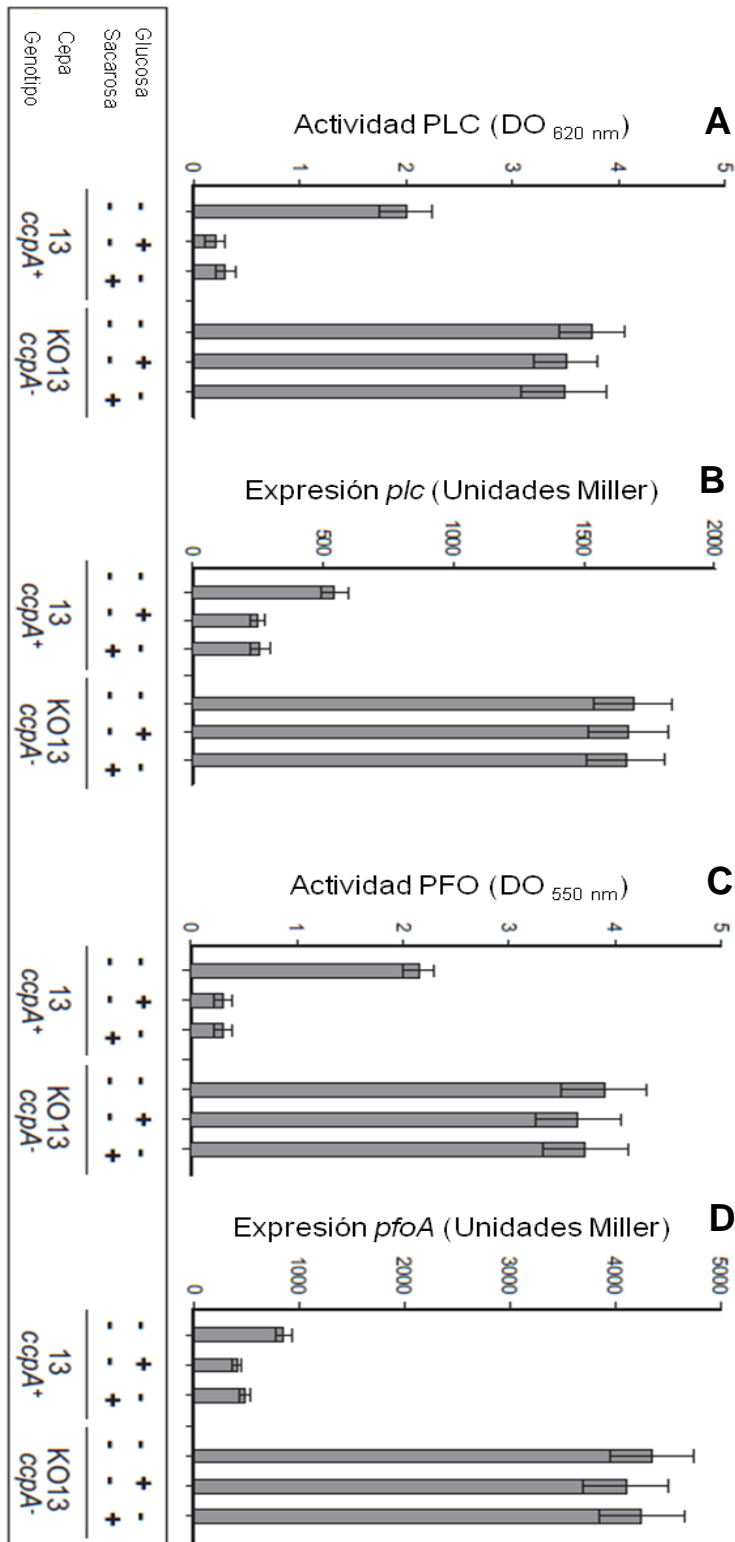


Figura 28: CcpA media la represión catabólica por azúcar de la producción de la toxina alfa (PLC) y la toxina theta (PFO) en *C. perfringens* productor de gangrena gaseosa. Cultivos de *C. perfringens* capaces e incapaces de producir CcpA (Cepa 13 y KO13, respectivamente), fueron crecidas hasta 1 h después del final de la fase exponencial ( $T_1$ ) en TY con y sin suplementación con azúcar (glucosa 2 % o sacarosa 2 %). Para cada cultivo, dos muestras (a tiempo  $T_0$  y  $T_1$ ) fueron tomadas y procesadas juntas para la medición la actividad fosfolipasa de PLC (A), actividad  $\beta$ -glucuronidasa conducida por *plc* (B), actividad hemolítica de PFO (C) y actividad  $\beta$ -glucuronidasa conducida por *pfoA* (D), respectivamente. Se muestra un set representativo de tres experimentos independientes.

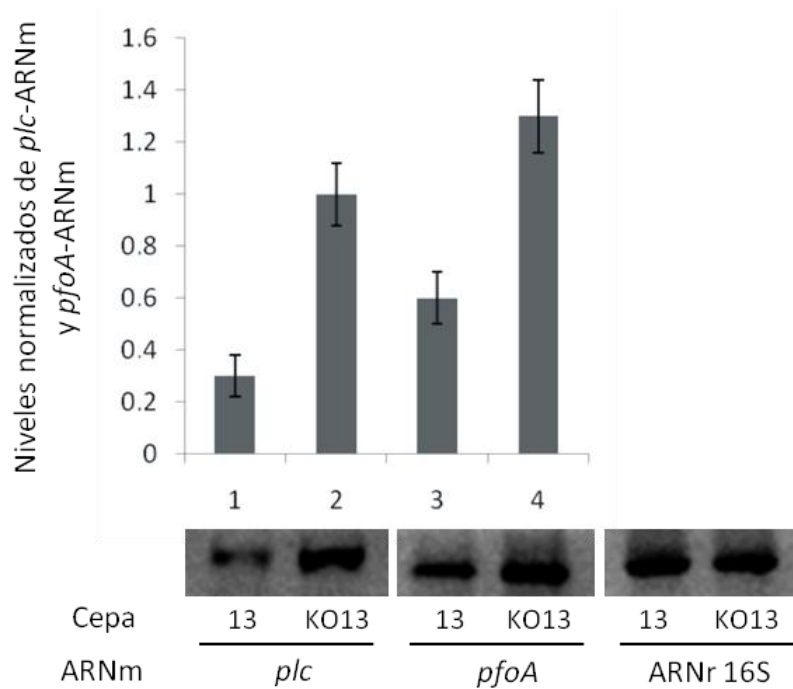


Figura 29: CcpA juega un rol clave sobre la producción de toxinas relacionadas con la gangrena gaseosa en *C. perfringens*. RT-PCR semi-cuantitativo de los ARNm de *plc* y *pfoA* en ausencia de azúcar añadida. Los cultivos de *C. perfringens* Cepa 13 y KO13 capaz e incapaz de sintetizar CcpA, respectivamente, fueron crecidos en TY sin el agregado de azúcar. Las muestras para la extracción de ARN fueron tomadas al final de la fase exponencial de crecimiento ( $T_0$ ) para la amplificación por RT-PCR y semi-cuantificación (Masayama, A. et al., 2006). La cantidad relativa de cada ARNm específico producido fue normalizada a la intensidad de la banda de amplificación de ARNr 16S, determinada a partir de gel por densitometría óptica (Sección 3.17.3.). Se muestra un set representativo de tres experimentos independientes.

**6. Capítulo Tercero.  
Regulación de los genes de las toxinas  
PLC, PFO y del T4P por CcpA en *C.  
perfringens*.**

## 6.1. Regulación de los genes *plc* y *pfoA*, codificantes de las toxinas desencadenantes de la gangrena gaseosa.

En *C. perfringens* las principales toxinas implicadas en la patología conocida como gangrena gaseosa son PLC y PFO. La expresión de los genes *plc* y *pfoA* es regulada positivamente por el sistema de dos componentes VirR/VirS (Ba-thein, W. et al., 1996; Banu, S. et al., 2000; Shimizu, T. et al., 2002). En este sistema de dos componentes, VirS es la proteína histidin quinasa sensora y VirR el regulador de respuesta. VirS se autofosforila en un residuo de histidina luego de recibir un estímulo ambiental, transfiriendo luego éste fosfato al regulador de respuesta VirR. Una vez que VirR es activado por fosforilación se une a las regiones promotoras de los genes en los cuales regula su expresión. Del análisis del genoma completo de *C. perfringens* Cepa 13 se encontró que solo cinco genes, incluyendo a *pfoA* y VR-RNA (Vrr), tienen sitios de unión para VirR en sus regiones promotoras (Figura 30) (Shimizu, T. et al., 2002). VR-RNA es un ARN pequeño que regula la transcripción de *plc* (Shimizu, T., Yaguchi, H. et al., 2002). *C. perfringens* posee muchos genes que codifican para toxinas y enzimas con la capacidad de degradar el tejido del hospedador, mientras que carece de muchos genes relacionados con la síntesis de aminoácidos. Por lo tanto, cuando *C. perfringens* produce una infección secretaría este arsenal de toxinas y enzimas degradadoras de tejido con la finalidad de obtener aminoácidos necesarios para su supervivencia en el nicho biológico del hospedador. De esto se desprende que el sistema VirR/VirS sería muy importante para la activación de la producción de toxinas y la sobrevivencia de *C. perfringens* cuando este patógeno se encuentra dentro del hospedador infectado. Sin embargo, hasta ahora no se ha determinado la naturaleza de la señal que es sensada por VirS y como este sistema de señalización activa efectivamente la producción de toxinas (Ohtani, K. et al., 2009).

Muchas bacterias regulan la expresión génica en respuesta a la densidad de la población celular, un fenómeno conocida como “sensado del quórum” (Fuqua, W, C. et al., 1994). El sensado de quórum involucra la producción de moléculas señal extracelulares denominadas autoinductores. En general, muchos autoinductores conocidos en bacterias Gram-positivas son péptidos secretados que son procesados a partir de péptidos más largos. Estos autoinductores peptídicos funcionan como ligandos para receptores histidin quinasa de los sistemas de dos componentes sensores (Fuqua, W. C. et al., 1994). En bacterias Gram-negativas, las N-acetilhomoserina lactonas

(AHLs) son autoinductores bien caracterizados (Miller, M. B. y Bassler, B. L., 2001). Estas moléculas difunden libremente dentro y fuera de las células e interactúan directamente con proteínas reguladoras intracelulares. Cuando la concentración intracelular de AHL alcanza cierto umbral, AHL puede regular eficientemente la expresión de muchos genes. Existe otro autoinductor, denominado autoinductor 2 (AI-2) (Xavier, K. B. y Bassler, B. L., 2003) el cual es producido por el producto del gen *luxS*. Se han encontrado homólogos altamente conservados de *luxS* tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. Este sistema de señalización dependiente de AI-2 juega un importante rol en la regulación de factores de virulencia y durante la formación biofilms en distintas bacterias patogénicas (Xavier, K. B. y Bassler, B. L., 2003; Carter, G. P. et al., 2005; Waters, C. M. y Bassler, B. L., 2005; Gobbetti, M. et al., 2007).

En *C. perfringens* se ha sugerido la existencia de señalización célula-célula involucrada en la activación de la producción de toxinas (Higashi, Y. et al., 1973). Cuando dos cepas no productoras de toxinas fueron estriadas juntas en una placa de agar-sangre una de las cepas recuperó la capacidad de producir toxinas en el punto de contacto entre ambas (Higashi, Y. et al., 1973; Imagawa, T. et al., 1981). Estas observaciones soportan el modelo de la existencia de una señal difusible (llamada sustancia A) que estimula la producción de toxina en las células circundantes. Varios años después, en el año 2002, Ohtani y colaboradores, reportaron la existencia de una señalización intercelular mediada por el producto de *luxS*, concluyéndose que la señal producida regulaba la transcripción de los genes de las toxinas. Sin embargo, la cepa mutante en *luxS* continúa produciendo toxinas; por lo tanto, se estableció que el sistema de señalización mediado por *luxS* sería diferente del mediado por la sustancia A, habiendo entonces un sistema sistema diferente de señalización célula-célula en *C. perfringens* (Figura 30) (Ohtani, K. et al., 2002).

En las bacterias Gram-positivas, un péptido secretado regula la expresión génica en una manera de sensado de quórum como se describió anteriormente (Novick, R. P. y Muir, T. W., 1999). En el caso de *Staphylococcus aureus*, el propeptido autoinductor (AIP) actúa como una señal que estimula la expresión génica. Este péptido contiene un anillo tiolactona intramolecular. El gen *agrD* es el gen que codifica para AIP y AgrB es la proteína que es requerida para la modificación del propéptido AgrD. En el genoma de *S. aureus*, los genes para el sistema de dos componentes que sensan este AIP, *argA* y *argC*, se encuentran junto a *agrBD*. AgrA es el regulador de respuesta y AgrC es la

histidin quinasa sensora. El AIP sintetizado por AgrD es secretado y acumulado en el sobrenadante. Una vez que AIP alcanza una concentración determinada, AIP activa su receptor, AgrC, la cual activa AgrA por fosforilación. Finalmente AgrA activa la transcripción de un ARN regulatorio, ARN III, el cual regula la expresión de distintos genes de virulencia de *S. aureus* (Novick, R. P. y Muir, T. W., 1999; Muir, T. W., 2003; George, E. A. y Muir T. W., 2007). Este sistema de señalización está altamente conservado entre muchas bacterias Gram-positivas (Nakayama, J. et al., 2003; Lyon, G. J. y Novick, R. P., 2004; Rieu, A. et al., 2007).

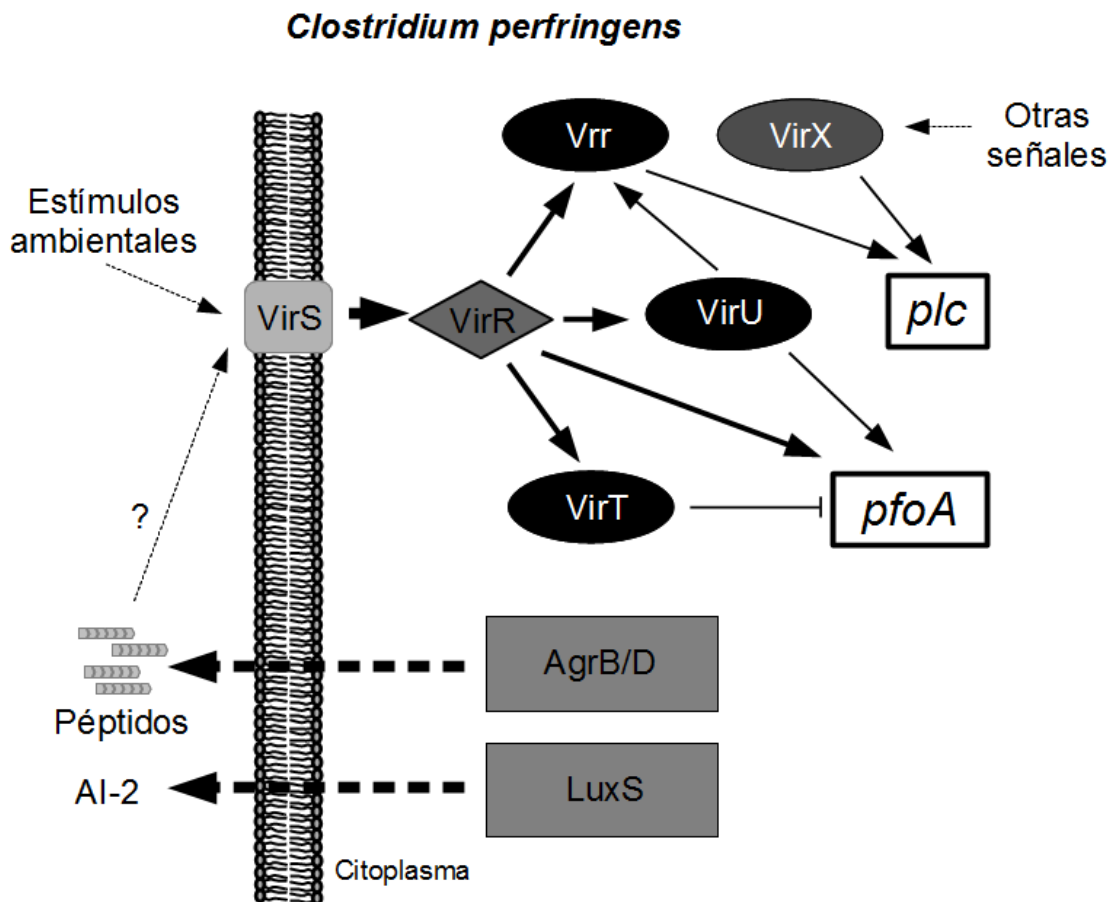


Figura 30: Regulación de las toxinas PLC y PFO en *C. perfringens* Cepa 13. La expresión de *plc* es regulada positivamente por VirR/S a través de Vrr (VR-RNA) y por VirX. *pfoA* es activado por VirR/S directamente y por el ARN regulatorio VirU, siendo reprimida su transcripción por VirT (dependiente de VirR/S). La expresión de *plc* y *pfoA* dependen del sistema AgrB/D mediado por un péptido corto de posible secuencia TSACWFT, que sería sentido por el sistema VirR/S (Ohtani et al, 2009). El autoinductor tipo 2 (AI-2) también modularía la producción de toxinas por una vía desconocida (Ohtani, K. et al., 2002).

En un trabajo reciente (Ohtani, K. et al., 2009) se identificó el sistema *agrBD* en *C. perfringens* (*agrBD<sub>Cp</sub>*) que es homólogo al par génico *agrBD* de *S. aureus* (*agrBD<sub>Sa</sub>*). El análisis genético funcional reveló que *agrBD<sub>Cp</sub>* está involucrado en la regulación positiva de los genes para la alfa-, theta-, y kappa-toxinas (PLC, PFO y colagenasa, respectivamente; Tabla 1, Sección 1.4.) a través de un mecanismo de señalización célula-célula que involucraría al sistema de dos componentes VirR/VirS (Figura 30) (Ohtani, K. et al., 2009).

### 6.1.1. Regulación de la producción de PFO por catabolito de carbono.

El gen codificante de la toxina PFO se encuentra, en *C. perfringens*, bajo el control directo del sistema VirR/S (Cheung, J. y Rood, J., 2000; Okumura, K. et al., 2008), siendo además regulado positivamente por el ARN regulador VirU, el cual a su vez es activado por VirR. Paralelamente, *pfoA*, es reprimido por otro ARN regulador, VirT; cuya expresión es también regulada por el sistema de dos componentes VirR/S (Figura 30). El promotor de *pfoA* posee sitios de unión para VirR activado por fosforilación dependiente de VirS (Figura 30) (Cheung, J. y Rood, J., 2000; Okumura, K. et al., 2008). Se determinó además que la transcripción de *pfoA* no depende del gen corriente arriba denominado *pfoR*, ya que la mutación del mismo no afecta los niveles de PFO determinados por ensayo hemolítico (Awad, M. y Rood, J., 2002).

Considerando entonces la dependencia de la expresión de *pfoA* del sistema VirR/S, de VirU y VirT, se decidió analizar si la CCR observada sobre PFO dependiente de CcpA era directa o si dependía de alguno de estos tres reguladores. Siendo que CcpA modula la transcripción de sus genes blanco a través de la unión a secuencias de ADN conocidas como CRE (Sección 1.3.), se estudió si estas secuencias CRE estaban presentes en las regiones promotoras de *pfoA*, *virR*, *virU* y *virT* (programa DNAMAN, Sección 3.17.). Primeramente se procedió a explorar las secuencias consenso CRE reportadas hasta la fecha en *Firmicutes*. En la Tabla 5 se muestra las secuencias consenso CRE para *B. subtilis* y *C. difficile*.

**Tabla 5: Secuencias CRE reportadas en la bibliografía y secuencias halladas por análisis informático en *C. perfringens* Cepa 13.**

Microorganismo	Secuencia consenso reportadas														Referencia					
<i>B. subtilis</i>	W	W	T	G	N	A	A	R	C	G	N	W	W	W	C	A	W	W	W: A o T	Abdou, 2008
<i>B. subtilis</i>		W	T	G	N	A	A	N	C	G	N	W	W	N	C	A			Y: C o T	Fujita, 2009
<i>B. subtilis</i>		W	T	G	A	A	A	R	C	G	Y	T	T	W	N	N			R: A o G	Fujita, 2009
<i>B. subtilis</i>		W	T	G	N	N	A	R	C	G	N	W	W	W	C	A	W		N: A, T, C o G	Antunes, 2012
<i>C. difficile</i>		R	R	G	A	A	A	A	N	G	T	T	T	T	C	W	W			Antunes, 2012
<i>B. subtilis</i>		W	T	G	N	A	A	N	C	G	N	W	N	N	C	W				Crooke, 2013

Microorganismo	Secuencias CRE														Gen	Regulación	Posición (i)			
<i>C. difficile</i>		G	A	G	A	A	A	A	G	G	A	T	T	T	C	T	A	<i>virS</i>	No (a)	<b>92</b>
<i>C. difficile</i>		A	A	G	A	A	A	A	A	G	T	T	T	T	C	A	T	<i>nanE</i>	No (a)	<b>-72</b>
<i>C. difficile</i>		G	A	G	A	A	A	A	T	G	T	T	T	A	C	A	A	<i>prdA</i>	Activación (a)	<b>-293</b>
<i>C. cellulolyticum</i>	T	G	T	G	T	A	C	G	C	G	T	T	T	A	T	A	T	<i>cipC</i>	Represión (b)	<b>-55 (-248)</b>
<i>C. acetobutylicum</i>		T	G	T	A	A	A	C	G	A	A	A	A	C	A			<i>lacR</i>	Represión (c)	<b>-1</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>		T	G	T	A	A	A	G	G	C	T	T	A	C	A			<i>pckA</i>	Represión (d)	<b>-36</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>		T	G	T	A	A	G	G	T	T	T	T	C	A				<i>rocD</i>	Represión (d)	<b>-143</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	A	T	G	T	A	A	T	C	G	T	A	T	A	C	A			<i>ldh1</i>	No (e)	
<i>B. subtilis</i>		A	G	A	A	A	G	C	G	C	A	T	A	C	A			<i>ccpB</i>	Represión (h)	<b>-100</b>
<i>B. subtilis</i>	T	G	G	A	A	A	A	C	G	C	T	T	T	C	A			<i>sigL</i>	Represión (h)	<b>+572</b>
<i>B. subtilis</i>		T	T	G	A	A	A	T	G	A	A	T	C	G	T	T		<i>cydA</i>	Represión (h)	<b>-215</b>
<i>B. subtilis</i>		T	G	A	A	A	G	C	G	C	T	T	T	A	T			<i>acoR</i>	Represión (f)	<b>-27</b>
<i>B. subtilis</i>		T	G	A	A	A	A	C	G	C	T	T	T	A	T			<i>acuA</i>	Represión (f)	<b>-26</b>
<i>B. subtilis</i>		T	G	T	A	A	G	C	G	T	T	T	T	A	A			<i>gmuB</i>	Represión (f)	<b>+6</b>
<i>B. subtilis</i>		T	T	A	A	A	G	C	G	C	T	T	T	C	A			<i>yvfK</i>	Represión (f)	<b>+5</b>
<i>B. subtilis</i>		T	G	A	A	A	A	C	G	C	T	T	T	A	A	C		<i>levD</i>	Represión (f)	<b>-45</b>
<i>B. subtilis</i>		T	G	A	A	A	G	C	G	T	T	T	T	A	G			<i>mleN</i>	Represión (f)	<b>+21</b>

Microorganismo	Secuencias CRE posibles														Gen	Regulación	Posición (i)			
<i>C. perfringens</i> Cepa 13	A	A	T	G	A	A	A	A	T	G	T	T	T	A	C	T	T	<i>pfoA</i>	Represión (g)	<b>+169 (-131)</b>
<i>C. perfringens</i> Cepa 13		T	G	T	T	A	A	T	C	G	T	T	A	T	C	A	A	<i>plc</i>	Represión (g)	<b>+14 (-53)</b>
<i>C. perfringens</i> Cepa 13	T	T	T	G	A	A	A	A	C	G	A	T	C	C	A	G	T	<i>virX</i>	nd	<b>&lt;+50</b>
<i>C. perfringens</i> Cepa 13	A	T	T	G	A	A	A	A	C	G	T	T	T	G	T	A	G	<i>virT</i>	nd	<b>-27</b>
<i>C. perfringens</i> Cepa 13	T	A	T	T	A	T	A	C	C	G	A	T	T	C	G	T	T	<i>virU</i>	nd	<b>+114</b>
<i>C. perfringens</i> Cepa 13		T	G	A	T	A	C	A	C	G	C	C	T	T	T	T	T	<i>virI</i>	nd	<b>-92</b>
<i>C. perfringens</i> Cepa 13		G	A	G	A	A	T	A	C	G	A	T	A	C	A	T	C	<i>pilT</i>	Represión (g)	<b>+207</b>
<i>C. perfringens</i> Cepa 13		T	A	G	A	T	T	A	C	G	A	T	A	C	C	A		<i>pilD</i>	Represión (g)	<b>+343</b>
<i>C. perfringens</i> Cepa 13		T	G	G	A	A	A	A	A	G	T	T	T	T	C	T		<i>pilB</i>	Represión (g)	<b>+245</b>
<i>C. perfringens</i> Cepa 13		T	G	G	A	T	A	A	A	G	T	T	T	T	A	A	T	CPE1563	nd	<b>+31</b>

En negro se marca a los nucleótidos de guanina (G) altamente conservados en las secuencias CRE de distintos microorganismo y en las secuencias consenso obtenidas de análisis de secuencias. En gris se muestran los nucleótidos conservados en menor extensión entre las distintas secuencias reportadas y halladas en este trabajo, pero que son considerados como conservados en las secuencias consenso CRE.

- (a) Antunes, 2012.  
 (b) Abdou, 2008.  
 (c) Yu, 2007.  
 (d) Li, 2010.  
 (e) Crooke, 2013.  
 (f) Marciniak, 2012.  
 (g) Este trabajo.  
 (h) Fujita, 2009.  
 (i) Posición contada desde el sitio de inicio de la transcripción o desde el primer nucleótido del codón de inicio (número en negrita) hasta la G conservada central de la secuencia CRE.  
 nd, no determinado.

Las cajas CRE son pseudo-palíndromes altamente degenerados con nucleótidos altamente conservados (Miwa, Y. et al., 2000; Abdou, L. et al., 2008; Fujita, Y., 2009, Antunes, A. et al., 2012; Marciniak, B. et al., 2012; Crooke, A. K. et al., 2013). Se observa que en las secuencias consenso CRE reportadas para *B. subtilis* y *C. difficile*, existen dos guaninas (G) conservadas, una hacia el extremo 5' y otra central (en negro, Tabla 5). Para el caso de las secuencias consenso de *B. subtilis* (CRE<sub>BS</sub>) además, están altamente conservados: una timina (T) 5' de la G conservada 5', una citosina (C) 5' de la G central y una C en el extremo 3' (en gris, Tabla 5). Para el caso de la secuencias consenso de *C. difficile* (CRE<sub>CD</sub>) además de las G conservadas, se mantiene la C del extremo 3' (en gris, Tabla 5). A pesar de lo mencionado CRE<sub>CD</sub> tiene un limitada similitud a CRE<sub>BS</sub>. Estas diferencias podrían explicarse por el hecho de que el dominio hélice-curva-hélice (hélix-turn-helix, HTH) de CcpA de *C. difficile* tiene una homología de solo el 47% comparado con el de *B. subtilis* (Antunes, A. et al., 2012). Se muestra en la Tabla 5 que para el caso de *B. subtilis*, así como para otros *Firmicutes*: *C. acetobutylicum*, *C. cellulolyticum*, *C. difficile* y *Staphylococcus aureus*, existen secuencias regulatorias CRE que no poseen algunos de los nucleótidos conservados; si bien la G central se conserva en todas las secuencias analizadas. La posición en la que se encuentran las secuencias CRE es variable en los distintos genes y se ha reportado que las diferentes secuencias tienen distinta afinidad por CcpA en el caso *B. subtilis* (Marciniak, B. et al., 2012).

Cuando se analizó la región promotora de *pfoA*, se encontró una secuencia posible CRE (ATGAAAATGTTTACTT) ubicada 169 pares de bases corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción (Tabla 5 y Figura 31). La cual difiere de la secuencia consenso CRE<sub>CD</sub> en las bases subrayadas y de la secuencia CRE<sub>BS</sub> en la base T en itálica (T en lugar de G, ver Tabla 5). Antunes y colaboradores (2012) mencionan el hallazgo de una secuencia tipo CRE<sub>CD</sub> en la región regulatoria de *pfoA* de *C. perfringens*, si bien no detallan la secuencia (Antunes, A et al., 2012). Si se analiza la ubicación de esta posible secuencia CRE, se puede concluir que de unir CcpA, este regulador estaría inhibiendo la expresión de *pfoA* debido a que se ubica entre el sitio de inicio de la transcripción y delante del codón de inicio de la traducción (ATG, -131, Tabla 5 y Figura 31).

Se estudió también las regiones promotoras de los genes *virR*, *virU* y *virT*, ya que los productos de estos genes regulan la actividad de *pfoA*. Para el caso de *virU*, se encontró solo una secuencia con similitud a consensos CRE ubicada en la posición

114 a partir del sitio de inicio de la transcripción. Se encuentra dentro de la región codificante como es el caso de la secuencia CRE de *sigL* de *B. subtilis* (Tabla 5). Posee la secuencia ATTATACCGATTCGTT la cual discrepa de las secuencias consenso por no poseer la G conservada en el extremo 5' y la C conservada del extremo 3' (se subraya el core CG conservado en *B. subtilis*). Sin embargo, si consideramos el caso de *cydA* de *B. subtilis* (Tabla 5), la secuencia CRE reguladora solo posee conservada la G central y posee el arreglo CG a 3 bases a la derecha de la G conservada como se observa para el caso de CRE<sub>virU</sub> (Tabla 5 y Figura 31). *virU* podría estar regulado por CcpA a través de un bloqueo de la transcripción una vez iniciada (Figura 31) (Choi, S. K. y Saier, M. H., 2005). *virT* presenta la secuencia TTGAAAACCGTTTGTAGA (Tabla 5), la cual presenta las regiones más conservadas TG 5' y CG central (subrayadas) encontradas en CRE<sub>BS</sub>, pero no presenta la C 3' conservada; sin embargo, hay secuencias CRE que no poseen esta C, como ser la de los genes: *acoR*, *acuA*, *gmuB*, *levD* y *mleN* de *B. subtilis*, y *cipC* de *C. cellulolyticum*. Esta secuencia se posiciona en la región regulatoria de *virT* solapándose en su extremo 5' con la secuencia -35 del gen (Figura 31). De lo expuesto es probable que *virT* sea regulado por CcpA, y la regulación sería negativa por la ubicación de la secuencia CRE. *virR* no presentó secuencia similar a las consenso CRE utilizadas para el estudio (Tabla 5).

La regulación de PFO por CcpA sería entonces directa a través de inhibición de la expresión de *pfoA* e indirecta actuando, posiblemente, sobre la transcripción de *virT* y *virU*. VirU es un ARN activador de *pfoA*, por lo que la represión de *virU* por CcpA (en CCR) disminuiría la expresión de *pfoA* (Capítulo Segundo). Por otro lado, VirT es un regulador negativo de *pfoA*, por lo que la represión de VirT por CcpA tendería a aumentar la transcripción de *pfoA*. Sin embargo, como *pfoA* es directamente inhibido por CcpA e indirectamente a través de VirU, en presencia de glucosa u otra fuente de carbono rápidamente metabolizable, la expresión de PFO sería disminuída, explicando el efecto observado en condiciones de CCR y descrito en el Capítulo Segundo. Este escenario cambia en el caso de la mutante en CcpA (KO13), la cual expresa una mayor cantidad de toxina PFO aún en presencia de glucosa comparado con la cepa salvaje (Cepa 13) (Capítulo Segundo). Esto podría explicarse suponiendo que CcpA podría unirse débilmente a las secuencias tipo CRE aún en su forma inactiva, en ausencia de azúcares. En la cepa KO13, al no estar CcpA, *pfoA* y *virU* (activador de *pfoA*) no serían influenciados negativamente por una unión “inespecífica” de CcpA, lo que podría explicar el aumento de la expresión de *pfoA*. Por otro lado, en la mutante *ccpA* KO13

*virT* aumentaría su expresión al no estar presente CcpA, lo que plantearía una incongruencia ya que VirT regula negativamente a *pfoA*. Sin embargo, no se puede concluir sobre la actividad del sistema VirR/S en condiciones de CCR en la cepa salvaje y que ocurre con este sistema en la cepa mutante en CcpA tanto en CCR como en ausencia de la misma.

### ***pfoA***

GAAAAAATTTAGTGGATTCAAATTCATAAATGGAACATATTATAATTGGAAT**CCCAGTTTATT****CACGATT**  
 AAAGC**CCCAGTTT**CTG**CAC**AAAAGTATTGAATGAGATTATTTCTCTGATATATTAAAGGGT**A**CTTATTACAAATGA  
 ATATTAAGTGAATATTTTCTGAACTGAATTTTAACTTTAGAGAGAGTTTAGGGAAAAGAAAAATTAGAGTTT  
 ATTTAAGCTATGTTTACTCAAAAAATAATGTTCTTAAGATAACCTTAACTCTTAAGATTTACTAAAAAGTTAA  
ATGAAAATGTTTACTTGAAGTTCAAAAAATAAAGTCTTTTAAACCCTATTAAGTTTTTAAAGTTTAAAAGCAG  
 TATAAAGTTTTTTAGGATTTATGAGCTTAATAAATGAGGGGAAAATTAATAAAGGGGGATTTATATTATGATA

### ***virU***

TTTG**CCCA**TTTATT**CA**TAAAAATATG**CCAGTTT**TA**CAC**ATGTAAATTGAATAATTTAAAAATAAATGCAAGAAAT  
 ATATTT**A**ATAACCTTAAAGAAAAGGAGCTTTGATATGAAAGACGAAAATATTAATATAAAATACCAAATAAA  
 +1  
 GTTAATTTAATTTTTATCATATTAGTAACAATATCATTTTTTATTATACCGATTTCGTTTTTGATAGAAATGGTA  
 ATCTATTATCCTTAAACTACATATTAATATATTTTTGTAGTT

### ***virT***

TTG**CCCAGTTT**TAA**CA**TAAAAAATG**CCAGTTT**ATG**CAC**CTCATTGAAACGTTTGTAAGAATTGCTATATAATC  
 TATT**T**AAAAACATATATGATT  
 +1

Figura 31: Secuencia de las regiones promotoras de los genes *pfoA*, *virU* y *virT* de *C. perfringens* Cepa 13 (gangrena gaseosa). Con una línea ondulada y en negrita se indican las secuencias tipo CRE identificadas por análisis de secuencia con el programa DNAMAN. En negrita y con líneas de puntos se marca las cajas para la unión de VirR. Con recuadros se muestran los sitios -35 y -10. En mayor tamaño y negrita se resalta el nucleótido +1 correspondiente al sitio de inicio de la transcripción. Para *pfoA* se señala subrayado el sitio de unión a ribosoma (RBS) y el codón de inicio de la traducción ATG (en gris).

### 6.1.2. Regulación de la expresión de *plc* por CcpA.

El gen *plc* es regulado por el sistema VirR/S a través de Vrr y de manera independiente de VirR/S mediante VirX (Figura 30). Debido a que la represión de *plc* por fuentes de carbono rápidamente metabolizables depende de CcpA, se realizó una búsqueda de secuencias tipo CRE en las regiones promotoras de los genes: *plc*, *vrr* y *virX* (*virR* no presenta secuencia tipo CRE, ver Sección anterior). Se procedió de igual manera que para el caso de la perfringolisina O (Sección 6.1.1). *plc* presenta en su región promotora, en la posición 14 a partir del sitio de inicio de la transcripción, una secuencia similar a CRE (TGTTAATCGTTATCA) (Tabla 5 y Figura 32). Conserva la CG central y C 3' (subrayadas) comparado con las secuencias consenso CRE reportadas (Tabla 5), además presenta porciones palindrómicas en su secuencia (Figura 32, flechas). Sin embargo, no posee la G conservada en la posición consenso en el extremo 5' (corrida una base a la izquierda). Los genes *yvfK* y *cydA* de *B. subtilis* que son reprimidos por CcpA tienen secuencias CRE regulatorias (TTAAAGCGCTTTCA y TTGAAATGAATCGTT, respectivamente) que también carecen de la G 5' conservada en la posición consenso, mostrado en itálica en las secuencias (se subraya nucleótidos conservados) (Marciniak, B. et al., 2012). Considerando la posición en la región promotora y el grado de similitud de esta secuencia CRE propuesta con las reportadas en la bibliografía (Abdou, L. et al., 2008; Fujita, Y., 2009; Antunes, A. et al., 2012; Marciniak, B. et al., 2012; Crooke, A. K. et al., 2013), sería posible que *plc* fuera regulado por CcpA. El gen *vrr* no presentó secuencia consenso CRE que pueda evidenciarse empleando los consensos conocidos. En el caso de *virX*, este muestra una secuencia tipo CRE (TTGAAAACGATCCAGTT), la cual cumple con el consenso propuesto por Crooke y colaboradores (2013) a excepción de los nucleótidos en itálica los cuales deberían ser CT o CA en lugar de AG (Tabla 5); subrayado se indica las bases conservadas. Esta secuencia se encuentra dentro de la región codificante de *virX* a más de 50 pares de base del sitio de inicio de la transcripción. VirX regula varios genes de toxinas incluyendo *plc*, podría ser factible que sea regulado por CcpA a partir de la secuencia CRE propuesta (Tabla 5) u otra no identificada. De ser posible, *plc* también sería reprimida por CcpA de manera indirecta, al ser inhibido VirX. Por lo tanto, la represión catabólica por carbono de PLC podría deberse a la inhibición de la expresión de *plc* por CcpA (Figura 32) de forma directa o mediada por la inhibición de *virX*, de acuerdo con las secuencias posibles CRE halladas.

***plc***

TTAAATTAACAAACAAGATTTAACTTATTATAGCACTAATAATTGTAAATTTTCATATTAACAAATAAGTTTAA  
 CAATTTAGAGTGGGTAAGGTTAGATGTGTTTAATTGAAATTTGAATTGTATTCAAAAATATTTTAAAAAATAT  
 TCAAAAATTTAAGTGAGGTTATGGTAATTATATGGTATAAATTTTCAGT**G**CAAG**TGTTAATCGTTATCA**AAAAAGG  
 +1 → → ← ←  
 GGAGATTAATACTTGAAAAAAATAACGGGGGATATAAAAATGAAAAGAAAGATTTGTAAG

Figura 32: Región promotora de *plc* de *C. perfringens* Cepa 13. Con una línea ondulada y en negrita se indica la secuencia tipo CRE identificada por análisis de secuencia con el programa DNAMAN. Con recuadros se muestran los sitios -35 y -10. En mayor tamaño y en negrita se resalta el nucleótido +1 correspondiente al sitio de inicio de la transcripción. Se señala subrayado el sitio de unión a ribosoma (RBS) y el codón de inicio de la traducción ATG (en gris). Con flechas se marcan las regiones palindrómicas.

### 6.1.3. Control por CcpA de reguladores globales de la producción de toxinas dependientes de la densidad celular en *C. perfringens*.

Los sistemas de sensado de la densidad celular mediados por la acumulación de péptido regulatorio (secuencia amioacídica madura deducida TSACLWFT) y AI-2, dependiente de los productos de los genes *agrBD* y *luxS*, respectivamente, son importantes para la producción de las toxinas PLC y PFO en *C. perfringens* (Ohtani, K. et al., 2002; Ohtani, K. et al., 2009). Se estudió entonces si estos sistemas podrían ser regulados por CcpA y de esta manera mediar el efecto represor de los azúcares sobre la expresión de los genes *plc* y *pfoA*. Para ello se realizó la búsqueda de secuencia tipo CRE (Tabla 5) en las regiones génicas que contienen a *agrB*, *agrD* y *luxS* en *C. perfringens* Cepa 13. De este análisis surgió la secuencia TGGATAAAAGTTTAAAT (subrayado se muestra las G conservadas), la cual es similar al consenso CRE reportado para *C. difficile* con la discrepancia de que carece de la C en el extremo 3' y donde debería haber una adenina (A) hay una timina (T), mostrado en itálica en la secuencia anterior (Tabla 5). Esta posible CRE se encuentra al inicio del gen CPE1563, cuyo promotor dirige la expresión de *agrB* y *agrD*. La unión de CcpA afectaría la transcripción del operón CPE1563-CPE1562-*agrB*-*agrD*, ya que la secuencia tipo CRE

se encuentra a 31 pares de bases del sitio de inicio de la traducción de CPE1563, interfiriendo con el avance de ARN polimerasa y evitando la expresión completa del operón (Choi, S. K. y Saier, M. H., 2005). De esta manera CcpA podría mediar la represión de *plc* y *pfoA* mediante la inhibición del sistema AgrBD (Ohtani, K. et al., 2009). Para el caso de LuxS no se encontraron secuencias tipo CRE que pudieran sugerir una regulación directa de *luxS* o del operón que contiene a este gen (Sección 1.4.3., Figura 10).

## 6.2. Regulación de los genes para la biosíntesis del T4P.

Tanto la biosíntesis como la funcionalidad del pili tipo IV es altamente y complejamente regulada en los diversos microorganismos que utilizan este pili. En el caso de *P. aeruginosa*, así como en el de muchas otras bacterias que expresan T4P, la transcripción de la principal pilina, PilA, es finamente controlada por un clásico sistema de dos componentes, dependiente del factor sigma alternativo RpoN ( $\sigma^{54}$ ), PilS/PilR. PilS es una proteína con un dominio transembrana que se encuentra localizada en ambos polos de la célula. La autofosforilación de PilS y la posterior fosforilación del regulador de respuesta PilR aumentan la transcripción de *pilA* (Figura 33A). La señal sensada por PilS no ha sido determinada de manera inequívoca, pero podría ser la misma PilA. Esto se deduce de experimentos donde se modifica la concentración de PilA en la membrana interna. En una mutante en PilB, PilA se acumula debido a que no puede polimerizarse, observándose una reducción en la transcripción de *pilA*. En una cepa mutante en PilT, donde las reservas de PilA son agotadas ya que no hay despolimerización que se oponga a la acción de PilB, la expresión de *pilA* es activada. La habilidad de PilS de responder a los cambios en los niveles de PilA, podría deberse a su capacidad de interactuar directamente con PilA. Esta interacción proteína-proteína se daría entre la región hidrofóbica N-terminal muy conservada embebida en la membrana de PilA y los segmentos transmembrana de PilS. Esta hipótesis se sustenta en el hecho de que idénticas proteínas PilS de cepas divergentes de *P. aeruginosa*, controlan pilinas con extremos C-terminales muy diferentes. Los genes *pilS* y *pilR* se encuentran dentro de un locus que comprenden un gran número de genes *pil* (Figura 34). Por otro lado, la movilidad tipo twitching dependiente de T4P es también controlada por un sistema atípico de sensor-regulador FimS/AlgR. FimS sería la quinasa sensora, pero carece de

dominio de autofosforilación, y AlgR sería el regulador de respuesta. FimS (AlgZ) y AlgR no afectan la expresión de PilA, pero estarían regulando en algún punto la funcionalidad del pili ya que tanto una mutante en FimS como en AlgR carecen de T4P extracelular (Figura 33A). La fosforilación de AlgR conduce a la activación directa del operón *fimU-pilVWXYZIY2E*, el cual es necesario para el ensamblado y la exportación de un T4P funcional (Figura 34) (Belete, B. et al., 2008). El factor sigma alternativo AlgU ( $\sigma^{22}$ ) que controla la síntesis de alginato, también modula la movilidad tipo twitching indirectamente. AlgU regula la expresión de la lectina LecB, la cual es requerida para la expresión de PilJ (Figura 34), y PilJ controla la biogénesis del pili. FimS parece ser incapaz de autofosforilarse debido a que no cuenta con un dominio de autofosforilación, por lo que podría ser fosforilada por una vía de señalización superior, o podría ser que su función sea desfosforilar a AlgR, el cual sería fosforilado por otra vía (Mattick, J. S., 2002; Burrows, L. L., 2012). Si bien la regulación directa de la transcripción de la principal pilina es un hecho relativamente esperable que controlaría la síntesis del T4P, la regulación del ensamblado es mucho más compleja, comprendiendo un gran número de componentes. En investigaciones tempranas sobre la biosíntesis del pili en *P. aeruginosa*, se identificó un sistema quimiotáctico específico para el T4P (Pil-Chp) compuesto por proteínas que compartían similitudes con aquellas del sistema quimiotáctico flagelar de *E. coli*. Aunque el sistema Pil-Chp tiene homólogos identificables a muchas proteínas Che, el mecanismo de extensión-retracción del motor del pili es claramente diferente del motor rotacional del flagelo. El sistema Pil-Chp tiene solo una proteína quimiotáctica aceptora de metilos (metil-accepting chemotaxis protein, MCP), PilJ (Figura 34), localizada en ambos polos celulares. PilI es un homólogo de CheW y ChpA (PilL) es uno de los más complejos homólogos de CheA hasta la actualidad descritos, conteniendo un dominio histidin quinasa, 8 posibles sitios de fosfotransferencia (His, Ser y Thr) y un dominio receptor tipo CheY en su extremo C-terminal. Hay dos reguladores tipo CheY, PilG y PilH, pero no hay homólogo a CheZ. *pilK* y *chpB* codificarían homólogos de CheR y CheB, respectivamente. ChpC sería un segundo homólogo de CheW que podría unir otras MCPs a ChpA (Figura 34) (Whitchurck, C. B. et al., 2004). Similares sistemas quimiotácticos pueden ser identificados en muchas otras bacterias del suelo, agua y asociadas a plantas que tienen T4P, tal como *Myxococcus*, *Xylella*, *Xanthomonas* y *Ralstonia*. Sin embargo, no todas las bacterias que expresan pili tipo IV codifican para este sistema. Patógenos como *Neisseria*, *Legionella* y *Vibrio* carecen de sistemas Pil-Chp. Un modelo propone que

ChpA actuaría fosforilando a PilG y/o PilH. PilG-P modularía a PilB haciendo que se produzca la extensión del pili por polimerización. PilH-P regularía a PilT provocando la retracción (Figura 33). Esta hipótesis es atractiva pero parece ser más compleja la regulación (Bertrand, J. J. et al., 2010; Burrows, L. L., 2012).

En *P. aeruginosa* el T4P así como otros factores de virulencia, es controlado en parte por una proteína que une AMP cíclico (cAMP) llamada Vfr (virulence factor regulator). El cAMP es sintetizado por dos adenilato ciclasas, CyaA y CyaB, siendo CyaB la que contribuye de manera principal al pool de cAMP celular. Se observó que mutaciones que afectaban la biosíntesis del pili (*pilG*, *pilI*, *pilJ*, *chpA*, *fimL*, *fimV*) reducen los niveles celulares de cAMP, de manera similar a lo observado en dobles mutantes en las adenilato ciclasa CyaA y CyaB, aún cuando los niveles de CyaB no eran afectados. En contraste, mutantes en *pilH*, *pilK* y *chpB* tienen altos niveles de cAMP conjuntamente con mayores niveles de pili superficial comparado con la cepa salvaje. A partir de este dato se propuso que PilG y PilH modularían la actividad de CyaB y por lo tanto la expresión de los genes dependientes de Vfr dentro de los cuales están *pilMNOPQ* (Figura 33A). Sin embargo, es aparente que el sistema Pil-Chp tiene efectos sobre la función del pili que son independientes del cAMP. FimV parece tener un rol dual en la biosíntesis del T4P consistente con su estructura de dos dominios. El N-terminal periplasmático se une al peptidoglicano y promueve la formación de la secretina PilQ en la membrana externa, y el C-terminal citoplasmático regula positivamente la función de CyaB (Whitchurck, C. B. et al., 2005; Burrows, L. L., 2012).

La regulación de la biosíntesis y funcionalidad del pili tipo IV en *P. aeruginosa* depende además de la proteínas PilZ y FimX involucradas en el metabolismo de diguanilatos monofosfatos cíclicos (c-di-GMP). PilZ en *P. aeruginosa* no une c-di-GMP a pesar de pertenecer a una familia de proteínas con dominio adaptador de unión a c-di-GMP; ortólogos a PilZ en otros sistemas T4P tienen diferencias estructurales críticas en sus N-terminales que a diferencia de PilZ les permiten unir c-di-GMP. Un estudio en *Xanthomonas* sugirió que PilZ junto a FimX podrían regular a PilB de forma dependiente de c-di-GMP. En *P. aeruginosa*, FimX es una fosfodiesterasa que une e hidroliza c-di-GMP. FimX posee un dominio tipo Che-Y, un dominio PAS-PAC como los que se encuentran en las proteínas involucradas en señalización, y dos dominios que intervienen en el metabolismo de c-di-GMP, lo cual hace suponer que FimX sensaría e integraría señales medioambientales relevantes a la movilidad twitching influenciando

la función del T4P (Figura 33A). FimX une c-di-GMP en su extremo C-terminal induciendo un cambio conformacional que se transmite al dominio N-terminal REC conduciendo esto a la ubicación polar de FimX (Jain, R. et al., 2012; Burrows, L. L., 2012). Los resultados sugieren que FimX permite el ensamblado del pili bajo condiciones de baja concentración intracelular de c-di-GMP. Sin embargo, FimX no sería necesaria en condiciones de altos niveles de c-di-GMP. La bacteria en biofilms (estado caracterizado por alto c-di-GMP), también parece no necesitar de FimX para ensamblar el T4P. Si el pili tipo IV puede ser ensamblado en ausencia de FimX, en que condición es importante esta proteína. Aparentemente FimX sería necesario durante la transición líquido-superficie cuando el pili se ubica polarmente. Cuando *P. aeruginosa* crece en medio líquido, la concentración de c-di-GMP es muy baja pero se incrementa cuando la bacteria se cultiva en superficie. FimX uniría c-di-GMP en medio líquido localizándose en un polo de la célula donde el T4P media activamente el twitching (Figura 33A). Por lo que FimX permitiría la ubicación espacio-temporal del pili en el polo celular (Jain, R. et al., 2012).

En el caso de *M. xanthus*, la expresión de PilA es negativamente regulada por la acumulación de pilina intracelular en el extremo final de la célula, lo cual sería sentido por el sistema de dos componentes PilS/PilR. Cuando se detecta que no hay pilina sin ensamblar, PilS aumenta la actividad de PilR fosforilándolo, incrementando este regulador de respuesta la expresión de *pilA* (Figura 33B). PilS reconocería directamente el extremo N-terminal de PilA como en el caso de *P. aeruginosa*, ya que mutaciones puntuales en el N-terminal conservado, las cuales no afectan la estabilidad de la pilina, desregulan la expresión de *pilA* (Jelsbak, L. y Kaiser, D., 2005; Burrows, L. L., 2012). En el genoma de *M. xanthus*, *pilA* se encuentra dentro de un grupo de 14 genes *pil* (Figura 34). Dentro de este conjunto de genes se encuentran dos sistemas de dos componentes, *pilS/pilR* y *pilS2/pilR2* (Figura 34). Poco se sabe de estos reguladores excepto que *pilR* es necesario para la expresión de *pilA* y un mutante knockout en *pilR2* es incapaz de desplazarse por swarming (Jelsbak, L. y Kaiser, D., 2005).

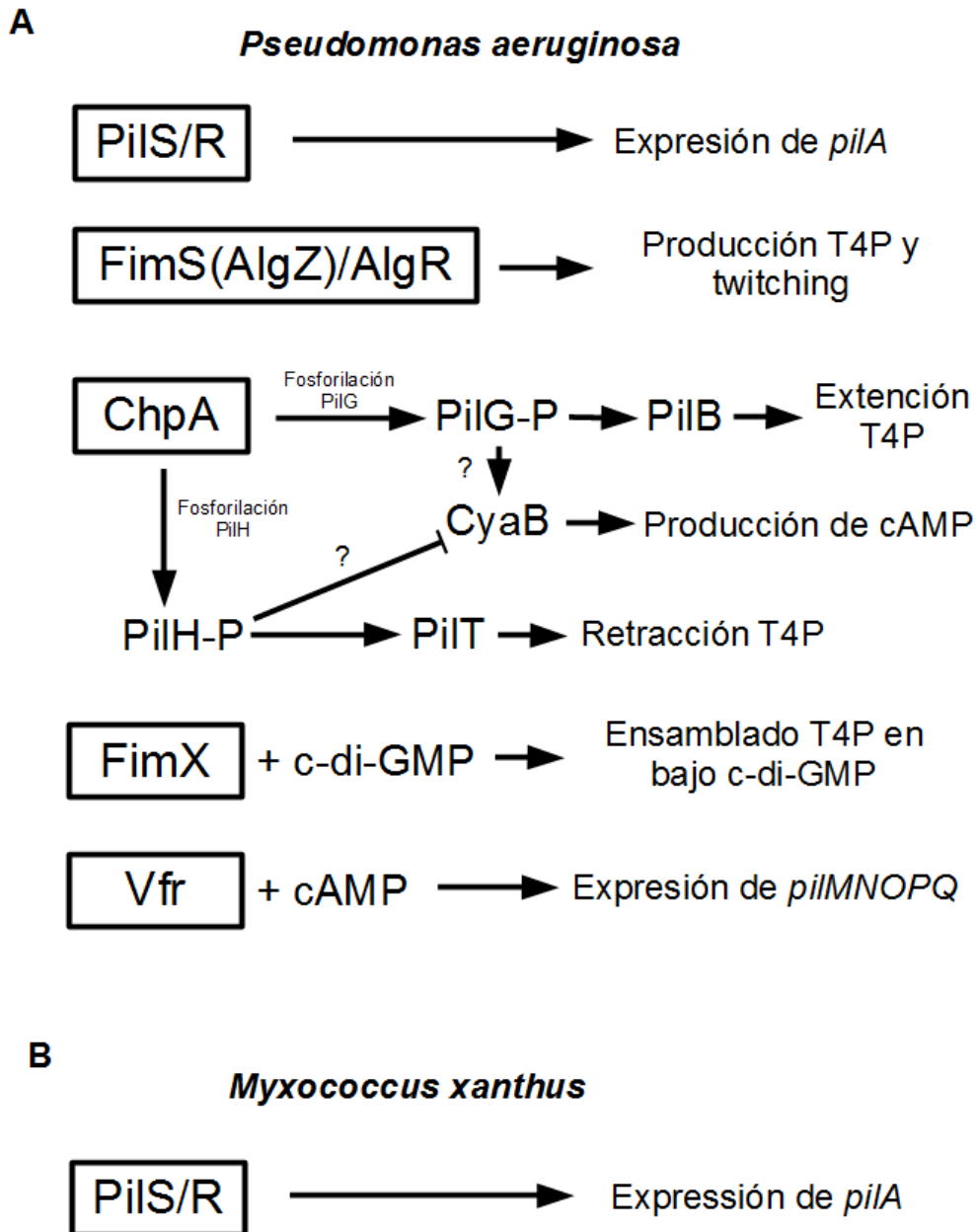


Figura 33: Regulación de la biosíntesis y funcionalidad del T4P. A) Sistemas regulatorios de la biosíntesis y funcionalidad del pili tipo IV en *P. aeruginosa*. PiIS/R es un sistema de dos componentes que modula la expresión de *pilA*. FimS(AlgZ)/AlgR es un sistema de dos componentes que regula la polimerización de PilA, afectando la producción de T4P y la movilidad tipo twitching. ChpA influencia mediante fosforilación las actividades de PilG y PilH, quienes regulan finalmente la función de PilB y PilT, respectivamente. PilB polimeriza PilA extendiendo el pili y PilT conduce la despolimerización de la pilina dando lugar a la retracción del T4P. Se postula que PilG y PilH modularían la actividad de la adenilato ciclasa CyaB (PilG-P activaría y PilH-P reprimiría). Vfr une cAMP y regula la expresión de varios genes para la biosíntesis del pili (*pilMNOPQ*). B) En *M. xanthus*, la expresión de *pilA* está regulada por el sistema de dos componentes PiIR/S.

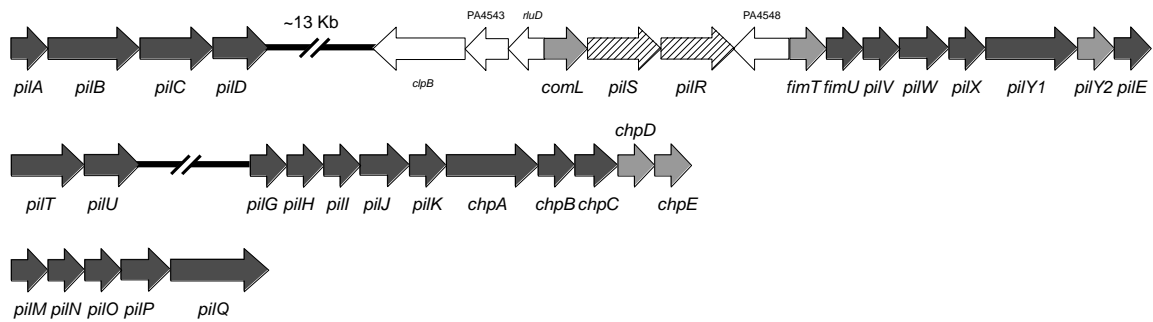
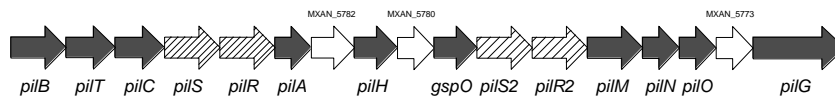
*Pseudomonas aeruginosa* PAO1*Myxococcus xanthus* DK 1622

Figura 34: Locus génico para la biosíntesis del T4P en *P. aeruginosa* y *M. xanthus*. En gris oscuro se muestra los genes para la producción del pili tipo IV; con rayas diagonales los genes *pilS* y *pilR* que regulan la síntesis de *pilA*. En gris claro están los genes asociados a los operones *pil* (*P. aeruginosa*) pero que carecen de fenotipos asociados al pili. En blanco están los genes no caracterizados o no relacionados con la síntesis del pili. El tamaño de las flechas no representa exactamente la relación de tamaños de los genes. Solo se muestra esquemáticamente el arreglo de genes y su orientación, no se grafica la distancia entre ellos (en *P. aeruginosa* PAO1 se esquematizan las regiones que separan los grupos de genes involucrados en la síntesis del pili). Datos obtenidos de *P. aeruginosa* PAO1 NCBI Reference Sequence NC\_002516.2 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/187?project\\_id=57945](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/187?project_id=57945) y Burrows, L. L., 2012); y *M. xanthus* DK1622, NCBI Reference Sequence NC\_008095.1 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1120?project\\_id=58003](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1120?project_id=58003)).

La biosíntesis del pili está regulada principalmente a dos niveles, la producción de la pilina y la polimerización de la misma (Mattick, J. S., 2002; Jelsbak, L. y Kaiser, D., 2005; Bertrand, J. J. et al., 2010; Jain, R. et al., 2012; Burrows, L. L., 2012). Para explorar la regulación del T4P por CcpA en el patógeno causante de la gangrena gaseosa, *C. perfringens*, se estudió que ocurre con la expresión de *pilA* y con la polimerización y despolimerización de la pilina PilA en condiciones de CCR. En el caso de *C. perfringens* no parece haber sistema de dos componentes asociado a las operones que codifican para los genes *pil*. Por otro lado, *C. perfringens* no posee aparentemente sistemas quimiotácticos homólogos a Che de acuerdo con los datos arrojados de la secuenciación de distintas cepas de este microorganismo (Figura 9, Myers, G. S. et al.,

2006; Varga, J. J. et al., 2006). Por lo que una regulación del tipo PilS/R (*P. aeruginosa* y *M. xanthus*, Figura 33) y quimiotáctica tipo Chp (*P. aeruginosa*, Figura 33) no tendrían sus correspondientes en *C. perfringens*. Sin embargo, se realizó una búsqueda informática de homólogos a PilS y a PilR mediante la realización de un BLASTP, obteniéndose homologías a cajas de quinasa sensoras de proteínas presumiblemente pertenecientes a sistemas de dos componentes en la Cepa 13 de *C. perfringens*, pero ninguno de ellos en particular podría suponerse, a priori, ser responsable de la regulación del pili tipo IV. PilS de *M. xanthus* presenta su mayor homología (43 %) con el gen CPE1757 de *C. perfringens* Cepa 13, no encontrándose asociado un gen con homología a regulador de respuesta. En cuanto a PilS de *P. aeruginosa* presenta homología (51 %) a *virJ* (CPE2098), perteneciente a sistema de dos componentes designado VirI/J, al cual se describe como un novedoso sistema de dos componentes involucrado con el apagado de la producción de toxinas extracelulares (EMBL/GenBank/DDBJ databases: BAA78773.1 and BAA78774.1; Connan, C. et al., 2012). PilR tanto de *M. xanthus* como de *P. aeruginosa* presentan homologías del 60 y 64 %, respectivamente, a CPE2358, que está clasificado como un regulador transcripcional dependiente de sigma L en *C. perfringens* Cepa 13. CPE2358 no posee un gen codificante de una quinasa sensora adyacente, sin embargo, CPE2363 codificaría para una quinasa sensora si bien su orientación de transcripción es opuesta. CPE2358 no se encuentra cerca de operones para la biosíntesis de T4P. Se buscó también homologías a PilG y PilH de *P. aeruginosa*, encontrándose homología con muchos reguladores de respuesta. De nuestro análisis se identificó a CPE0119, CPE0236, CPE0642, CPE1193, CPE1925, CPE2099 (*virI*), CPE2332, CPE2487, CPE2488, para el caso de PilG; y a CPE0119, CPE0236, CPE0457, CPE0642, CPE0840, CPE0895, CPE1925, CPE2099 (*virI*), CPE 2488, para el caso de PilH. La mayoría de ellos forman parte de un sistema de dos componentes, sin embargo no hay indicios en la literatura de asociación con el pili tipo IV. Se analizó además, para el caso de FimX (Figura 33) de *P. aeruginosa*, si existen homólogos en *C. perfringens*, encontrándose una diguanilato ciclasa, CPE1560, con una similaridad del 49 %. El gen CPE1560 forma parte del operón que codifica para el sistema AgrBD. Siendo el comienzo de este gen (CPE1560) el codificante de AgrD, que luego es procesado por AgrB dando como resultado el péptido regulatorio (Ohtani, K. et al., 2009; Sección 6.1.).

### 6.2.1. Regulación por CcpA del pili tipo IV en *C. perfringens*.

Se procedió a analizar las regiones genómicas circundantes de los genes *pilT*, *pilB*, *pilA1* y *pilD* (Figura 35) para determinar si existían secuencias tipo CRE que pudieran regular la expresión de algunos de los genes *pil* mediante CcpA. Para ello se empleó el programa DNAMAN y secuencias consenso CRE reportadas en la bibliografía, Tabla 5 (Yu, Y. et al., 2007; Abdou, L. et al., 2008; Fujita, Y., 2009; Li, C. et al., 2010; Antunes, A. et al., 2012; Marciniak, B. et al., 2012; Crooke, A. K. et al., 2013). Este grupo de genes se mostró estar regulado por glucosa en la Cepa 13 (*pilB* es reprimido por glucosa, dato no mostrado), a excepción de *pilA1* quién no mostró cambios en lo niveles de mensajero (Sección 4.4) ante el agregado de glucosa. En el caso de *pilB* y *pilD*, estos genes forman parte de operones de genes para la biosíntesis del T4P siendo sus promotores responsables de la transcripción de varios genes corriente abajo (Figura 35). Luego de realizado el estudio, se pudo identificar dos posible secuencias CRE: en *pilT* (GAGAATACGATACATC, subrayado las bases conservadas en los consensos, Tabla 5) y en *pilD* (TAGATTACGATACCCA, subrayado los nucleótidos conservados, Tabla 5), que podrían ser utilizadas por CcpA para mediar la expresión de genes *pil* por fuentes de carbono rápidamente metabolizables. En el caso de CRE<sub>*pilT*</sub> la secuencia no posee conservada la C en el extremo 3' en la misma posición. Además, se aparta de la secuencia consenso para *C. difficile* en que no conserva las poli A y poli T adyacentes a la G central (ver Tabla 5). CRE<sub>*pilD*</sub> conserva la C 5', la CG central y la C 3' (subrayadas) pero difiere en otros nucleótidos de los consensos reportados: presenta A en lugar de T adyacente a la G 5' conservada, y la adenina (A) o timina (T) que debería encontrarse luego de la C 3' conservada es reemplazada por una C (marcados en itálica en la secuencia arriba). Por otro lado, presenta TT entre la G 5' y la CG central conservadas en lugar de AA (en negrita en la secuencia arriba) generalmente observa en las secuencias CRE reportadas (Tabla 5). *pilB* muestra una secuencia (TGGAAAAAGTTTTTCT, subrayadas las G conservadas en los consensos, Tabla 5) que respeta a CRE<sub>CD</sub> (RRGAAAANGTTTTTCWW, donde R es A o G y W es A o T, Tabla 5) a excepción de la C conservada en la posición 3', en donde se observa una C corrida una base a la derecha (marcada en itálica); y la T inicial (itálica) que debería ser A o G. Para *pilA1*, no se encontraron secuencias tipo CRE en su región promotora, ni dentro del gen.

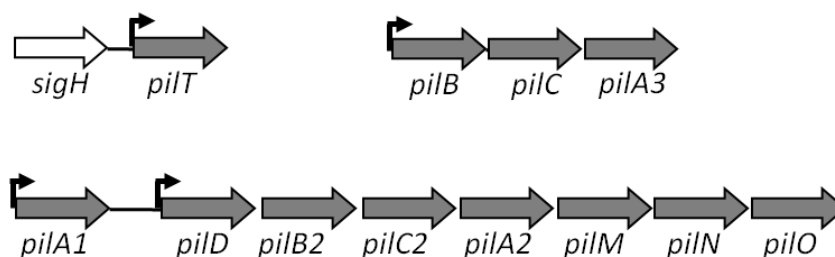


Figura 35: Arreglo de genes *pil* en el cromosoma de *C. perfringens* Cepa 13 causante de la gangrena gaseosa. Las flechas negras indican los promotores de los genes y operones de acuerdo a lo reportado por Varga J. J. y colaboradores, 2006.

Se analizó, además, utilizando de programa DNAMAN, la presencia de posibles secuencias CRE (Yu, Y. et al., 2007; Abdou, L. et al., 2008; Fujita, Y., 2009; Li, C. et al., 2010; Antunes, A. et al., 2012; Marciniak, B. et al., 2012; Crooke, A. K. et al., 2013) de los genes: *VirI* (CPE2099, Cepa 13), homólogo a PilG y PilH de *P. aeruginosa*, *VirJ* (CPE2098, Cepa 13), homólogo a PilS de *P. aeruginosa* y CPE1757 homólogo a PilS de *M. xanthus*. La búsqueda de secuencias tipo CRE en estos genes resultó en que solo *virI* presentaría una secuencia que se ajusta parcialmente a los consensos CRE reportados (TGATACACGCCTTTTT, se subraya el dinucleótido central conservado, Tabla 5). Esta secuencia no posee la C conservada 3' y las bases TG 5' se encuentran a 5 pares de bases y no a 4 de la CG central como se observa en las secuencias consenso (Tabla 5).

La regulación de T4P es muy compleja en los microorganismos en los cuales se ha estudiado con detalle. Esto es debido a que el pili es una estructura que está involucrada en muchos procesos y comportamientos bacterianos como movilidad, adherencia, formación de biofilms, incorporación de ADN exógeno, entre otras (Imam, S. et al, 2011). En *C. perfringens* podría tener un nivel de complejidad regulatorio similar a pesar de no contar con sistemas quimitácticos evidentes como en el caso mencionado de *P. aeruginosa* (Burrows, L. L., 2012). De lo analizado, solo *pilT*, *pilD* y *pilB* podrían ser blancos directos de la regulación por CcpA de acuerdo con la secuencias tipo CRE identificadas (Tabla 5), lo cual explicaría la reducción de la expresión de *pilD* y *pilT* observada (Figuras 20 y 21, Sección 4.4.). Debe realizarse, sin embargo, un estudio donde se evidencie la interacción directa de CcpA con estas secuencias CRE propuestas.

## **7. Discusión.**

## 7. Discusión.

La patogenia es un fenómeno que en microorganismos está estrechamente relacionado con comportamientos poblacionales determinados. Las conductas comunitarias en las bacterias patógenas, como movilidad sobre superficies, formación de biofilms, producción concertada de toxinas, entre otros, están fuertemente ligadas a incrementar el éxito de la invasión, la colonización y el establecimiento de patógeno en un hospedador determinado. La formación de células de enjambre (swarming) en *Proteus mirabilis* está directamente relacionada con la virulencia. En *C. septicum* la capacidad de diferenciarse en células hiperflageladas que realizan swarming le permite migraciones poblacionales rápidas y concertadas sobre superficies, siendo observado este fenómeno en tejido necrótico de intestino grueso; sugiriendo que la patogenicidad de este microorganismo puede estar asociada a esta capacidad de desplazamiento (Macfarlane, S. et al., 2001).

El estudio de las condiciones que afectan estos comportamientos sociales en microorganismos causantes de enfermedades podría conducir al desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de patologías severas que pueden ser inclusive fatales como es el caso de la gangrena gaseosa provocada por *C. perfringens*.

Este trabajo muestra varias contribuciones significativas a través del entendimiento de la fisiología y regulación de la movilidad tipo gliding y de la producción de toxinas relacionadas con los procesos gangrenosos en *C. perfringens*, determinando cómo estos fenómenos son influenciados por las condiciones del entorno circundante. Particularmente se analizó cómo las condiciones nutricionales (fuentes de carbono) repercuten sobre el gliding y la capacidad de producción de toxinas en *C. perfringens*.

Primeramente, se analizó la generalidad de la capacidad de desplazarse de un total de 17 cepas de *C. perfringens* aisladas de diferentes nichos y patologías (diarrea, intoxicación alimentaria por consumo de alimentos contaminados y mionecrosis) no solo de seres humanos sino también de origen animal (Tabla 1, Sección 3.1). Interesantemente, todas las cepas analizadas mostraron la capacidad de desplazarse sobre placa de agar mediante gliding social (Figuras 15 y 16, y dato no mostrado). Estos resultados consolidan y refuerzan la idea de que el gliding es una propiedad intrínseca de *C. perfringens*, independientemente del origen del aislado (Varga, J. J. et al., 2006).

El conocimiento actual de los factores medioambientales y metabólicos que controlan la locomoción asociada a superficies en bacterias patógenas es muy limitado.

Precisamente, la mayor contribución de este trabajo de tesis es la demostración de que la represión catabólica por carbono regula la movilidad tipo gliding en *C. perfringens*. De hecho, todos los aislados mostraron movilidad social gliding sobre placas de BHIA (sin complementación con glucosa), pero no sobre medio TGYA el cual contiene glucosa al 2 %, sugiriendo que la glucosa es capaz de inhibir el gliding. La remoción de la glucosa del medio TGYA permite a la células moverse, mientras que la adición de glucosa al medio BHIA provoca la inhibición del gliding, confirmando que la glucosa tiene un rol crucial en inhibición de la movilidad gliding (Figura 15 y dato no mostrado).

Además de la glucosa, la locomoción tipo gliding es también inhibida por otros azúcares rápidamente metabolizables, tal como fructosa, lactosa, sacarosa y galactosa (Figura 19). Este hallazgo confirmó que la represión del gliding fue debido a un proceso de represión catabólica general por carbono (Warner, J. B. y Lolkema, J., 2003). Interesantemente, dos carbohidratos complejos, la rafinosa y el almidón, se comportan de manera diferente que los azúcares simples: la rafinosa no inhibió la movilidad a ninguna de las concentraciones ensayadas, y el almidón solo inhibió el gliding a concentraciones de 2 % (Figura 19 y dato no mostrado). Estos resultados son consistentes con los hallazgos previamente reportados sobre otros comportamientos sociales, como la esporulación y la producción de la enterotoxina CPE, los cuales también fueron inhibidos por carbohidratos rápidamente metabolizables, tal como glucosa y lactosa (Varga, J. J. et al., 2004; Philippe, V. A. et al., 2006), mientras que los carbohidratos complejos rafinosa y almidón mostraron inducir ambos eventos (Labbe, R. et al., 1976; Labbe, R. y Rey, D., 1979).

Este trabajo demuestra que la represión catabólica por carbono de la movilidad tipo gliding en *C. perfringens* tiene lugar a través de la represión de genes involucrados en la biosíntesis y funcionalidad del T4P. Como se observa en las Figuras 21 y 22, la adición de glucosa 1 % a cultivos de la Cepa 13 y SM101, capaces de moverse por gliding, resulta en una dramática disminución de la expresión de *pilD-gusA*, *pilT-gusA*, así como de los niveles de mensajero de *pilA1*, *pilA2* y *pilT* (en el caso de la Cepa 13, *pilA1* parece no estar reprimido por glucosa). Para el caso de *pilD-gusA*, *pilT-gusA* la máxima reducción en la transcripción debida a la glucosa ocurre aproximadamente a las 24 h de crecimiento, lo cual coincide con la observación de que la movilidad gliding en placa de agar comienza solo después de 18 a 20 h de crecimiento (Figura 20 y dato no mostrado). En bacterias Gram-positivas de bajo contenido de G+C, la regulación catabólica por

carbono está bajo el control del factor de transcripción clave CcpA, un miembro de la familia LacI-GalR de reguladores transcripcionales (Warner, J. B. y Lolkema, J., 2003). Como se describió anteriormente (Sección 1.3), esta red utiliza transportadores de azúcares, enzimas glicolíticas, una proteína quinasa ATP-dependiente cuya activación depende de metabolito (HprK) y dos proteínas blanco de HprK: la fosfotransferasa Hpr y la homóloga a Hpr, Crh (Warner, J. B. y Lolkema, J., 2003; Schumacher, M. A. et al., 2007). Sin embargo, el rol central ha sido reservado para CcpA, el cual se une a secuencias de ADN presentes en las regiones regulatorias de sus genes blanco (Warner, J. B. y Lolkema, J., 2003; Lorca, G. L. et al., 2005; Puri-Taneja, A. et al., 2006; Schumacher, M. A. et al., 2007). Para la activación de la unión de CcpA a los elementos reguladores de la expresión en *cis*, es necesario, aunque no esencial (Lorca, G. L. et al., 2005; Puri-Taneja, A. et al., 2006; Schumacher, M. A. et al., 2007), que CcpA se una a la forma fosforilada de Hpr y/o Crh generadas por HprK (Warner, J. B. y Lolkema, J., 2003; Schumacher, M. A. et al., 2007). En *C. perfringens*, se presentan ortólogos de *ccpA*, *hpr* y *hprK* (pero no *crh*) en el cromosoma de todas las cepas secuenciadas, sugiriendo que los elementos básicos para la regulación catabólica mediada por CcpA están presentes en este patógeno (Warner, J. B. y Lolkema, J., 2003 y dato no mostrado). De hecho, este trabajo demostró que la represión del gliding por glucosa en *C. perfringens* fue mediada, en gran parte, por la acción de CcpA. Como se observa en la Figura 23, la inactivación de *ccpA* restaura significativamente la capacidad de desplazarse mediante gliding y la expresión de genes *pil* (Figuras 23 y 24) en presencia de glucosa. La reversión del fenotipo no deficiente en gliding de la cepa mutante en *ccpA* en presencia de glucosa se obtuvo luego de la introducción del plásmido pIH100 (Sección 3.5.2.), conteniendo una copia salvaje de *ccpA*, lo cual provee evidencia genética que soporta la relación entre la expresión de CcpA y la represión de la movilidad gliding en *C. perfringens* (dato no mostrado). Estos resultados sugieren que CcpA podría actuar como un regulador transcripcional de los genes para la biosíntesis del T4P. Por lo tanto, se realizó un estudio informático de las regiones reguladoras de genes para la biosíntesis del pili, surgiendo de este análisis que *pilT*, *pilB* y *pilD* poseerían secuencias tipo CRE de acuerdo con las secuencias reportadas que unen CcpA y las consenso CRE (Tabla 5) (Yu, Y. et al., 2007; Abdou, L. et al., 2008; Fujita, Y., 2009; Li, C. et al., 2010; Antunes, A. et al., 2012; Marciniak, B. et al., 2012; Crooke, A. K. et al., 2013). Estos hallazgos *in silico* deberán ser confirmados por ensayos *in vitro* como ser: análisis de modificaciones en el desplazamiento electroforético en gel (band

shift) y protección de nucleasas (DNase footprinting) por la unión de CcpA al ADN blanco. Puede indicarse, sin embargo, que por la ubicación de estas posibles secuencias CRE en *pilT*, *pilB* y *pilD*, la unión de CcpA podría reprimir la expresión de estos genes, lo que explicaría la CCR observada sobre la biosíntesis del T4P y la movilidad gliding en *C. perfringens* gangrenogénico. En un trabajo muy reciente, utilizando mutagénesis por inserción de transposon, se hallaron diversos genes necesarios para la movilidad gliding en *C. perfringens* Cepa 13 que no estarían relacionados con la biosíntesis o funcionalidad del T4P (Liu, H. et al., 2013). Estos genes estarían involucrados en otras funciones celulares como ser la partición y reparación del ADN, la síntesis de polisacáridos de superficie (genes *rfd* para la biosíntesis y exportación de rhamnosa a través de la membrana citoplasmática) y metabolismo del peptidoglicano (gen *sag*, codificante de Sag, la cual cortaría los péptidos que entrecruzan el péptidoglicano de la pared celular). Se observó que mutantes en *sag* presentan formas celulares alteradas y fallan en contactar sus extremos finales con las células vecinas, aspecto que sería fundamental durante el gliding (Liu, H. et al., 2013). Los genes *rfd* y *sag* podrían ser regulados por CcpA y de esta forma también contribuir al fenotipo de represión catabólica por observado sobre la movilidad gliding de *C. perfringens*.

Un hallazgo inesperado de este estudio fue la observación que, en ausencia de glucosa adicionada, CcpA tiene un rol positivo en la movilidad gliding. Como se observa en la Figura 25, en ausencia de glucosa adicionada, la mutante *ccpA* se desplaza sobre la placa de agar en menor extensión que la cepa salvaje isogénica. La cepa salvaje alcanza una velocidad máxima de gliding de 630 a 670  $\mu\text{m h}^{-1}$ , mientras que la derivada isogénica *ccpA* (CcpA deficiente) alcanza una velocidad máxima de gliding de 220 a 250  $\mu\text{m h}^{-1}$  solamente (Figura 25B). Dos observaciones apoyan fuertemente el rol positivo para CcpA en el gliding: primero, la mutante en *ccpA* no muestra ningún defecto en el crecimiento en medio líquido, llegando esencialmente a la misma densidad óptica final (Figura 25A) y número de células viables que la cepa salvaje (dato no mostrado); además, los resultados para la fase inicial de crecimiento de la colonia en placa (antes de evidenciarse el gliding) fue muy similar para las cepas *ccpA*<sup>+</sup> y *ccpA*<sup>-</sup> (Figura 20 y dato no mostrado). Esta hipótesis es reforzada por la demostración de que CcpA fue requerido para la eficiente expresión de *pilT* y *pilD* en medio de crecimiento sin suplementación con azúcar (Figura 25C). Estas observaciones indican que CcpA tiene un rol dual en el control de la movilidad gliding en *C. perfringens*. En presencia de azúcares rápidamente metabolizables (por ejemplo glucosa), CcpA tiene un rol negativo

en el desarrollo del gliding, un efecto que es parcialmente mediado a través de la represión de los genes para la biosíntesis del T4P (Figuras 23). En ausencia de agregado de azúcar, CcpA pasa a tener un rol positivo en el desarrollo del gliding, una novedosa propiedad que se evidenció por la deficiencia en la movilidad gliding y menor expresión de los genes *pilT* y *pilD* en los cultivos de la cepa mutante deficiente en CcpA en ausencia de glucosa adicionada (Figura 25C). En concordancia con nuestro hallazgo, fue previamente reportado para *C. perfringens* un rol positivo similar de CcpA en la formación de esporas y expresión de *cpe* bajo condiciones de en las que no hay represión catabólica (en ausencia de azúcar adicionada; Varga, J. J. et al., 2004). Posteriormente, se reportó que CcpA era también necesaria para una eficiente formación de biofilms en este microorganismo patógeno (Varga, J. J. et al., 2008).

La necrosis profusa del tejido en el hospedador infectado (mionecrosis) por *C. perfringens*, gangrena gaseosa, depende principalmente de dos toxinas, PLC (fosfolipasa C) y PFO (perfringolisina O). Considerando que la glucosa, así como otros hidratos de carbono rápidamente metabolizables, afecta la producción de las toxinas ToxA (TcdA) y Tox B (TcdB) en *C. difficile* (Dupuy, B. y Sonenshein, A. L., 1998) y el gliding en *C. perfringens* Cepa 13 (Capítulo Primero). Se analizó si la expresión de los genes de las toxinas PLC y PFO relacionadas con la gangrena gaseosa era modulada por la naturaleza de la fuente de carbono en el medio de crecimiento. Cuando se creció a *C. perfringens* en medio TY suplementado con glucosa o sacarosa la producción de ambas toxinas PLC y PFO se redujo de manera dosis dependiente, llegando a reducirse la expresión de ambas toxinas en hasta un 70 a 80 % a concentraciones de azúcar (glucosa o sacarosa) del 3 % (Figura 26). Esto se comprobó por la reducción de la actividad lipasa y hemolítica de sobrenadantes provenientes de medios con azúcar adicionada. Esta reducción en los niveles de las dos toxinas gangrenogénicas (PLC y PFO) estuvo correlacionada a una menor expresión de los genes codificantes de las mismas *plc* y *pfoA*, lo cual fue comprobado de dos formas diferentes: mediante el uso de las fusiones reporteras *plc-gusA* y *pfoA-gusA* (Figuras 27A y 27B) y a través de la determinación de los niveles de transcritos de estos dos genes (Figura 27C). Esta reducción de la expresión de los genes *plc* y *pfoA* por carbohidratos rápidamente metabolizables como la glucosa y la sacarosa podría deberse a una represión por catabolito carbonado (CCR). Si este fuera el caso, una mutante en *ccpA* no respondería a la señal negativa de la glucosa (sacarosa). Así encontramos que la mutante que no expresa CcpA en medio con glucosa muestra niveles de producción de PLC y PFO comparables con los observados

en medio sin glucosa adicionada (Figura 28). Se demostró que CcpA es el factor principal responsable de la represión de la expresión de las toxinas mediada por azúcares. Por lo tanto, CcpA vincularía la presencia de azúcares con el metabolismo de carbono y con la virulencia en una cepa de *C. perfringens* productora de la patología gangrena gaseosa. Una vez determinado el efecto represor azúcar dependiente mediado por CcpA sobre la expresión de *plc* y *pfoA*, se analizó informáticamente si estos genes podrían ser regulados directamente por CcpA a través de la unión a secuencias CRE. De este estudio surgió que tanto *plc* como *pfoA* presentan secuencias tipo CRE (Tabla 5) en sus regiones promotoras (Figuras 31 y 32), siendo susceptibles de una regulación negativa directa por CcpA. Además, se determinó que VirX y VirU podrían ser reprimidos por CcpA debido a que presentan secuencias tipo CRE (Tabla 5) que impedirían su expresión. Con lo cual PLC y PFO serían, además, indirectamente reprimidos por CcpA de unirse a los sitios CRE propuestos para *virX* y *virU*. CcpA podría incluso regular la biosíntesis del péptido señal AIP (Autoinductor peptídico; Ohtani, K. et al., 2009), el cual es generado por el sistema AgrBD, ya que se pudo identificar una posible secuencia CRE (Tabla 5) que podría impedir la transcripción del operón *agr* si CcpA se uniera a la secuencia propuesta.

En Streptococcus del Grupo A (Group A Streptococci, GAS), el operón *sag*, codificante para la producción de streptolisina S, SLS, está bajo la regulación de CcpA. Una cepa GAS mutante en CcpA muestra una mayor actividad hemolítica dependiente de SLS y un fenotipo más virulento comparado con la cepa parental en modelo animal. Estos hallazgos han conducido a suponer que en GAS, CcpA actuaría como un represor de la producción de toxinas y virulencia durante la infección sistémica. De nuestro estudio, es también evidente que una mutante de *C. perfringens* en *ccpA* produce mayores niveles de las toxinas PLC y PFO (Figura 29), las cuales son esenciales para la gangrena gaseosa.

Este trabajo de tesis ha demostrado que los azúcares (carbohidratos rápidamente metabolizables) inhiben dos factores relacionados con la patogenia de *C. perfringens*, la movilidad tipo gliding dependiente de T4P y la producción de las potentes toxinas PLC y PFO. Por mucho tiempo los efectos terapéuticos de los azúcares y sustancias relacionadas (por ejemplo miel y melazas, principalmente constituidas por glucosa/fructosa y sacarosa/glucosa, respectivamente) para prevenir la infección de heridas y acelerar la sanación han sido transmitidos sobre la base folcklore o conocimiento terapéutico popular (Herszage, L. et al., 1980; Forrest, R., 1982; Forrest,

R., 1982; Chirife, J. et al., 1983; Gordon, H. et al., 1985; Keith, J. F. y Knodel L., 1988; Beading, L., 1997; Cooper, R. et al., 2002; Lisle, J., 2002; Chong-Ming, S. et al., 2007). Las tabletas de azúcar (azúcar granulada o sacarosa) han sido usadas, con un éxito mayor al 99 %, para tratar las heridas de evolución complicada (Figura 36) (Herszage, L. et al., 1980; Beading, L., 1997; Lisle, J., 2002). Actualmente, hay dos efectos probados científicamente de la aplicación tópica de azúcar para acelerar el sanado de heridas cutáneas y úlceras. El azúcar actúa como un modulador de queratinositos y fibroblastos para promover la re-epitelialización y formación de tejido nuevo (Figura 36) (Nakao, H. et al., 2006). El azúcar puro (sacarosa 1 %) ha sido reportado promover la síntesis de colágeno por fibroblastos y la secreción de activador plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA), del factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) e interleuquina 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) a partir de queratinositos, estimulando la expresión de integrinas a partir de ambos tipos celulares (Nakao, H. et al., 2006). Entonces la reducción del gliding y la producción de toxinas mediada por azúcares representaría una tercer manera en que estas moléculas simples (y económicas) producen su efecto antimicrobiano, conduciendo a la posibilidad de desarrollar nuevas terapias para reducir o incluso eliminar los efectos agudos patológicos observados durante las infecciones gangrenosas por *C. perfringens* (Figuras 36 y 38).

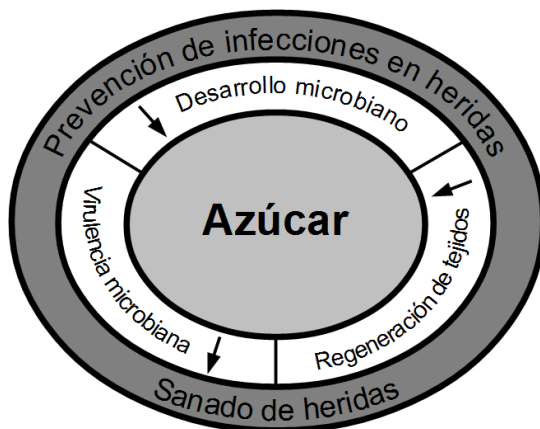


Figura 36: Relevancia de los azúcares en el tratamiento de heridas. Los azúcares previenen las infecciones de heridas debido a que reducen el desarrollo y la virulencia

de microorganismos patógenos. Paralelamente los azúcares promueven la regeneración de tejidos, lo cual conjuntamente con una virulencia atenuada (menor severidad y extensión del daño tisular, menor avance de la infección) conducen a un sanado de heridas más rápido y con menos complicaciones (Herszage, L. et al., 1980; Forrest, R., 1982; Forrest, R., 1982; Chirife, J. et al., 1983; Gordon, H. et al., 1985; Keith, J. F. y Knodel L., 1988; Beading, L., 1997; Cooper, R. et al., 2002; Lisle, J., 2002; Chong-Ming, S. et al., 2007; Capítulo Primero y Segundo de la presente tesis).

Con los resultados obtenidos de este trabajo de tesis se puede plantear un modelo regulatorio general en el cual estarían interconectados el metabolismo y la patogenia en *C. perfringens* como ocurre en otros microorganismos (Sección 1.2.). Como ha sido demostrado, el sistema maestro que regula la producción de diversas toxinas en este patógeno anaeróbico (VirR/S), también modula la expresión de diversos genes involucrados vías metabólicas alternativas (Figura 37) (Ohtani, K. et al., 2010). La cascada VirR/S-VR regulada positivamente el gen *cpdC* codificante para una 2'-fosfodiesterasa de nucleótidos 2',3'-cíclicos. Se piensa que esta enzima conjuntamente con nucleotidasas relacionadas cumplirían con la importante función de recuperar el fosfato inorgánico de 3' fosfonucleótidos producidos por la acción de las ARNasas extracelulares. Estas enzimas son relevantes para la adquisición de fuentes de carbono y energía mediante la hidrólisis de intermediarios no transformables durante la degradación de ARN con ARNasa. Otros genes que son modulados positivamente por VirR/S-VR son los codificantes de las N-acetilglucosaminidasas: CPE0289, CPE0818 y CPE0866. Experimentos de microarreglos mostraron que VirR/S-VR afecta la expresión de varios genes de transportadores: CPE0373, CPE0769, CPE1240, CPE1604, CPE1627-1630, CPE2345 y CPE2496. Además, los sistemas posiblemente relacionados con el PTS (sistema de fosfotransferasas): CPE0196-0199, CPE0317-0327 y CPE1463-1466 son regulados positivamente por la cascada VirR/S-VR. Esto indicaría que esta cascada regulatoria podría controlar la incorporación y/o exportación de nutrientes en *C. perfringens*. VirR/S-VR influencia positivamente la expresión de genes codificantes de proteínas para la transferencia de electrones (CPE0135 y CPE1014). La transcripción de genes necesarios para el metabolismo de carbohidratos son también afectados por el sistema VirR/S-VR (fructosa, CPE1350 y CPE1467; mio-inositol, CPE0085-CPE0097 (Kawsar, H. I. et al, 2004); ácido siálico, CPE0184-0185; galactosa CPE0374 y CPE0771; manosa, CPE0856; fucosa, CPE0317-0327). El operón *arcABCD* (CPE0168-0172) para la vía de la arginina deiminasa (ADI) es fuertemente controlado por la cascada VirR/S-VR. La vía ADI juega un rol importante en la producción de energía en anaerobiosis cuando la glucosa no está disponible en el medioambiente, convirtiendo arginina en ornitina, amonio y CO<sub>2</sub>. La generación de amonio es relevante en la defensa contra la acidificación. Otro gran número de genes u operones involucrados en el metabolismo para la obtención de energía también son afectados por el sistema VirR/S-VR, tal como el operón para la utilización de la etanolamina

(CPE0897-0909), el operón para el metabolismo del citrato (CPE2336-2341) y para la utilización del glicerol (CPE2549-2553) (Ohtani, K. et al., 2010).

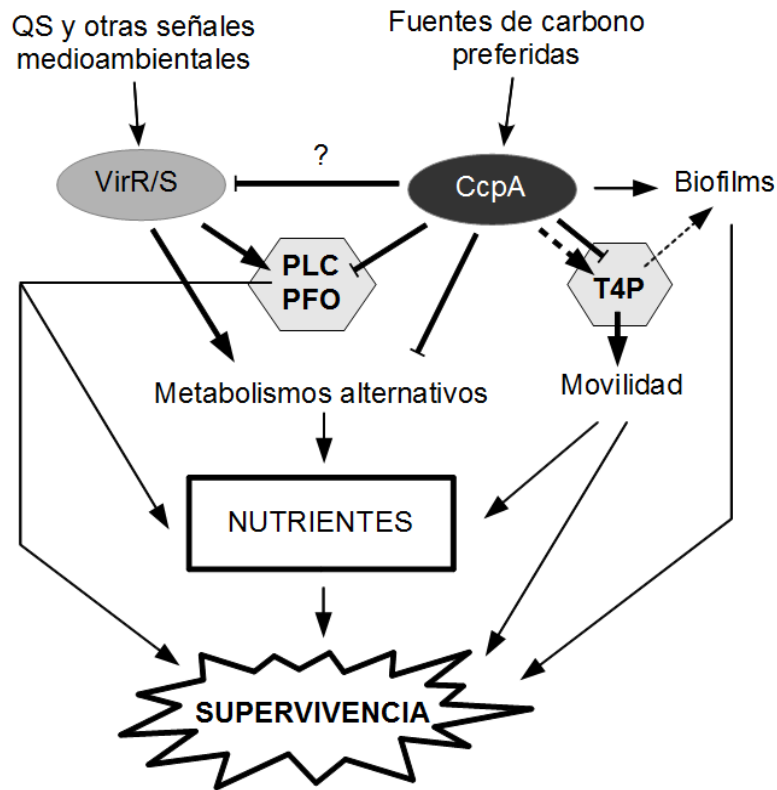


Figura 37: Modelo representando la interconexión entre reguladores maestros de virulencia y metabólicos: sistema de dos componentes VirR/S y CcpA. Señales de densidad poblacional (Quorum sensing, QS) y otras señales del medioambiente bacteriano activarían el sistema VirR/S, el cual a su vez induce la producción de las toxinas PLC y PFO durante el curso de una infección, y activa la expresión de genes metabólicos destinados a la utilización de nutrientes alternativos como los encontrados dentro del cuerpo de un hospedador infectado. PLC y PFO por sus actividades enzimáticas liberan sustancias nutritivas que son utilizadas por *C. perfringens* para su proliferación y supervivencia. Estos metabolitos liberados por la necrosis de tejido son catabolizados por enzimas, muchas de ellas activadas por VirR/S (Ohtani, K. et al., 2010). Además, PLC y PFO proveen de un mediambiente anóxico que favorece la supervivencia de este patógeno luego de la penetración en el tejido del hospedador. Por otro lado, la presencia de catabolitos rápidamente metabolizables y preferidos (por ejemplo azúcares: glucosa, fructosa, sacarosa) activan la proteína reguladora CcpA que reprime la producción de las toxinas PLC y PFO, y las vías metabólicas alternativas, ya que no serían necesarias para obtener nutrientes. En estas condiciones *C. perfringens* se encontraría en un entorno nutricional amigable, susceptible de ser colonizado y generar un establecimiento duradero como un biofilms (supervivencia a largo plazo), proceso que también requiere de la participación de CcpA (Varga, J. J. et al., 2008).

(Continuación leyenda Figura 37). CcpA sería importante para una completa expresión de genes involucrados en la funcionalidad del T4P, como se demostró en el Capítulo Primero. CcpA tendría un rol dual en la regulación del pili tipo IV. Si el T4P fuera necesario para la formación y arquitectura del biofilm como ocurre en *P. aeruginosa* (Klausen, M. et al., 2003), la regulación positiva del pili por CcpA estaría involucrada, por ejemplo, en la generación del biofilm. T4P es necesario para la movilidad de *C. perfringens*. Esta movilidad es reprimida por CcpA a través de la inhibición del pili, escenario que se presentaría cuando hay nutrientes disponibles y no es necesario moverse a un nicho nuevo. En el caso de no haber nutrientes presentes es necesario desplazarse, situación en que CcpA está inactivo y de esta manera el gliding dependiente de T4P no es reprimido. Siendo entonces la movilidad un factor de supervivencia.

Por otro lado, CcpA no solo regula genes metabólicos para un mejor aprovechamiento de los nutrientes disponibles, sino que como se ha demostrado en este trabajo y en otros anteriores (Varga, J. J. et al., 2008), modula determinantes patogénicos en *C. perfringens* (Figura 37) como la formación de biofilms, la capacidad de desplazarse en superficies dependiente de T4P (gliding) y la producción de toxinas importantes para la gangrena gaseosa ocasionada por la *C. perfringens*, como ser PLC y PFO.

VirR/S y CcpA (mediante el sistema PTS) transducen señales medioambientales en respuestas adecuadas para asegurar la supervivencia de *C. perfringens* en distintos ambientes y bajo diferentes condiciones de crecimiento. La coordinación de estos sistemas le permite a este patógeno adecuar rápidamente su metabolismo y sus comportamientos poblacionales a los distintos nichos encontrados, fuera o dentro de un hospedador infectado. Cuando *C. perfringens* ingresa al lumen intestinal o al tejido del hospedador se encuentra con un ambiente carente de nutrientes fácilmente asimilables. Por ejemplo, la concentración luminal de glucosa en el intestino se encuentra en un rango de 0,006 % a 0,4 % (Ferraris, R. P. et al., 1990), mientras que en la sangre es de 0,72 a 1,45 g/l (0,072 a 0,145 %). Bajo estas condiciones CcpA estaría inactivo, lo cual permitiría la producción de toxinas necrotizantes (PLC y PFO) y la movilidad gliding para asegurarse una provisión de nutrientes que permita la supervivencia (Figura 37). Paralelamente VirR/S activaría la expresión de PLC Y PFO, así como genes para metabolismos alternativos que aseguren la obtención de nutrientes y energía de catabolitos como el mio-inositol, arginina, etanolamina, entre otros (Kawsar, H. I. et al., 2004; Ohtani, K. et al., 2010). Cuando carbohidratos rápidamente metabolizables se

encuentren presentes en el ambiente circundante, CcpA reprimiría la transcripción de *plc* y *pfoA*, y el gliding dependiente de T4P. Esto sería esperado en este contexto, debido a que no sería necesario degradar tejido para obtener carbono y energía, o desplazarse a otro sitio en busca de fuentes de carbono que catabolizar, fomentándose la formación de biofilms para el establecimiento a largo plazo, como ocurre con la cepa SM101 de *C. perfringens* (intoxicación alimentaria) cuyo biofilm se incrementa al aumentar la concentración de glucosa, siendo máximo con glucosa 1,8 % (Varga, J. J. et al., 2008). Ante el agotamiento de nutrientes (fuente de carbono), se dispararía la movilidad (Sección 4.3) y la producción de toxinas no estaría inhibida por CcpA, dejando al sistema VirR/S libre para activar la producción de PLC y PFO de ser necesarias.

VirR/S y CcpA coordinarían sus actividades regulatorias para asegurar la supervivencia de *C. perfringens*, siendo los factores de virulencia (toxinas, biofilm y gliding) factores de supervivencia en realidad.

El metabolismo bacteriano es uno de los aspectos más fundamentales y menos comprendido de la virulencia de bacterias patógenas. Se han identificado nuevas rutas metabólicas que son únicas en algunos patógenos o están asociadas con genes de virulencia. El rol del metabolismo en virulencia debe ser reconocido conforme pase el tiempo con la misma prioridad con la cual se estudian los factores de virulencia clásicos. La idea de interferir con el metabolismo bacteriano durante una infección es atractiva, trabajos en este nuevo campo están focalizados, por ejemplo, en interferir con la ureasa bacteriana y de esta manera poder lidiar con infecciones gástricas y del tracto urinario. El ácido acetohidroxamínico (inhibidor de ureasa) ya está disponible en algunos países como una terapia adjunta para pacientes con infecciones urinarias crónicas por microorganismos metabolizantes de urea (Rohmer, L. et al., 2011). Podría pensarse que a futuro y en función de los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis (inhibición del gliding y la producción de toxinas por azúcares simples) y otros trabajos anteriores de nuestro grupo (regulación del inicio de la esporulación en *C. perfringens* por fosfatos; Philippe, V. A. et al., 2006) podrían desarrollarse medicamentos que bloqueen la esporulación, la producción de toxinas y el gliding de *C. perfringens* (Figura 38).

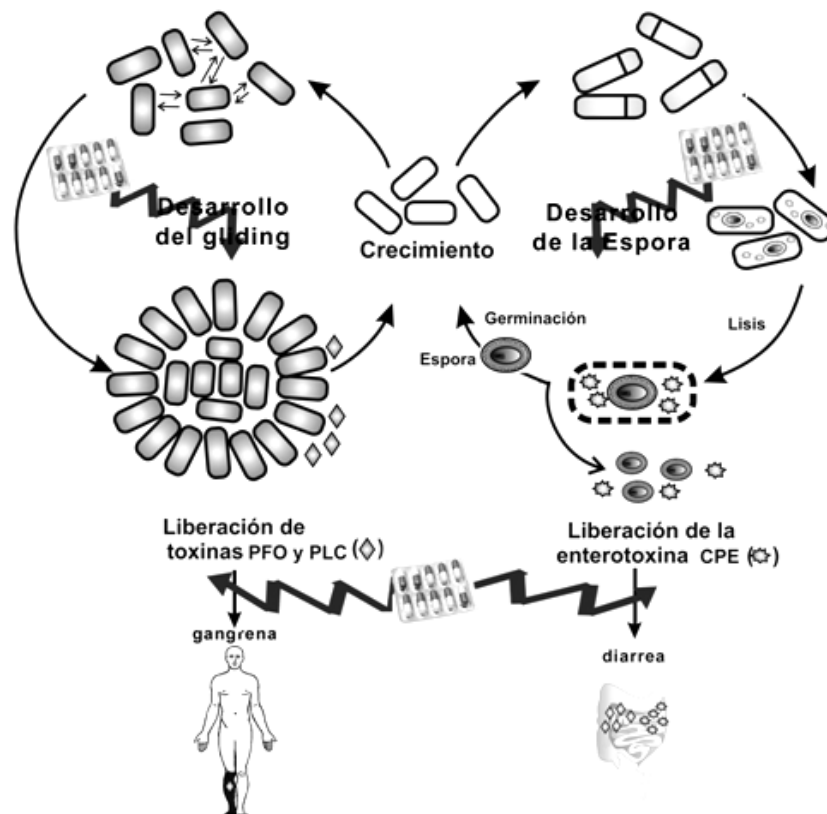


Figura 38: Esquema que muestra nuestro estudio global de la virulencia de *C. perfringens*. Se muestra el ciclo de desarrollo de la movilidad gliding, durante el cual las células vegetativas de *C. perfringens* mionecrótico coordinan su comportamiento para así establecerse en el curso de una infección y producir la patología gangrena gaseosa mediante la liberación de las principales toxinas PFO y PLC (parte izquierda del esquema). Las células vegetativas de cepas de *C. perfringens* que causan intoxicaciones alimentarias son capaces de esporular para generar estructuras de resistencia (esporas) y la potente enterotoxina CPE la cual actúa a nivel del intestino del hospedador provocando diarrea e inflamación intestinal (parte derecha del esquema). Los resultados arrojados por este trabajo de tesis y por otros realizados anteriormente por nuestro grupo de investigación, así como por otros investigadores alrededor del mundo (Philippe, V. A. et al., 2006; Méndez, M. B. et al., 2008 y 2012; Varga, J. J. et al., 2008) podrían llevar al desarrollo de nuevos medicamentos y terapias dirigidos a bloquear el gliding, la esporulación y la producción de toxinas de este patógeno (flechas quebradas), conduciendo a aliviar los síntomas e incluso evitar las enfermedades provocadas por *C. perfringens*. Notas periodísticas relacionadas: 2006. *La Nación. Ciencia/Salud*. Hallazgo de investigadores argentinos. Avance contra el tétanos y el botulismo. <http://www.lanacion.com.ar/824707-avance-contra-el-tetanos-y-el-botulismo>. 2008. *La Nación. Ciencia/Salud*. Hallan el talón de Aquiles de la bacteria que produce la gangrena. <http://www.lanacion.com.ar/984290-hallan-el-talon-de-aquiles-de-la-bacteria-que-produce-la-gangrena>. 2008 *La Capital. La Ciudad*. Un docente de la UNR logró frenar la gangrena. <http://www.lacapital.com.ar/la-ciudad/Un-docente-de-la-UNR-logro-acute-frenar-la-gangrena-20080217-0078.html#comentarios>.

## **8. Conclusión.**

## 8. Conclusión.

Todo ser vivo en este planeta lucha por sobrevivir, y las bacterias son un ejemplo de esto, evolucionando diversas estrategias a lo largo de millones de años para adaptarse a una plétora de hábitats y nichos terrestres. El ser humano, así como los animales y las plantas superiores, no son más que nichos en donde los nutrientes y la energía abundan, si bien no están directamente disponibles. Entonces, lo que en un principio fueron llamados factores de virulencia o patogenicidad en microorganismos que enfermaban a humanos, animales y plantas, no serían más que factores de supervivencia. Las bacterias patógenas se adaptaron e hicieron uso de estos factores para colonizar medioambientes bióticos ricos en elementos indispensables para su proliferación y supervivencia. Desarrollaron estrategias para vencer las defensas de los sistemas biológicos que atacaban, modificando rápidamente su metabolismo para un mejor aprovechamiento de las sustancias presentes en los seres vivos. Una muestra de esta interdependencia del metabolismo celular bacteriano y las necesidades nutricionales con el comportamiento patogénico se demuestra en este trabajo de tesis, donde los factores de patogenicidad (supervivencia) PLC, PFO y T4P son reprimidos por fuentes de carbono rápidamente metabolizables (glucosa, fructosa, sacarosa). Por lo tanto, cuando catabolitos metabólicamente eficientes están presentes no es necesario poner en marcha un plan de supervivencia, con lo cual la patogenicidad se ve atenuada. Cuando *C. perfringens* ingresa a un hospedador, los nutrientes disponibles libres son muy escasos (baja concentración de glucosa en tejido) y el medio ambiente es muy hostil, por lo que este patógeno debe expresar un conjunto de factores destinados a la adaptación rápida a estas nuevas condiciones. Se expresan toxinas que inhiben el sistema de defensa del hospedador, facilitan la supervivencia a la fagocitosis, reducen la tensión de oxígeno y destruyen tejido proveyendo de nutrientes para el desarrollo. Por otro lado, se favorece la movilidad bacteriana para colonizar rápidamente y expandirse a partir del punto de entrada. El objetivo de *C. perfringens* no es enfermarnos o matarnos solo sobrevivir sin importar el costo.

## **9. Bibliografía.**

## 9. Bibliografía.

- **Abdou L., Boileau C., Philip P., Pagès S., Fiérobe H., Tardif C.** (2008). Transcriptional Regulation of the *Clostridium cellulolyticum* *cip-cel* operon: a complex mechanism involving a catabolite-responsive element. *J. Bacteriol.* 190:1499-1506.
- **Abranches J., Nascimento M. M., Zeng L., Browngardt C. M., Wen Z. T., Rivera M. F., Burne R. A.** (2008). CcpA regulates central metabolism and virulence gene expression in *Streptococcus mutants*. *J. Bacteriol.* 190:2340-2349.
- **Allen S. P., Blaschek H. P.** (1988). Electroporation-induced transformation of intact cells of *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2322-2324.
- **Antunes A., Martin-Verstraete I., Dupuy B.** (2011). CcpA-mediated repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression. *Mol. Microbiol.* 79: 882–899.
- **Averhoff B., Friedrich A.** (2003). Type IV pili-related natural transformation systems: DNA transport in mesophilic and thermophilic bacteria. *Arch. Microbiol.* 180:385–393.
- **Awad, M. M., Rood, J. I.** (2002). Perfringolysin O expression in *Clostridium perfringens* is independent of the upstream *pfoR* Gene. *J. Bacteriol.* 184:2034–2038.
- **Bakaletz L. O., Baker B. D., Jurcisek J. A., Harrison A., Novotny L. A., Bookwalter J. E., Mungur R., Munson R. S. Jr.** (2005). Demonstration of Type IV pilus expression and a twitching phenotype by *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* 73:1635–1643.
- **Bannam T. L., Rood J. I.** (1993). *Clostridium perfringens*-*Escherichia coli* shuttle vectors that carry single antibiotic resistance determinants. *Plasmid.* 29:233–235.
- **Banu S., Ohtani K., Yaguchi H., Swe T., Cole S. T., Hayashi H., Shimizu T.** (2000). Identification of novel VirR/VirS-regulated genes in *Clostridium perfringens*. *Mol. Microbiol.* 35:854-864.
- **Bardy S. L., Ng S. Y., Jarrell K. F.** (2003). Prokaryotic motility structures. *Microbiology.* 149:295–304.

- **Ba-thein W., Lyrstis M., Ohtani K., Nisbet I. T., Hayashi H., Rood J. I., Shimizu T.** (1996). The *virR/virS* locus regulates the transcription of genes encoding extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 178:2514-2520.
- **Beading, L.** (1997). A bag full of sugar: Surgeons find that ordinary table sugar is a sweet adjunct to conventional treatment of deep wound healing. *Today Surg. Nurse.* 19:28-30.
- **Belete B., Lu H., Wozniak D. J.** (2008). *Pseudomonas aeruginosa* AlgR regulates Type IV pilus biosynthesis by activating transcription of the *fimU-pilVWXYZ1Y2E* operon. *J. Bacteriol.* 190:2023-2030.
- **Bergey D. H., Krieg N. R., Holt J. G.** (1986). Bergey's manual of systematic bacteriology. 1<sup>st</sup> Edition. Vol. 2. *Williams & Wilkins, Baltimore, MD.* ISBN 0-683-07893-3.
- **Bertrand J. J., West J. T., J. N. Engel.** (2010). Genetic analysis of the regulation of Type IV pilus function by the Chp chemosensory system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 192:994–1010.
- **Brown, D. R., Helaine S., Carbonnelle E., Pelicic V.** (2010). Systematic functional analysis reveals that a set of seven genes is involved in fine-tuning of the multiple functions mediated by Type IV pili in *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 78:3053-3063.
- **Bryant A. E.** (2003). Biology and pathogenesis of thrombosis and procoagulant activity in invasive infections caused by Group A Streptococci and *Clostridium perfringens*. *Clin. Microbial. Reviews.* 16:451-462.
- **Bulyha I., Schmidt C., Lenz P., Jakovljevic V., Höne A., Maier B., Hoppert M., Søgaard-Andersen L.** (2009). Regulation of the Type IV pili molecular machine by dynamic localization of two motor proteins. *Mol. Microbiol.* 74:691-706.
- **Burrows L. L.** (2005). Weapons of mass retraction. *Mol. Microbiol.* 57:878-888.
- **Burrows L. L.** (2012). *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: Type IV pili in action. *Annu. Rev. Microbiol.* 66:493–520.
- **Calvio C., Celandroni F., Ghelardi E., Amati G., Salvetti S., Cecilian F., Galizzi A., Senesi S.** (2005). Swarming differentiation and swimming motility

- in *Bacillus subtilis* are controlled by *swrA*, a newly identified dicistronic operon. *J. Bacteriol.* 187:5356-5366.
- **Carter G. P., Purdy D., Williams P., Minton N. P.** (2005). Quorum sensing in *Clostridium difficile*: analysis of a *luxS*-type signalling system. *J. Medical Microbiology.* 54:119–127.
  - **Cavalcanti M. T. H., Porto T., Figueiredo Porto A. L., Brandi I. V., Filho J. L., Pessoa A. Jr.** (2004). Large scale purification of *Clostridium perfringens* toxins: a review. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 20:151-164.
  - **Cheung, J. K., Awad M. M., Rood J. I.** (2009). Functional analysis of the VirRS phosphorelay from *Clostridium perfringens*. *Plos One.* 4: e5849.
  - **Cheung, J. K., Rood J. I.** (2000). The VirR response regulator from *Clostridium perfringens* binds independently to two imperfect direct repeats located upstream of the *pfoA* promoter. *J. Bacteriol.* 182:57-66.
  - **Chirife J., Herszage L., Joseph A., Kohn E.** (1983). *In vitro* study of bacterial growth inhibition in concentrated sugar solutions: microbiological basis for the use of sugar in treating infected wounds. *Antim. Agents Chem.* 23: 766-773.
  - **Choi S. K., Saier M. H.** (2005). Regulation of *sigL* expression by catabolite control protein CcpA involves a roadblock mechanism in *Bacillus subtilis*: potential connection between carbon and nitrogen metabolism. *J. Bacteriol.* 187:6856-6861.
  - **Chong-Ming S., Nakao H., Yamazaki M., Tsuboi R., Ogawa H.** (2007). Mixture of sugar and povidone-iodine stimulates healing of MRSA-infected skin ulcers on *db/db* mice. *Arch. Dermatol. Res.* 299:449-456.
  - **Collie R. E., McClane B. A.** (1998). Evidence that the enterotoxin gene can be episomal in *Clostridium perfringens* isolates associated with non-foodborne human gastrointestinal diseases. *J. Clin. Microbiol.* 36:30–36.
  - **Connan C., Brueggemann H., Mazuet C., Raffestin S., Cayet N., Popoff M. R.** (2012). Two-component systems are involved in the regulation of botulinum neurotoxin synthesis in *Clostridium botulinum* Type A strain hall. *Plos One.*7: e41848.
  - **Cooper R., Molan P., Harding K.** (2002). The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *J. Appl. Microbiol.* 93:857-863.

- **Crooke A. K., Fuller J. R., Obrist M. W., Tomkovich S. E., Vitko N. P., Richardson A. R.** (2013). CcpA-independent glucose regulation of lactate dehydrogenase 1 in *Staphylococcus aureus*. *Plos One*. 8: e54293.
- **Czczulin J. R., Collie R. E., McClane B. A.** (1996). Regulated expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin in naturally *cpe*-negative Type A, B, and C isolates of *C. perfringens*. *Infect. Immun.* 64:3301–3309.
- **Daniels R., Vanderleyden J., Michiels J.** (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:261–289.
- **Davey M. E., O’Toole G. A.** (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:847–867.
- **Deutscher J.** (2008). The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology.* 11:87–93.
- **DiRita V. J.** (1992). Co-ordinate expression of virulence genes by ToxR in *Vibrio cholera*. *Mol. Microbiol.* 6:451-458.
- **Dupuy B., Matamouros S.** (2006). Regulation of toxin and bacteriocin synthesis in *Clostridium* species by a new subgroup of RNA polymerase  $\sigma$ -factors. *Res. Microbiol.* 157:201-205.
- **Dupuy B., Sonenshein A. L.** (1998). Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes. *Mol. Microbiol.* 27:107–120.
- **Ellenor D. M., Baird R. N., Awad M. M., Boyd R. L., Rood J. I., Emmins J. J.** (1999). Use of genetically manipulated strains of *Clostridium perfringens* reveals that both alpha-toxin and theta-toxin are required for vascular leukostasis to occur in experimental gas gangrene. *Infect. Immun.* 67:4902-4907.
- **Fernandez-Miyakawa M., Marcellino R., Uzal F. A.** (2007). *Clostridium perfringens* Type A toxin production in 3 commonly used culture media. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19:184-186.
- **Ferraris R. P., Yasharpour S., Lloyd K. C., Mirzayan R., Diamond J. M.** (1990). Luminal glucose concentrations in the gut under normal conditions. *Am. J. Physiol.* 259:6822–6837.
- **Flores-Díaz M., Alape-Girón A.** (2003). Role of *Clostridium perfringens* phospholipase C in the pathogenesis of gas gangrene. *Toxicon.* 42:979-986.
- **Forrest R.** (1982). Development of wound therapy from the Dark Ages to the present. *J. R. Soc. Med.* 75:268-273.

- **Forrest R.** (1982). Early history of wound treatment. *J. R. Soc. Med.* 75:198-205.
- **Frandi A., Mengoni A., Brilli M.** (2010). Comparative genomics of VirR regulons in *Clostridium perfringens* strains. *BMC Microbiology.* 10:65.
- **Fujita Y.** (2009). Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73:245-259.
- **Fuqua W. C., Winans S. C., Greenberg E. P.** (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176:269–275.
- **George E. A., Muir T. W.** (2007). Molecular mechanisms of Agr quorum sensing in virulent Staphylococci. *Chembiochem.* 8:847–855.
- **Gobbetti M., De Angelis M., Di Cagno R., Minervini F., Limitone A.** (2007). Cell-cell communication in food related bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 120:34–45.
- **Gordon H., Middleton K., Seal K., Sullens K., Quatraro A., Minei A., Donzella C., Caretta F., Consoli G., Giugliano D., Addison M. K., Walterspiel J. N.** (1985). Sugar and wound healing. *The Lancet.* 326:663-664.
- **Görke B., Stülke J.** (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:613-624.
- **Griffith K. L., Wolf R. E. Jr.** (2002). Measuring beta-galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290:397–402.
- **Harshey R.** (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:249–273.
- **Henrichsen J.** (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.* 36:478–503.
- **Herszage L., Montenegro J. R., Joseph A. L.** (1980). Tratamiento de las heridas supuradas con azúcar granulado comercial. *Bol. Trab. Soc. Argent. Cir.* 41:315-330.
- **Hickey M. J., Kwan R. Y. Q., Awad M. M., Kennedy C. L., Young L. F., Hall P., Corder L. M., Lyras D., Emmins J. J., Rood J. I.** (2008). Molecular and cellular basis of microvascular perfusion deficits induced by *Clostridium perfringens* and *Clostridium septicum*. *Plos Pathogens.* 4:1-9.

- **Higashi Y., Chazono M., Inoue K., Yanagase Y., Amano T., Shimada K.** (1973). Complementation of theta toxinogenicity between mutants of two groups of *Clostridium perfringens*. *Biken J.* 16:1–9.
- **Hiscox T. J., Chakravorty A., Choo J. M., Ohtani K., Shimizu T., Cheung J. K., y Rood J. I.** (2011). Regulation of virulence by the RevR response regulator in *Clostridium perfringens*. *Infect. Immun.* 79:2145–2153.
- **Howie H. L., Glogauer M., So M.** (2005). The *N. gonorrhoeae* Type IV pilus stimulates mechanosensitive pathways and cytoprotection through a *pilT*-dependent mechanism. *Plos Biology.* 3:0627-0637.
- **Imagawa T., Tatsuki T., Higashi Y., Amano T.** (1981). Complementation characteristics of newly isolated mutants from two groups of strains of *Clostridium perfringens*. *Biken J.* 24:13–21.
- **Imam S., Chen Z., Roos D. S., Pohlschröder M.** (2011). Identification of surprisingly diverse Type IV pili, across a broad range of Gram-positive bacteria. *Plos One.* 6:1-13.
- **Jain R., Behrens A., Kaefer V., Kazmierczaka B. I.** (2012). Type IV pilus assembly in *Pseudomonas aeruginosa* over a broad range of cyclic di-GMP concentrations *J. Bacteriol.* 194:4285-4294.
- **Jelsbak L., Kaiser D.** (2005). Regulating pilin expression reveals a threshold for S motility in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 187:2105–2112.
- **Jelsbak L., Sogaard-Andersen L.** (2003). Cell behavior and cell-cell communication during fruiting body morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J. Microbiol. Methods.* 55:829–839.
- **Jirásková A., Vitek L., Fevery J., Ruml T., Branny P.** (2005). Rapid protocol for electroporation of *Clostridium perfringens*. *J. Microbiol. Methods.* 62:125-127.
- **Jurcisek J. A., Bakaletz L. O.** (2007). Biofilms formed by nontypeable *Haemophilus influenzae in vivo* contain both double-stranded DNA and Type IV pilin protein. *J. Bacteriol.* 189:3868-3875.
- **Kawsar H. I., Ohtani K., Okumura K., Hayashi H., Shimizu T.** (2004). Organization and transcriptional regulation of myo-inositol operon in *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol. Letters.* 235:289-295.
- **Kearns D. B., Losick R.** (2003). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 49:581-590.

- **Keith J. F., Knodel L.** (1988). Sugar in wound healing. *Drug Intell. Clin. Pharm.* 22:409-411.
- **Kennedy C. L., Lyras D., Cheung J. K., Hiscox T. J., Emmins J. J., Rood J. I.** (2009). Cross-complementation of *Clostridium perfringens* PLC and *Clostridium septicum*  $\alpha$ -toxin mutants reveals PLC is sufficient to mediate gas gangrene. *Microbes and Infection.* 11:413-418.
- **Kinkel T. L., McIver K. S.** (2008). CcpA-mediated repression of streptolysin S expression and virulence in the Group A *Streptococcus*. *Infect. Immun.* 76:3451-3463.
- **Klausen M., Heydorn A., Ragas P., Lambertsen L., Aaes-Jorgensen A., Mollin S., Tolker-Nielsen T.** (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and Type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.* 48:1511-1524.
- **Labbe R. G., Rey D. K.** (1979). Raffinose increases sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* Type A. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:1196–1200.
- **Labbe R., Somers E., Duncan C.** (1976). Influence of starch source on sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* Type A. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:455–457.
- **Lancero H., Caberoy N. B., Castaneda S., Li Y., Lu A., Dutton D., Duan X. Y., Kaplan H. B., Shi W., Garza A. G.** (2004). Characterization of a *Myxococcus xanthus* mutant that is defective for adventurous motility and social motility. *Microbiology.* 150:4085–4093.
- **Lemon K. P., Earl A. M., Vlamakis H. C., Aguilar C., Kolter R.** (2008). Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 322:1–16.
- **Li C., Sun F., Cho H., Yelavarthi V., Sohn C., He C., Schneewind O., Bae T.** (2010). CcpA mediates proline auxotrophy and is required for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *J. Bacteriol.* 192:3883–3892.
- **Linhartová I., Bumba L., Mašín J., Basler M., Osička R., Kamanová J., Procházková K., Adkins I., Hejnová-Holubová J., Sadílková L., Morová J., Sebo P.** (2010). RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:1076-112.

- **Lisle, J.** (2002). Use of sugar in the treatment of infected leg ulcers. *Br. J. Community Nurs.* 7:40-46.
- **Lombardía E., Rovetto A., Arabolaza A., Grau R. R.** (2006). A Lux-dependent cell to cell language regulates social behavior and development in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 188:4442-4452.
- **López D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R.** (2009). Paracrine signaling in a bacterium. *Gene & Development.* 23:1631–1638.
- **Lorca G. L., Chung Y. J., Barabote R., Weyler W., Schilling C., Saier M. Jr.** (2005). Catabolite repression and activation in *Bacillus subtilis*: dependency on CcpA, Hpr, and HprK. *J. Bacteriol.* 187:7826–7839.
- **Lyon G. J., Novick R. P.** (2004). Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides.* 25:1389–1403.
- **Macfarlane S., Hopkins M. J., Macfarlane G. T.** (2001). Toxin synthesis and mucin breakdown are related to swarming phenomenon in *Clostridium septicum*. *Infect. Immun.* 69:1120-1126.
- **Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.** (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, New York.* ISBN 0-87969-136-0.
- **Marciniak B. C., Pabijaniak M., De Jong A., Dühring R., Seidel G., Hillen W., Kuipers O. P.** (2012). High- and low-affinity cre boxes for CcpA binding in *Bacillus subtilis* revealed by genome-wide analysis. *BMC Genomics.* 13:401.
- **Margolin W.** (2006). Gliding motility: anticipating the next move with a molecular clock. *Curr. Biol.* 16:85–87.
- **Marvaud J. C., Gilbert M., Inoue K., Fujinaga Y., Oguma K., Popoff M. R.** (1998). *botR/A* is a positive regulator of botulinum neurotoxin and associated non-toxin protein genes in *Clostridium botulinum* A. *Mol. Microbiol.* 29:1009-1018.
- **Marvaud J., Eisel U., Binz T., Niemann H., and Popoff M. R.** (1998). TetR is a positive regulator of the tetanus toxin gene in *Clostridium tetani* and is homologous to BotR. *Infect. Immun.* 66:5698-5702.
- **Masayama A., Hamasaki K., Urakami K., Shimamoto S., Kato S., Makino S., Yoshimura T., Moriyama M., Moriyama R.** (2006). Expression of germination-related enzymes, CspA, CspB, CspC, SleC, and SleM, of

- Clostridium perfringens* S40 in the mother cell compartment of sporulating cells. *Genes Genet. Syst.* 81:227-234.
- **Mattick J. S.** (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:289–314.
  - **Mazariego-Espinosa K., Cruz A., Ledesma M. A., Ochoa S. A., Xicohtencatl-Cortes J.** (2010). Longus, a type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*, is involved in adherence to intestinal epithelial cells. *J. Bacteriol.* 192:2791-2800.
  - **McBride M.** (2001). Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:49–75.
  - **Melville S. B., Labbe R., Sonenshein A. L.** (1994). Expression from the *Clostridium perfringens* *cpe* promoter in *C. perfringens* and *Bacillus subtilis*. *Infect. Immun.* 62:5550–5558.
  - **Méndez M. B., Goñi A., Ramirez W., Grau R. R.** (2012). Sugar inhibits the production of the toxins that trigger clostridial gas gangrene. *Microbial Pathogenesis.* 52:85-91.
  - **Méndez, M., Huang I., Ohtani K., Grau R., Shimizu T., Sarker M. R.** (2008). Carbon catabolite repression of Type IV pilus-dependent gliding motility in the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 190:48-60.
  - **Merz A. J., Forest K. T.** (2002). Bacterial surface motility: slime trails, grappling hooks & nozzles. *Current Biology.* 12:R1-R7.
  - **Miller J. H.** (1972). Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory, New York.* 352-355.
  - **Miller M. B., Bassler B. L.** (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:165–199.
  - **Miwa Y., Nakata A., Ogiwara A., Yamamoto M., Fujita Y.** (2000). Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (cre) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research.* 28:1206-1210.
  - **Morand P. C., Bille E., Morelle S., Eugène E., Beretti J., Wolfgang M., Meyer T. F., Koomey M., Nassif X.** (2004). Type IV pilus retraction in pathogenic *Neisseria* is regulated by the PilC proteins. *EMBO.* 23:2009–2017.
  - **Muir T. W.** (2003). Turning virulence on and off in Staphylococci. *J. Pept. Sci.* 9:612–619.

- **Myers G. S., Rasko D. A., Cheung J. K., Ravel J., Seshadri R., DeBoy R. T., Ren Q., Varga J., Awad M. M., L. Brinkac M., Daugherty S. C., Haft D. H., Dodson R. J., Madupu R., Nelson W. C., Rosovitz M. J., Sullivan S. A., Khouri H., Dimitrov G. I., Watkins K. L., Mulligan S., Benton J., Radune D., Fisher D. J., Atkins H. S., Hiscox T., Jost B. H., Billington S. J., Songer J. G., McClane B. A., Titball R. W., Rood J. I., Melville S. B., Paulsen I. T.** (2006). Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. *Genome Res.* 16:1031–1040.
- **Nadell, C. D., Xavier J. B., Levin S. A., Foster K. R.** (2008). The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *Plos Biology.* 6: e14.
- **Nakao H., Yamazaki M., Tsuboi R., Ogawa H.** (2006). Mixture of sugar and povidoneiodine stimulates wound healing by activating keratinocytes and fibroblast functions. *Arch. Dermatol. Res.* 298:175-182.
- **Nakayama J., Akkermans A. D., De Vos W. M.** (2003). High-throughput PCR screening of genes for three-component regulatory system putatively involved in quorum sensing from low-G+C Gram-positive bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67:480–489.
- **Novick R. P., Muir T. W.** (1999). Virulence gene regulation by peptides in Staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:40–45.
- **O'Brien D. K., Therit B. H., Woodman M. E., Melville S. B.** (2007). The role of neutrophils and monocytic cells in controlling the initiation of *Clostridium perfringens* gas gangrene. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50:86-93.
- **O'Brien D. K., Melville S. B.** (2003). Multiple effects on *Clostridium perfringens* binding, uptake and trafficking to lysosomes by inhibitors of macrophage phagocytosis receptors. *Microbiology.* 149:1377–1386.
- **O'Brien D. K., Melville S. B.** (2004). Effects of *Clostridium perfringens* alpha-toxin (PLC) and perfringolysin O (PFO) on cytotoxicity to macrophages, on escape from the phagosomes of macrophages, and on persistence of *C. perfringens* in host tissues. *Infect. Immun.* 72:5204-5215.
- **O'Toole G. A., Gibbs K. A., Hager P. W., Phibbs P. V. Jr., Kolter R.** (2000). The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182:425–431.

- **Ohtani K., Hayashi H., Shimizu T.** (2002). The *luxS* gene is involved in cell–cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens*. *Mol. Microbiol.* 44:171-179.
- **Ohtani K., Hirakawa H., Tashiro K., Yoshizawa S., Kuhara S., Shimizu T.** (2010). Identification of a two-component VirR/VirS regulon in *Clostridium perfringens*. *Anaerobe.* 16:258-64.
- **Ohtani K., Yuan Y., Hassan S., Wang R., Wang Y., Shimizu T.** (2009). Virulence gene regulation by the *agr* system in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 191:3919-3927.
- **Okumura K., Ohtani K., Hayashi H., Shimizu T.** (2008). Characterization of genes regulated directly by the VirR/VirS system in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 190:7719-7727.
- **Pelling A. E., Li Y., Cross S. E., Castaneda S., Shi W., Gimzewski J. K.** (2006). Self-organized and highly ordered domain structures within swarms of *Myxococcus xanthus*. *Cell Motility and the Cytoskeleton.* 63:141–148.
- **Philippe V. A., Méndez M. B., Huang I. H., Orsaria L. M., Sarker M. R., Grau R. R.** (2006). Inorganic phosphate induces spore morphogenesis and enterotoxin production in the intestinal pathogen *Clostridium perfringens*. *Infect. Immun.* 74:3651–3656.
- **Phillips-Jones M. K.** (1990). Plasmid transformation of *Clostridium perfringens* by electroporation methods. *FEMS Microbiol. Letters.* 66:221-226.
- **Puri-Taneja A., Paul S., Chen Y., Hulett M.** (2006). CcpA causes repression of the *phoPR* promoter through a novel transcription start site, P<sub>A6</sub>. *J. Bacteriol.* 188:1266–1278.
- **Raju D., Waters M., Setlow P., Sarker M. R.** (2006). Investigating the role of small, acid-soluble spore proteins (SASPs) in the resistance of *Clostridium perfringens* spores to heat. *BMC Microbiol.* 6:50.
- **Rakotoarivonina H., Jubelin G., Hebraud M., Gaillard-Martinie B., Forano E., Mosoni P.** (2002). Adhesion to cellulose of the Gram-positive bacterium *Ruminococcus albus* involves Type IV pili. *Microbiology.* 148:1871–1880.
- **Ramboarina S., Fernandes P. J., Daniell S., Islam S., Simpson P., Frankel G., Booy F., Sonnenberg M. S., Matthews S.** (2005). Structure of the bundle-forming pilus from enteropathogenic *Escherichia coli*. *JBC.* 48:40252-40260.

- **Rieu A., Weidmann S., Garmyn D., Piveteau P., Guzzo J.** (2007). Agr system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6125–6133.
- **Rohmer L., Hocquet D., Miller S. I.** (2011). Microbes and metabolism: are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis. *Trends in Microbiology.* 19:341-348.
- **Rood J. I., Cole S. T.** (1991). Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Rev.* 4:621-48.
- **Sacks L. E.** (1983). Influence of carbohydrates on growth and sporulation of *Clostridium perfringens* in a defined medium with or without guanosine. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:1169-1175.
- **Sarker M. R., Shivers R. P., Sparks S. G., Juneja V. K., McClane B. A.** (2000). Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3234–3240.
- **Sauer K., Cullen M. C., Rickard A. H., Zeef L., Davies D. G., Gilbert P.** (2004). Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J. Bacteriol.* 186:7312-7326.
- **Schaeffer P., Millet J., Aubert J. P.** (1965). Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 54:704–711.
- **Schumacher M. A., Seidel G., Hillen W., Brennan R.** (2007). Structural mechanism for the fine-tuning of CcpA function by the small molecule effectors glucose-6-phosphate and fructose-1,6-bisphosphate. *J. Mol. Biol.* 368:1042–1050.
- **Shimizu T., Ohtani K., Hirakawa H., Ohshima K., Yamashita A., Shiba T., Ogasawara N., Hattori M., Kuhara S., Hayashi H.** (2002). Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:996–1001.
- **Shimizu T., Yaguchi H., Ohtani K., Banu S., Hayashi H.** (2002). Clostridial VirR/VirS regulon involves a regulatory RNA molecule for expression of toxins. *Mol. Microbiol.* 43:257–265.
- **Shrout J. D., Chopp D. L., Just C. L., Hentzer M., Givskov M., Parsek M. R.** (2006). The impact of quorum sensing and swarming motility on

*Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol. Microbiol.* 62:1264–1277.

- **Singh K. D., Schmalisch M. H., Stülke J., Görke B.** (2008). Carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*: quantitative analysis of repression exerted by different carbon sources. *J. Bacteriol.* 190:7275-7284.
- **Sonja-Verena, A., Pohlschröder M.** (2009). Diversity of archaeal Type IV pilin-like structures. *Extremophiles.* 13:403–410.
- **Sonnleitner E., Abdou L., Haas D.** (2009). Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106:21866–21871.
- **Sparks S. G., Carman R. J., Sarker M. R., McClane B. A.** (2001). Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. *J. Clin. Microbiol.* 39:883–888.
- **Spectora M. P., Kenyonb W. J.** (2012). Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International.* 45:455–481.
- **Spormann A. M.** (1999). Gliding motility in bacteria: insights from studies of *Myxococcus xanthus*. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews.* 63:621-641.
- **Stanley N. R., Britton R. A., A. Grossman D., Lazazzera B. A.** (2003). Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *J. Bacteriol.* 185:1951–1957.
- **Stevens D. L., Bryant A. E.** (2002). The role of clostridial toxins in the pathogenesis of gas gangrene. *Clin. Infect. Dis.* 35:93-100.
- **Stülke J., Hillen W.** (2000). Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annual Review of Microbiology.* 54:849-880.
- **Varga J. J., Nguyen V., O'Brien D. K., Rodgers K., Walker R. A., Melville S. B.** (2006). Type IV pili-dependent gliding motility in the Gram-positive pathogen *Clostridium perfringens* and other Clostridia. *Mol. Microbiol.* 62:680–694.
- **Varga J. J., Stirewalt V. L., Melville S. B.** (2004). The CcpA protein is necessary for efficient sporulation and enterotoxin gene (*cpe*) regulation in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 186:5221–5229.

- **Varga J. J., Therit B., Melville S. B.** (2008). Type IV pili and the CcpA protein are needed for maximal biofilm formation by the Gram-positive anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *Infect. Immun.* 76:4944-4951.
- **Vinuselvi P., Kim M. K., Lee S. K., Ghim C.** (2012). Rewiring carbon catabolite repression for microbial cell factory. *BMB reports.* 45:59-70.
- **Vlamakis H., Aguilar C., Losick R., Kolter R.** (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Gene & Development.* 22:945-953.
- **Warner J. B., Lolkema J.** (2003). CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:475–490.
- **Waters C. M., Bassler B. L.** (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:319–346.
- **Waters M., Raju D., Garmory H. S., Popoff M. R., Sarker M. R.** (2005). Regulated expression of the beta2-toxin gene (*cpb2*) in *Clostridium perfringens* Type A isolates from horses with gastrointestinal diseases. *J. Clin. Microbiol.* 43:4002–4009.
- **Waters M., Savoie A., Garmory H. S., Bueschel D., Popoff M. R., Songer J. G., Titball R. W., McClane B. A., Sarker M. R.** (2003). Genotyping of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets. *J. Clin. Microbiol.* 41:3584–3591.
- **Whitchurch C. B., Beatson S. A., Comolli J. C., Jakobsen T., Sargent J. L., Bertrand J. J., West J., Klausen M., Waite L. L., Kang P. J., Tolker-Nielsen T., Mattick J. S., Engel J. N.** (2005). *Pseudomonas aeruginosa fimL* regulates multiple virulence functions by intersecting with Vfr-modulated pathways. *Mol. Microbiol.* 55:1357–1378.
- **Whitchurch C. B., Leech A. J., Young M. D., Kennedy D., Sargent J. L., Bertrand J. J., Semmler A. B., Mellick A. S., Martin P. R., Alm R. A., Hobbs M., Beatson S. A., Huang B., Nguyen L., Commolli J. C., Engel J. N., Darzins A., Mattick J. S.** (2004). Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 52:873–893.
- **Wilson J. M., Schurr M. J., LeBlanc C. L., Ramamurthy R., Buchanan K. L., Nickerson C. A.** (2002). Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad. Med. J.* 78:216–224.

- **Xavier K. B., Bassler B. L.** (2003). LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:191–197.
- **Yu Y., Tangney M., Aass H. C., Mitchell W. J.** (2007). Analysis of the mechanism and regulation of lactose transport and metabolism in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1842–1850.
- **Zomer A. L., Buist G., Larsen R., Kok J., Kuipers O.** (2007). Time-resolved determination of the CcpA regulon of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris MG1363. *J. Bacteriol.* 189:1366–1381.