

Tesis Doctoral

Efecto del ácido salicílico sobre la virulencia de *Staphylococcus aureus* y su interacción con el huésped

Alvarez, Lucía Paula

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Alvarez, Lucía Paula. (2010). Efecto del ácido salicílico sobre la virulencia de *Staphylococcus aureus* y su interacción con el huésped. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Alvarez, Lucía Paula. "Efecto del ácido salicílico sobre la virulencia de *Staphylococcus aureus* y su interacción con el huésped". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Efecto del ácido salicílico sobre la
virulencia de *Staphylococcus aureus* y su interacción
con el huésped

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

Lic. Lucía Paula Álvarez

Director de Tesis: Dra. Fernanda Buzzola

Consejero de Estudios: Dr. Norberto Iusem

Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología

Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2010

Efecto del ácido salicílico sobre la virulencia de *Staphylococcus aureus* y su interacción con el huésped

S. aureus es una bacteria oportunista capaz de generar infecciones severas en humanos. Entre los factores de virulencia más importantes de *S. aureus* se encuentran el polisacárido capsular (PC) y la adhesina Eap, cuya expresión está controlada por los reguladores globales *sae* y *mgrA*. La expresión de *eap* es activada por *sae*, mientras que el PC es activado por *mgrA* e inhibido por *sae*. El ácido salicílico (SAL) altera la expresión de diversas moléculas en células procariotas y eucariotas. Este trabajo se propuso estudiar el efecto del SAL sobre la expresión de los factores de virulencia de *S. aureus* y cómo esto afecta la interacción de la bacteria con el huésped. Al respecto, el SAL provocó un aumento en la capacidad de internalización de la cepa Newman en células epiteliales. Esto correlacionó con una expresión disminuida del PC5 y un aumento de Eap, debido al efecto positivo del SAL sobre *sae* y negativo sobre *mgrA*. Por otra parte, el tratamiento de las células endoteliales con SAL, así como también sobre los ratones generó una menor adherencia de *S. aureus*. Además, se determinó que Eap es esencial para la internalización y colonización de *S. aureus* tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos hallazgos demuestran que el SAL altera la expresión de moléculas de *S. aureus* directamente involucradas en la interacción con el huésped y por lo tanto la progresión de la infección podría verse afectada.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, virulencia, ácido salicílico, adhesinas, polisacárido capsular

Effect of salicylic acid on *Staphylococcus aureus* virulence and its interaction with the host

S. aureus is an opportunistic bacterium capable of generating severe infection in humans. Among the most important virulence factors of *S. aureus* are the capsular polysaccharide (CP) and Eap adhesin, whose expression is modulated by *sae* and *mgrA* global regulators. Expression of *eap* is activated by *sae*, while CP is activated by *mgrA* and inhibited by *sae*. Salicylic acid (SAL) alters the expression of various molecules in prokaryotic and eukaryotic cells. This work proposed to characterize the effect of SAL on host-bacteria interaction. In this regard, SAL caused an increased internalization of strain Newman into epithelial cells. This observation correlated with a decreased expression of CP and an increased expression of Eap, which would be caused by a positive effect of SAL on *sae* and a negative effect on *mgrA*. Moreover, the action of SAL on endothelial cells and mice generated a lower adherence of *S. aureus*. Moreover, it was determined that Eap is essential for internalization and colonization of *S. aureus* both *in vitro* and *in vivo*. These findings demonstrate that SAL is able to alter the expression of molecules directly involved in of host - *S. aureus* interaction, and therefore the progression of infection would be affected.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, virulence, salicylic acid, adhesins, capsular polysaccharide

Agradecimientos

A la Dra. Fernanda Buzzola, por haberme enseñado a manejar en el laboratorio de Microbiología y por acompañarme en mi carrera durante todos estos años, estando siempre dispuesta al diálogo.

Al Dr. Daniel Sordelli, por darme la oportunidad de realizar esta Tesis de Doctorado en el laboratorio a su cargo, por confiar en mí, porque siempre pude recurrir a él, por su gran sentido de la responsabilidad, por compartir su experiencia y anécdotas.

A mis compañeros de laboratorio, por brindarme su amistad y su ayuda en todo momento. Por los viajes compartidos, por las salidas extra-lab, por las charlas, el intercambio de protocolos, los mails generales... A Sol, Angie, Sebas, Rita, Euge, Moni, Santi, Jorge, Mariana, Mario, Maribel, Paola, Constanza, Vicky, Marisa, Tania, Paula, Sole, Kari, Nancy, Federico. Y a Agus y Lore que aunque ya no estén en el lab, siempre puedo contar con ellas.

A Lorena Medina, por su excelente asistencia técnica, por su paciencia, bondad y cariño! Por su amistad, por su ejemplo de gran sacrificio y de "no queja"!!!

A la Dra. Cristina Cerquetti, Dra. Mariana Catalano y Dra. Daniela Centrón, por su desinteresada colaboración cuando recurrí a ellas y por la sonrisa que me regalan cada día.

Al Dr. Gerardo Mirkin por su colaboración en el uso del microscopio de fluorescencia.

Al personal de Bioterio, por su paciencia y su buena predisposición, especialmente a Sabri!

Al personal de limpieza, porque con su labor hacen más fácil la tarea de todos.

A la Lic. Elisa Malaver y a la Dra. Mirta Schattner de la Academia Nacional de Medicina por su colaboración con el cultivo de células endoteliales y con el uso del citómetro de flujo.

Al Dr. Cheung por aceptarme en su laboratorio de la Universidad de Dartmouth, Hanover, New Hampshire, USA. A Guido Memmi y a María Pilar Trotonda por hacer más fácil mi estadía en USA y por su amistad a pesar de la distancia y del tiempo.

A la Dra. Ruth Massey por aceptarme en su laboratorio de la Universidad de Bath, UK. A Araxi Urrutia, Andrew Edwards, Laura Lopez Pascua, Justine Rudkin y Ore Francis por su compañía y ayuda durante mi estadía en Bath.

A mi papá, por su contribución a la obtención de mi doctorado, porque en los últimos meses que compartimos pude disfrutar de su compañía como nunca antes lo había hecho, por brindarme su ejemplo de perseverancia y esfuerzo, porque sé que está en algún lugar orgulloso de mí y porque aunque no llegó a este momento, estuvo apoyándome en todo el recorrido que es tan o más importante que la llegada. Gracias papá, te amo!

A mi mamá, por estar siempre dispuesta a dialogar, porque sé que puedo contar con ella siempre, para todo, porque es un ejemplo de lucha, de dignidad, de integridad. Por sus sabios consejos. Por los valores y la filosofía de vida que me transmitió, por estar aquí y ahora a mi lado, de fierro, como siempre.

A mis hermanos, por ser los más hermosos del mundo! A Iván, por ser mi hermano durante toda mi vida, gracias por el esfuerzo en afianzar nuestra relación; a Cami, por ser mi hermana-amiga; a Nico, por ser el hermanito menor más dulce que existe (aguante el taladro!); a Leti, por su madurez a pesar de su edad; a Lucas por ser el hermano más delirante!

A mis sobrinos, Agustín y Candela por ser tan dulces y por brindarme tanto amor.

A mi cuñada Mariadelia, por cuidar a mi hermano y a mis sobrinos y por ofrecer siempre una mano para ayudarme.

A Martha, por haber acompañado a mi papá en sus últimos años de vida, por darme siempre la bienvenida a su casa, por cocinar tan rico y por haberme demostrado siempre su cariño. A Juana, por ser una abuela postiza maravillosa!

A mis abuelas, tíos, tías, primos, prima por estar siempre cerca y porque gracias a todos ellos es imposible no sentirme acompañada.

A Fede, por haberme elegido, por escucharme, por estar a mi lado incondicionalmente, por ayudarme a pulir mi vida y a completar mi felicidad.

A mi nueva familia: mi suegra Norma, mis cuñadas Maru y Marce, mi sobrina Guada, por estar siempre dispuestas a ayudarme y por la buena onda.

A mis amigas, Luciana, Sol, Cari, Ingrid, Gi, Naty, Pep, Enid por ser personas maravillosas, por estar siempre que las necesité, por las risas y las lágrimas compartidas.

A todos mis compañeros de la Soka Gakkai de Argentina, de Estados Unidos, de Brasil y de Inglaterra, por hacerme sentir que siempre, en cualquier lugar del mundo podré contar con su compañía y apoyo.

A mi maestro de la vida, Daisaku Ikeda, porque gracias a él hoy puedo practicar en Argentina el budismo de Nichiren Daishonin, por ser mi guía espiritual cuando no puedo encontrarme, por tener las palabras justas para alentarme a seguir, siempre hacia adelante.

*“Entre los días de fecunda productividad
se insertan jornadas de incertidumbre
en que nada parece salir bien, y en que hasta
la materia misma responde con hostilidad;
es entonces cuando uno mismo
debe resistir al desaliento.”*

Marie Curie.

A mis padres

Los resultados del presente trabajo de tesis fueron parcialmente publicados en:

Tuchscher, L. P. N., Buzzola, F. R., **Alvarez, L. P.**, Lee, J. C. y Sordelli D. O. Diminished Clearance of Non – Capsulated *Staphylococcus aureus* from the Mammary Gland After Experimental Challenge. 2005. Infection and Immunity. 73(12): 7932-7937.

Alvarez LP, Barbagelata M.S., Gordiola M., Cheung A.L., Sordelli D.O. and Buzzola F.R. Salicylic Acid Diminishes *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharide type 5 Expression. 2010. Infection and Immunity. 78(3): en prensa.

Alvarez LP, Cheung AL, Sordelli DO and Buzzola FR. Effects of salicylic acid on Extracellular Adherence Protein of *Staphylococcus aureus*. Enviado a Infection and Immunity.

Alvarez L, Sordelli D, Buzzola F. Efecto del ácido salicílico en la infección persistente por *Staphylococcus aureus*. XVIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. Pucón, Chile. 23 al 26 de octubre de 2006.

Alvarez L, Barbagelata M, Cheung A, Lee J, Sordelli D y Buzzola F. Efecto del ácido salicílico sobre la virulencia de *Staphylococcus aureus*. XI Congreso Argentino de Microbiología. Córdoba, Argentina. 10 al 13 de octubre de 2007.

Alvarez L, Barbagelata M, Cheung A, Quiroga C, Sordelli D y Buzzola F. Regulation of virulence factors in *Staphylococcus aureus* is affected by salicylic acid. XLIII Reunión Anual de la Sociedad

Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 17 al 20 de noviembre de 2007.

L. P. Alvarez, M. S. Barbagelata, A. L. Cheung, D. O. Sordelli and F. R. Buzzola.. Salicylic Acid Diminishes *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharide Type 5 Expression. Presentación en poster. 108 General Meeting of American Society for Microbiology. Boston, Estados Unidos, 1 al 5 de junio de 2008.

L. P. Alvarez, M. S. Barbagelata, A. L. Cheung, D. O. Sordelli and F. R. Buzzola. Expression of *eap* in *Staphylococcus aureus* is Affected by Salicylic Acid. XII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Estambul, Turquía. 5 al 9 de agosto de 2008.

Alvarez LP, Barbagelata MS, Cheung AL, Cerquetti MC, Sordelli DO and Buzzola F. Influence of Salicylate on Expression of *Staphylococcus aureus* Extracellular Adherence Protein. XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Carlos Paz, Córdoba, Argentina. 8 al 11 de noviembre de 2008.

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

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT)

Universidad de Buenos Aires (UBA)

Índice

Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Dedicatoria.....	vii
Publicaciones.....	viii
Financiamiento	x
Índice.....	xi
Abreviaturas.....	xiii
Introducción.....	1
1. <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1. Generalidades.....	1
1.2. Patogénesis.....	2
1.3. Reguladores.....	3
1.3.1. <i>sae</i>	4
1.3.2. <i>mgrA</i>	6
1.4. Factores de virulencia.....	7
1.4.1. Polisacárido capsular.....	7
1.4.2. Adhesinas.....	8
1.4.2.1. <i>Eap</i>	9
1.5. Interacción de <i>S. aureus</i> con células eucariotas.....	11
2. Ácido salicílico.....	12
Hipótesis y Objetivos.....	15
Materiales y Métodos.....	17
1. Cepas bacterianas.....	17
2. Animales.....	17
3. Cultivo celular.....	17
3.1. Células epiteliales.....	17
3.2. Células endoteliales.....	18
4. Ensayo de invasión.....	18
5. ELISA para detectar TNF- α	19
6. Detección de ICAM-1 por citometría de flujo.....	20
7. Microscopía de fluorescencia.....	21
8. Extracción de ADN plasmídico.....	21
9. Preparación de células competentes.....	22

10. Electroporación de cepas bacterianas.....	22
11. Transducción de cepas bacterianas.....	23
12. Estudios de fusión transcripcional.....	23
13. Extracción de ARN.....	23
14. qRT-PCR.....	24
15. RT-PCR.....	24
16. Preparación de extractos de antígenos capsulares.....	25
17. Expresión de PC por inmunoprecipitación.....	25
18. Extracción de proteínas de pared con lisostafin.....	26
19. Preparación de exoproteínas.....	26
20. Solubilización de proteínas de superficie.....	27
21. Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).....	27
22. Modelo murino de colonización nasal.....	28
23. Análisis estadístico.....	28
Resultados	29
1. Efecto del SAL sobre la capacidad de internalización de <i>S. aureus</i>	29
2. Rol de la cápsula en la internalización.....	30
3. Efecto del SAL sobre la expresión del polisacárido capsular serotipo 5.....	31
4. Efecto del SAL sobre la expresión de proteínas.....	35
5. Efecto del SAL sobre la proteína Eap.....	36
6. Efecto del SAL sobre reguladores de los factores de virulencia.....	41
6.1. Sistema regulador <i>sae</i>	41
6.2. Regulador <i>mgrA</i>	46
7. Acción regulatoria de <i>mgrA</i> sobre Eap.....	50
8. Internalización de <i>S. aureus</i> en células endoteliales tratadas con SAL.....	53
9. Expresión de ICAM-1 en células endoteliales tratadas con SAL e infectadas con <i>S. aureus</i>	55
10. Producción de TNF- α en respuesta a la infección con <i>S. aureus</i> y al tratamiento con SAL.....	56
11. Efecto del SAL sobre la colonización intranasal de <i>S. aureus in vivo</i>	57
Discusión	59
Conclusiones	71
Referencias	74

Abreviaturas

ADNc: ADN copia
CifA: Factor de unión A
CifB: Factor de unión B
Cm: cloramfenicol
Coa: coagulasa
COX-1: ciclooxigenasa constitutiva
COX-2: ciclooxigenasa inducible
C_T: ciclo umbral
CYGP: Casaminoácidos Levaduras GliceroFosfato.
CYGP_w: medio CYGP sin glucosa
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM: Dulbeco's Modified Eagle's Medium
Eap: Proteína de adhesión extracelular
Efb: Proteína de unión al fibrinógeno extracelular
ELISA: enzimoimmunoensayo
Em: Eritromicina
Emp: Proteína de unión a la matriz extracelular
Fg: fibrinógeno
Fn: fibronectina
FnBP-A: Proteína de unión a la fibronectina A
FnBP-B: Proteína de unión a la fibronectina B
gfp: Proteína verde fluorescente
h: horas
H1a: α-hemolisina
H1a: β-hemolisina
ina: vía intranasal
ip: intraperitoneal
KDa: Kilo Daltons
LB: medio Luria Bertani
min: minutos
moi: multiplicidad de infección.
MSCRAMMs: componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas adhesivas de la matriz
Nuc: termonucleasa
PBMC: Células mononucleares de sangre periférica
PBS: buffer salino de fosfato
PC: polisacárido capsular
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF: fenilmetilsulfonil fluorado
rpm: revoluciones por minuto
qRT-PCR: PCR en tiempo real
RT-PCR: PCR de transcripción inversa
s: segundos

SAL: ácido salicílico
SDS: duodecil sulfato
SERAMs: repertorio expandido de moléculas adhesivas secretables
SFB: suero fetal bovino
SpA: Proteína A
SspA: serin proteasa A
TBE: Tris-Borato EDTA
TCRS: sistemas regulatorios de dos componentes
TEMED: Tetrametiletilendiamina
TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TSA: Agar Tripticasa de Soja
TSB: Caldo Tripticasa de Soja
UFC: Unidades formadoras de colonias

1. *Staphylococcus aureus*

1.1. Generalidades

Staphylococcus aureus es miembro de la familia Micrococcaceae. Esta bacteria coco Gram positivo se agrupa en racimos (Fig. 1). Desde el punto de vista bioquímico, los estafilococos son catalasa positivos, coagulasa positivos, oxidasa negativos y fermentan el manitol (34).

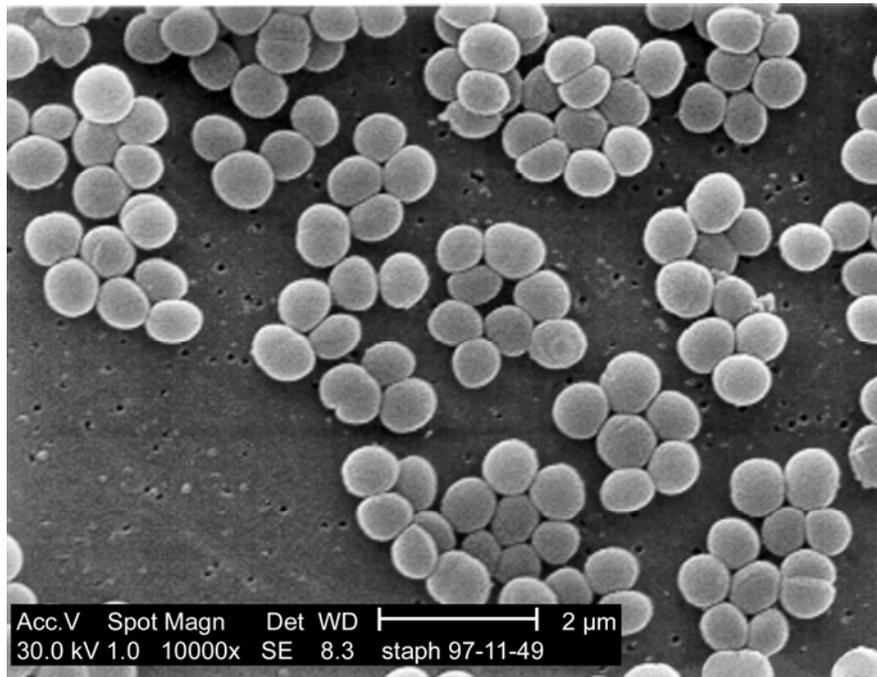


Figura 1. *Staphylococcus aureus*. Micrografía tomada por microscopía electrónica de barrido de colonias de *S. aureus* (114).

S. aureus es un microorganismo comensal que se aloja principalmente en las narinas anteriores. Aproximadamente el 20% de los individuos sanos son colonizados persistentemente con *S. aureus* y el 30% son colonizados intermitentemente. La colonización incrementa claramente los riesgos de infección (67). Por otra parte, *S. aureus* es una bacteria oportunista capaz de causar infecciones tanto a individuos de la comunidad como a pacientes hospitalizados. Puede generar infecciones de piel y tejidos

blandos e infecciones severas como osteomielitis, endocarditis y bacteriemia (89).

Para establecer la infección, *S. aureus* cuenta con una gran variedad de factores de virulencia cuya expresión está modulada por importantes reguladores globales.

1.2. Patogénesis

La patogénesis de *S. aureus* es un proceso complejo que involucra diferentes combinaciones de componentes de superficie y extracelulares, los cuales son expresados coordinadamente durante los diferentes estadios del proceso infeccioso. *S. aureus* expresa numerosas proteínas de superficie que median la adhesión al tejido del huésped para iniciar la infección. Estas adhesinas unen moléculas tales como colágeno, fibronectina (Fn), fibrinógeno (Fg) y juegan un rol clave en el inicio de infecciones endovasculares, osteoarticulares e infecciones asociadas a prótesis. Al respecto, cepas diferentes de *S. aureus* pueden tener una expresión diferencial de adhesinas, y por lo tanto podrían causar ciertos tipos de infecciones característicos (32, 86, 100).

Una vez que *S. aureus* se adhiere al tejido o a la prótesis, es capaz de crecer y persistir utilizando diferentes estrategias. *S. aureus* puede producir biopelículas, que le permiten evadir la respuesta inmune y la acción de los antibióticos (25). Además es capaz de invadir y sobrevivir dentro de células epiteliales y endoteliales, lo cual también le permitiría a la bacteria escapar de las defensas del huésped (3). Otra estrategia que utiliza *S. aureus* es la de formar “variantes de colonia pequeña” (VCP), las cuales contribuirían a las infecciones recurrentes y persistentes. Las VCP pueden *in vitro* evadir el sistema inmune sin causar daño al huésped, y pueden luego revertir a una forma más virulenta (110,

111). La principal defensa de *S. aureus* frente a los fagocitos es la producción de microcápsula antifagocítica (95). Por otro lado, la proteína A (SpA) se une a la porción Fc de las inmunoglobulinas y como resultado, puede prevenir la opsonización (31). Además, *S. aureus* secreta proteínas inhibidoras de la quimiotaxis (CHIPS) y la proteína de adhesión extracelular (Eap), las cuales interfieren con la extravasación de los neutrófilos al sitio de infección (17).

Durante el proceso infeccioso, *S. aureus* produce numerosas enzimas, como proteasas, lipasas y elastasas, que le permiten invadir y destruir el tejido del huésped y migrar hacia otros sitios. Esta bacteria también tiene la capacidad de inducir shock séptico, a través de la interacción del peptidoglicano, ácido lipoteicoico y α -hemolisina (Hla) con el sistema inmune (77). Además, muchas cepas producen la toxina TSST-1 que actúa como superantígeno y provoca el síndrome del shock tóxico (84). Otras cepas sintetizan toxinas exfoliativas capaces de causar el síndrome de la piel escaldada o impétigo (104).

La regulación coordinada de los factores de virulencia de *S. aureus* juega un rol central en la patogénesis. La expresión de adhesinas generalmente ocurre en la fase logarítmica de crecimiento, mientras que las proteínas secretadas como las toxinas, son producidas durante la fase estacionaria. En el transcurso de la infección la expresión temprana de las adhesinas permite la colonización inicial de tejidos, mientras que la producción tardía de toxinas facilita la diseminación de la bacteria (9).

1.3. Reguladores

La expresión coordinada de los factores de virulencia de *S. aureus* está directa o indirectamente influida por la acción de diversos reguladores globales. Existen dos grupos principales de

reguladores globales en *S. aureus*: los sistemas regulatorios de dos componentes y la familia de proteínas homólogas SarA (19, 83, 92).

Los sistemas regulatorios de dos componentes en procariotas son sensibles a señales ambientales y están constituidos por una histidin quinasa de membrana sensora y una proteína citoplasmática reguladora de la respuesta, que una vez activada por fosforilación se une a una secuencia específica del gen blanco (82). Los sistemas de este tipo caracterizados hasta ahora en *S. aureus* incluyen *agrCA*, ***saeRS***, *lytRS*, *arIRS*, *SrrAB*, *YycFG* y *VraRS* (19, 82).

La familia de proteínas SarA y el factor *sigB* son factores transcripcionales que se unen directamente a la región promotora de los genes blanco. La familia SarA se divide en tres subfamilias: a) estructuras de dominio único (*SarA*, *SarR*, *SarT*, *SarV* y *SarX*); b) estructuras de doble dominio (*SarS*, *SarU* y *SarY*); y c) estructuras de dominio único altamente homólogas a la familia MarR (*SarZ*, ***MgrA/ Rat***) (19).

1.3.1. ***sae***

El sistema de dos componentes *sae* activa la expresión de una amplia variedad de factores de virulencia tales como serin proteasa A (*SspA*), termonucleasa (*Nuc*), coagulasa (*Coa*), Hla, β -hemolisina (*Hlb*), *SpA*, *Eap*, proteína de unión a la matriz extracelular (*Emp*), y proteína de unión a la fibronectina–A (*FnBP-A*) probablemente a través de su interacción directa con estos genes (9, 37-40). Por el contrario, la expresión del operón *cap*, que codifica para la expresión de las proteínas involucradas en la síntesis del polisacárido capsular (PC), es reprimida por *sae* (121).

El locus *sae* está compuesto por cuatro marcos de lectura abiertos, dos de los cuales codifican para un regulador *saeR* y un sensor *saeS* (38). Los otros dos marcos de lectura abiertos (*saeP* y *saeQ*) se localizan río arriba de *saeRS* y codifican para proteínas que serían importantes para el funcionamiento del operon (94, 121). El gen *saeP* codifica para una lipoproteína y *saeQ* para una proteína de membrana (82). Para el locus *sae* se identificaron cuatro transcritos, A, B, C y D y dos promotores P_A y P_C (Fig. 2). El transcripto A (2,1 Kb) se inicia en el promotor P_A y cubre *saeR* y *saeS*. Este transcripto está presente desde el inicio del crecimiento bacteriano y disminuye su intensidad durante la fase media exponencial. Los transcritos B (2,4 Kb), C (3,1 Kb) y D (0,5 Kb), se inician desde el promotor P_C y aparecen en la fase media exponencial. El transcripto C cubre el locus completo y quizás sea procesado para generar B, que cubre *saeQ*, *saeR* y *saeS*. El transcripto D, que cubre sólo *saeP*, quizás sea un producto del procesamiento de C o un transcripto *de novo* (1).

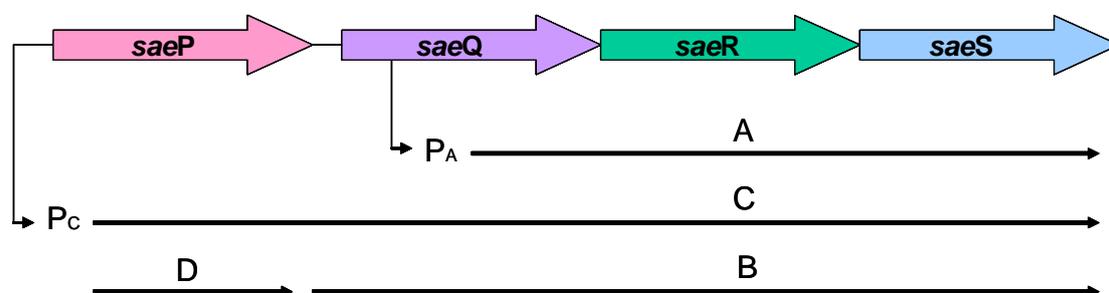


Figura 2. Esquema del locus *sae*. El locus *sae* está compuesto por cuatro genes y se transcribe desde dos promotores, P_A y P_C , generando cuatro transcritos (A, B, C y D).

El promotor P_C es autoinducido por *saeR* y *saeS*, mientras que P_A es reprimido por *saeRS*. Así, estos transcritos se expresan primero desde el promotor P_A y luego desde el promotor P_C (1). La activación del promotor P_C en la fase media exponencial representa una transición regulatoria clave dentro del locus *sae* y depende de otros determinantes regulatorios tales como *agr*, *sarA* y *sae* mismo.

Además, el promotor P_c es afectado por estímulos ambientales tales como pH, cloruro de sodio y glucosa o concentraciones subinhibitorias de antibióticos (94). Cabe destacar que la cepa Newman de *S. aureus* presenta una sustitución de un aminoácido en *saeS*, la cual es parcialmente responsable de su fenotipo, que incluye la activación constitutiva de P_c y la hiperproducción de Coa y Eap (1, 35, 82).

1.3.2. *mgrA*

Otro regulador global clave en *S. aureus* es *mgrA* (multiple gene regulator A), homólogo a la familia de proteínas de resistencia múltiple a antibióticos MarR de *E. coli* (2). MgrA controla la expresión de 350 genes, incluyendo los genes que codifican para varios factores de virulencia (PC, Nuc, Hla, Coa, SspA y SpA), genes involucrados en la autólisis (*lytRS*) y otros genes reguladores globales (*agrCA*, *arIRS*, *sarS* y *sarV*) (19, 55, 56, 78, 81). Asimismo, MgrA regula negativamente las bombas de eflujo NorA, NorB y Tet38, las cuales confieren resistencia a ciertos antibióticos como la ciprofloxacina (112, 125). Por otra parte, *mgrA* reprime la formación de biopelícula y modula la expresión de genes involucrados en la síntesis de pared celular y en el estrés osmótico (78, 124). MgrA activa la expresión de los genes *cap*, *hla* y *nuc*, mientras que reprime la expresión de *spa*, *coa* y genes autolíticos (55, 78, 81). Otra característica a destacar en cuanto a este regulador es que activa la expresión de exoproteínas, mientras que reprime la expresión de proteínas de superficie. Este modo de acción es similar a la regulación ejercida por *agr*, otro importante regulador global de *S. aureus* (92). El mecanismo por el cual *agr* regula transcripcionalmente sus genes blanco es aún desconocido. Luong *et al.* (78) especularon, basados en el paralelismo entre *agr* y *mgrA*, que *mgrA* quizás interactúe con *agr* en la regulación de las

exoproteínas y proteínas de superficie, ya que mutaciones en *mgrA* reprimen a RNAIII, la molécula efectora del sistema *agr*.

1.4. Factores de virulencia

1.4.1. Polisacárido capsular

El 90% de los aislamientos de *S. aureus* producen PC. A pesar de que se han descrito más de 11 serotipos capsulares, el 80% de los aislamientos provenientes de humanos expresan los serotipos 5 (PC5) y 8 (PC8) (Fig. 3).

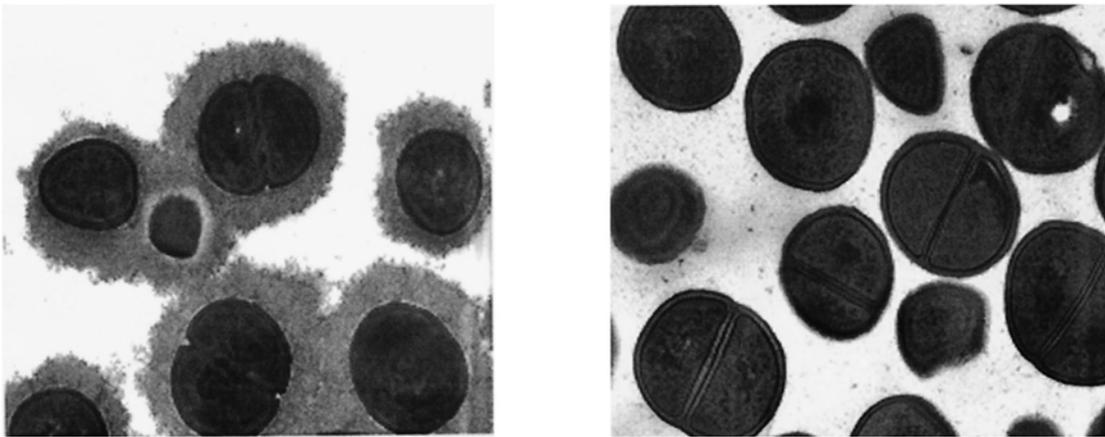


Figura 3. Micrografías de transmisión electrónica de células de *S. aureus* en fase estacionaria. Previo a la fijación, las bacterias fueron incubadas con anticuerpos específicos anti-PC5 para estabilizar y visualizar la cápsula. Cepa Reynolds productora de PC5 (izq.); mutante acapsular de *S. aureus* (der.) (118).

El operón *cap5* contiene 16 genes, desde *cap5A* hasta *cap5P* que se transcriben en la misma orientación (95). Los genes tipo específicos están localizados en la región central del locus e incluyen los genes *cap5H*, *cap5I*, *cap5J* y *cap5K* (Fig. 4).

Región común							Región PC5-específica				Región común				
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P

Figura 4. Organización del cluster genético *cap5* de *S. aureus*. Se muestran los genes de la región común a los clusters 5 y 8 y la región PC5 específica.

El locus *cap5* de *S. aureus* está bajo el control de una compleja red regulatoria. La expresión de PC es estimulada por el sistema *agr* (21), *mgrA* (81), el sistema *arlRS* vía *mgrA* (79), el factor σ^B (*sigB*) (6) y *sarA* (126). Por el contrario, el sistema *sae* es el único regulador descrito que inhibe la expresión de la cápsula (82, 121). Para la expresión total de PC se requiere una región repetida invertida de 10 pb localizada “río arriba” del promotor principal del operón *cap*, sugiriendo que un regulador que se une al ADN estaría involucrado (96).

La expresión de PC5 y PC8 *in vitro* es muy sensible a las señales ambientales. Las condiciones del medio de cultivo mostraron influir dramáticamente en la producción de PC. El crecimiento de *S. aureus* en un medio de cultivo sólido y bajo condiciones limitantes de hierro produce un aumento en la síntesis de PC8 (102, 103). Además, la producción de cápsula *in vitro* es inhibida por extracto de levadura, medio alcalino y anaerobiosis, pero se ve aumentada cuando las bacterias son cultivadas en un medio suplementado con cloruro de sodio al 5% (95).

El PC cumple un rol esencial para la patogénesis de *S. aureus*, ya que impide su opsonización con anticuerpos y con proteínas del complemento y por lo tanto, inhibe la fagocitosis por parte de los leucocitos polimorfonucleares humanos (95). En cuanto a su rol en la virulencia, se sabe que la pérdida de cápsula facilita la internalización en células endoteliales (101).

1.4.2. Adhesinas

Para iniciar la infección, *S. aureus* debe adherirse a la matriz extracelular y a las células eucariotas a través de diferentes proteínas de superficie llamadas “adhesinas”. Muchas de estas proteínas que se anclan a la pared de *S. aureus* fueron agrupadas

bajo la sigla MSCRAMMs por “componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas adhesivas de la matriz”. Entre ellas se encuentran las proteínas FnBP-A, FNBP-B, SpA, factor de agrupamiento A y B (ClfA y ClfB), entre otras (59).

Otro grupo de adhesinas son las designadas SERAMs por “repertorio expandido de moléculas adhesivas secretables”. Estas proteínas poseen la capacidad de ser secretadas al medio y luego volver a unirse a la superficie bacteriana. A este grupo pertenecen Emp, Coa, proteína de unión al fibrinógeno extracelular (Efb) y Eap (91).

1.4.2.1. Eap

Eap es una adhesina multimérica secretada de 62 KDa que juega un rol clave en el establecimiento de la bacteria para causar la enfermedad. Esta proteína se compone de 3 dominios diferentes que se unen formando tetrámeros (47). Hasta el momento, se han descrito 3 análogos de Eap (50, 65 y 72 KDa) en las cepas Mu50, FDA574 y Wood 46, respectivamente (36, 57, 61). El 98% de los aislamientos de *S. aureus* secretan alguna forma de esta proteína (11). Eap está regulada principalmente por *sae*, ya que se ha demostrado que una mutante *sae* no expresa niveles detectables de esta adhesina (49).

La importancia de Eap en la adherencia de *S. aureus* a células eucariotas ha sido demostrada por una disminución en la adherencia de una mutante *eap* a fibroblastos y células epiteliales. Asimismo, los anticuerpos anti-Eap reducen la internalización de *S. aureus* (45, 53, 69). Eap tiene un amplio rango de unión a proteínas plasmáticas incluyendo Fn, Fg y protrombina (132). Debido a su afinidad dual por proteínas plasmáticas y por la superficie bacteriana, cuando Eap es agregada exógenamente se

produce un aumento significativo de la adherencia de *S. aureus* a fibroblastos y células epiteliales (53, 54, 98). Por otro lado, Eap posee la habilidad de generar aglutinación de las bacterias, ya que esta proteína tiene una fuerte tendencia a formar agregados multiméricos (54).

Las funciones de Eap cobran aún más importancia si las FnBPs están ausentes, como en el caso de la cepa Newman de *S. aureus*, que presenta un codón de terminación prematuro en los genes que codifican para FnBP-A y B, generando proteínas truncadas (43). Además, la proteína Eap es expresada en altos niveles en la cepa Newman respecto a lo observado para aislamientos clínicos y otras cepas de *S. aureus* como la RN6390 (62). Por lo tanto, en la cepa Newman, Eap compensaría parcialmente la pérdida de unión a Fn.

Por otro lado, se han demostrado los potenciales efectos de la interacción de Eap con el huésped, que incluyen modulación de células T e inhibición de la extravasación de leucocitos (16, 74). La molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1 o CD54) es expresada por células endoteliales y actúa como receptor para integrinas, interviniendo en la adhesión firme de los leucocitos al endotelio (13). Eap interactúa con ICAM-1 sobre las células endoteliales y de esta manera estaría inhibiendo el reclutamiento de neutrófilos a la zona inflamada (16). Es por ello que se ha sugerido que Eap podría actuar como un factor antiinflamatorio. Sin embargo, otros estudios revelan que Eap también podría tener un rol proinflamatorio, ya que su interacción con ICAM-1 induciría la síntesis de IL-6 y TNF- α (116).

1.5. Interacción de *S. aureus* con células eucariotas

La adherencia de *S. aureus* a las células del huésped es el primer paso de la infección, mientras que su habilidad para sobrevivir en el ambiente intracelular es clave para la persistencia de este patógeno. Varios trabajos han demostrado la capacidad de *S. aureus* para internalizarse y sobrevivir en células fagocíticas no profesionales (4, 58, 87, 133). Más aún, recientemente se estableció que *S. aureus* permanece viable dentro del macrófago por 4 días, para luego escapar de las vacuolas intracelulares hacia el citoplasma y provocar la muerte celular. Los autores postularon que esta estrategia podría ser una potencial nueva vía de diseminación de esta bacteria patógena (70).

Las FnBPs son requeridas para el proceso de internalización en células eucariotas (119). Se propuso que la afinidad de la FnBP por la Fn unida a β 1-integrinas resultaría en la activación de vías de señalización intracelular en el huésped, lo cual llevaría a la fagocitosis mediada por actina de la bacteria adherida (50). Sin embargo, a pesar de que las FnBPs juegan un rol crucial en el proceso de internalización, no son indispensables, ya que *S. aureus* es capaz de ser internalizado aún en ausencia de estas proteínas (10). Más aún, no se encontró correlación entre el grado de internalización y la cantidad de FnBPs producidas por algunas cepas de *S. aureus* (52). Por otra parte, la unión de Eap a ICAM-1 facilitaría la adherencia de *S. aureus* a células endoteliales (16). Esto indica que el proceso de internalización de *S. aureus* es complejo y depende también de la presencia de proteínas secretadas como Eap, además de las proteínas covalentemente unidas a la pared (45, 48, 53).

2. Ácido salicílico

Las drogas antiinflamatorias no esteroideas son utilizadas ampliamente como agentes analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios en el tratamiento de diferentes patologías. Como ejemplo de estos compuestos se pueden citar a los salicilatos, como la aspirina; profenos, como el ibuprofeno; ácidos arilalcanoicos, como el diclofenac; entre otros.

En particular, la aspirina es ingerida regularmente por millones de individuos en todo el mundo debido a sus conocidas propiedades analgésicas y también es prescrita con propósitos definidos, incluyendo la prevención de infartos y el tratamiento del cáncer (66, 127). El compuesto activo de la aspirina, el ácido acetilsalicílico (ASA), inhibe la actividad catalítica de las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1 y 2), que son las enzimas responsables de la síntesis de moléculas proinflamatorias como las prostaglandinas a partir del ácido araquidónico (85). La COX-1 se expresa constitutivamente en todos los tejidos, pero especialmente en el riñón y en el tracto gastrointestinal. Su actividad radica en la protección del epitelio gástrico, de la función renal y de la agregación plaquetaria. La COX-2, por el contrario, es inducible por determinados estímulos como algunos mediadores químicos de la inflamación, por lo tanto mantiene los mecanismos inflamatorios y amplifica las señales dolorosas que surgen en las áreas inflamadas. El ASA inhibe más fuertemente la acción de COX-1 que la de COX-2 (85, 88).

La aspirina tiene una vida media relativamente corta en el plasma humano (20 min), ya que es rápidamente desacetilada y convertida a ácido salicílico (SAL). Por lo tanto, el SAL sería el responsable de las acciones antiinflamatorias, anticancerígenas y antineurodegenerativas de la aspirina. El SAL no inhibe directamente a COX-1 y COX-2, ya que no cuenta con el grupo

acetilo requerido para esta acción. Sin embargo, inhibiría por algún otro mecanismo aún desconocido la síntesis de prostaglandinas (134). Estudios recientes han demostrado que el SAL tiene diversas actividades celulares y moleculares incluyendo el control de la expresión génica. Al respecto, el SAL inhibe la activación del factor de transcripción nuclear κ B (NF κ B) y de c-Jun (reguladores de la expresión de genes proinflamatorios y de genes involucrados en otros procesos celulares como crecimiento, diferenciación y apoptosis) a concentraciones suprafarmacológicas (0,01 – 5 mM), mientras que a concentraciones farmacológicas (mayor a 5 mM) suprime la transcripción de COX-2 inducible (24, 68). Por otro lado, la expresión de ICAM-1 es inducida por la estimulación de receptores celulares por parte de mediadores inflamatorios, incluyendo lipopolisacárido y citoquinas y es regulada por NF- κ B (14, 120). Al respecto, células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) estimuladas con LPS y tratadas con salicilato de sodio a distintas concentraciones (entre 2 y 20 mM) presentaron una expresión disminuida de NF- κ B y de ICAM-1 (136).

El SAL, además de afectar a las células eucariotas, también es capaz de ejercer su acción sobre bacterias. En cuanto al rol de este compuesto en la virulencia bacteriana, se demostró que el SAL afectó la fisiología de *Pseudomonas aeruginosa* y atenuó su virulencia modificando la expresión de 331 genes (109). Por otro lado, la conformación en biopelícula de la cepa 8325 de *S. aureus* y su adherencia a la raíz de *Arabidopsis thaliana* fue disminuida por bajas concentraciones de SAL (108). Asimismo, un estudio realizado utilizando un modelo de endocarditis en conejo demostró que el tratamiento con SAL disminuyó la expresión de Hla y FnBP en *S. aureus* (72, 73). Riordan *et al.* (112) observaron un fenotipo menos adherente luego del tratamiento de *S. aureus* con SAL resultando en la atenuación de la virulencia. Además, el crecimiento en presencia de SAL de *Klebsiella pneumoniae* produjo una síntesis

disminuida de su gruesa cápsula (22, 23). También se demostró que los efectos del SAL incluyen la activación del operon *sigB*, el cual posee un rol importante en la modulación de la expresión de reguladores globales de *S. aureus* (72, 97). Asimismo, el crecimiento de *S. aureus* en presencia de SAL redujo la susceptibilidad a múltiples antibióticos (44, 105-107).

El conjunto de observaciones respecto del componente activo de la aspirina y las modificaciones que éste provoca en la virulencia bacteriana abre nuevos interrogantes sobre este fármaco ampliamente utilizado y conocido desde hace más de 100 años.

Hipótesis

S. aureus coloniza asintómicamente las narinas de humanos pero también es capaz de causar simples infecciones en la piel a severas infecciones que pueden llevar a la muerte. Para generar estas enfermedades *S. aureus* debe adaptarse a los diferentes ambientes del huésped. Es por ello que este patógeno expresa diferencialmente sus factores de virulencia de acuerdo a la acción de los sistemas que los regulan. Por cierto, la producción de los factores de virulencia secretados, adhesinas y PC puede ser modificada por diversos estímulos ambientales que actúan como señales de los sistemas regulatorios de *S. aureus*. En particular, el SAL es ampliamente utilizado en el mundo bajo la forma de aspirina. Este compuesto modifica la expresión de diversas moléculas en las células eucariotas, así como también en algunos patógenos bacterianos.

Por lo tanto, este trabajo postula que el SAL al actuar como una señal ambiental podría ejercer su efecto sobre la expresión de los factores de virulencia necesarios para la colonización e internalización celular de *S. aureus*, así como también sobre los sistemas regulatorios que los controlan. Además, el SAL induciría cambios en el huésped que afectarían su interacción con este patógeno. De este modo el curso de la infección podría verse alterado en aquellos pacientes infectados con *S. aureus* que ingieren aspirina regularmente.

Objetivo general

El objetivo del presente trabajo de investigación fue caracterizar el efecto del SAL sobre la internalización celular y colonización de *S. aureus*, así como también estudiar los cambios

inducidos por el SAL en el huésped y en este patógeno que modifican la interacción entre ambos.

Objetivos específicos

I) Investigar el efecto del SAL sobre la capacidad de internalización de *S. aureus* en células epiteliales.

II) Evaluar el impacto del SAL sobre la expresión transcripcional y fenotípica de PC5 e investigar su efecto biológico.

III) Estudiar si el SAL afecta la expresión de proteínas en *S. aureus*.

IV) Determinar los cambios inducidos por el SAL sobre la expresión de Eap a nivel transcripcional y fenotípico e investigar su efecto biológico.

V) Evaluar la acción del SAL sobre los reguladores globales *sae* y *mgrA*.

VI) Investigar si *mgrA* tiene alguna acción regulatoria sobre Eap.

VII) Estudiar los efectos del SAL sobre las células endoteliales determinando la capacidad de internalización bacteriana, así como también la expresión de TNF- α y de ICAM-1.

VIII) Establecer la acción del SAL en la colonización de *S. aureus in vivo*.

1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas usadas en este trabajo se listan en la tabla 1. Todas las cepas se conservaron a -20°C en caldo tripteína de soja (TSB) (Difco) con 20% de glicerol. *S. aureus* se cultivó a 37°C , 200 rpm por 18 h en caldo CYGP (casaminoácidos 10 g/litro, extracto de levadura 10 g/litro, glucosa 5 g/litro, NaCl 5.9 g/litro y glicerofosfato 60 mM) sin glucosa (CYGP_w) (93). Se adicionaron 0.36 mM o 2 mM de SAL al medio de cultivo cuando fue necesario. La cepa AH12pCXEap se cultivó en LB y luego de 2 h de incubación se adicionó xilosa a una concentración final de 0,5% (v/v) para inducir la expresión del plásmido. Para los experimentos de invasión celular, se precipitaron las bacterias por centrifugación, se lavaron con solución fisiológica estéril y se suspendieron en medio de invasión a una densidad igual a 10^7 UFC/ml.

2. Animales

Los experimentos *in vivo* se llevaron a cabo utilizando ratones machos exocriados de la cepa CF-1 de 6 a 8 semanas de edad. Los animales fueron provistos por el bioterio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Los ratones se mantuvieron durante los experimentos en condiciones estándar con una dieta de mantenimiento (Alimento Balanceado Cooperación) y agua corriente acidificada con HCl de acuerdo a las normas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Los animales se sacrificaron por asfixia con CO_2 .

3. Cultivo celular

3.1. Células epiteliales

Se utilizó la línea establecida de células epiteliales de glándula mamaria bovina MAC-T (gentilmente cedida por Nicolas Léeme,

Nexia Biotechnologies Inc.). El medio empleado para su crecimiento fue DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (GIBCO) con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO) inactivado por calor, 5 µg/ml de insulina, 1 µg/ml de hidrocortisona (Sigma), 44 mM de NaHCO₃, 100 U/ml de gentamicina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina. Antes de cada experimento, se sembraron 1.5x10⁵ células/pocillo en placas de cultivo de 24 o 48 pocillos y se crecieron durante 24 h a 37°C con 5% de CO₂ (12).

3.2. Células endoteliales

Se utilizó la línea establecida de células endoteliales humanas EA.hy926. Esta línea celular es un hibridoma inmortalizado de células HUVEC y la línea celular A549 (27). Se cultivaron en medio DMEM con 10% de SFB inactivado por calor, 100 U/ml de gentamicina, 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina y 100 U/ml de penicilina. Las células se incubaron durante 48 h en placas de 24 pocillos a 37°C con 5% de CO₂.

4. Ensayo de invasión

Las monocapas de células epiteliales o endoteliales crecidas en confluencia se incubaron o no con SAL 2 mM (Sigma) durante 2 h previamente a la infección. Posteriormente, las células se lavaron con buffer salino de fosfato (PBS) (GIBCO) y se suspendieron en medio DMEM fresco. Luego, las monocapas celulares se infectaron con una suspensión de *S. aureus* (moi=40) que contenía o no SAL 2mM. Transcurrida 1 h de incubación a 37°C con 5% CO₂, se realizaron 4 lavados con PBS para descartar la bacteria extracelular no adherida y se agregó a cada pocillo medio DMEM con 25 µg/ml de lisostafin (Sigma) conteniendo o no SAL 2 mM. Luego de la incubación a 37°C con 5% CO₂, se descartaron a diferentes tiempos

los sobrenadantes de los pocillos o se congelaron a -70°C y se lavaron las monocapas con PBS. Las células se trataron con $100\ \mu\text{l}$ de tripsina 0.25% -EDTA 0.1% (GIBCO) durante 5 min a 37°C y se lisaron por el agregado de $900\ \mu\text{l}$ de Tritón X-100 0.025% en agua destilada. Los lisados celulares se diluyeron serialmente y se sembraron en placas de agar tripteina de soja (TSA) para cuantificar la bacteria intracelular viable (12).

5. ELISA para detectar TNF- α

Se utilizó el equipo comercial BD OptEIA II (BD Biosciences) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, se adicionaron $100\ \mu\text{l}$ de muestra o solución estándar de TNF- α a una placa de 96 pocillos revestida con anticuerpos monoclonales anti-TNF- α humano. Se incubaron las placas a temperatura ambiente por 2 h. Se realizaron 5 lavados con la solución correspondiente y se agregaron $100\ \mu\text{l}$ de la solución de anticuerpo monoclonal biotinilado anti-TNF- α humano y peroxidasa conjugada a estreptavidina. Luego de 1 h de incubación a temperatura ambiente, se realizaron 7 lavados. Posteriormente, se adicionaron $100\ \mu\text{l}$ de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. Luego, se agregaron $50\ \mu\text{l}$ de la solución comercial para detener la reacción y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA (Termo electron, Multiskan ex). La concentración de TNF- α se calculó comparando los valores de absorbancia obtenidos con la curva estándar.

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados.

Cepa/ plásmido	Descripción	Fuente
Cepas		
Newman	Aislamiento clínico (ATCC 25904); PC5+	(26)
Newmansae	Mutante <i>sae</i> por transducción (<i>saeS::ermB</i>)	Este trabajo
RN6390	Cepa de laboratorio relacionada a 8325-4	(71)
RN6390sae	Mutante <i>sae</i> por transducción (<i>saeS::ermB</i>)	(121)
JL278	Cepa Reynolds; PC5+	(131)
JL801	Mutante isogénica de Reynolds (PC5+) que no expresa PC5	(131)
AH12	Mutante <i>eap</i> de la cepa Newman (<i>eap::ermC</i>)	(53)
AH12pCXEap	AH12 complementada con pCXEap	(53)
ALC2547	Mutante <i>mgrA</i> de la cepa Newman (<i>mgrA::ermC</i>)	(55)
ALC4483	Mutante <i>sae</i> por delección de la cepa Newman	(75)
ALC4241	Newman con pALC2335	Este trabajo
ALC1842	Newman con pALC1766	(126)
ALC5163	Newman con pALC4991	(75)
ALC6141	Newman con pALC2566	(55)
ALC3257	Newman con pALC1484	(83)
R11	Newman con plásmido conteniendo FnBP salvaje	Dr. Massey
R0	Newman con plásmido conteniendo FnBP defectuosa	Dr. Massey
R11 <i>eap</i>	Mutante <i>eap</i> de R11	Dr. Massey
Plásmidos		
pALC1484	Derivado de pSK236 que contiene el gen <i>gfp_{uvr}</i> sin promotor precedido por un sitio de unión al ribosoma de <i>S. aureus</i>	(83)
pALC2335	Derivado de pALC1484 que contiene el promotor del gen <i>eap</i> río arriba del gen <i>gfp_{uvr}</i>	Dr. Cheung
pALC1766	Derivado de pALC1484 que contiene el promotor principal del gen <i>cap5</i> río arriba del gen <i>gfp_{uvr}</i>	(126)
pALC4991	Derivado de pALC1484 que contiene el promotor <i>sae P_c</i> río arriba del gen <i>gfp_{uvr}</i>	(75)
pALC2566	Derivado de pALC1484 que contiene el promotor <i>mgrA</i> río arriba del gen <i>gfp_{uvr}</i>	(56)
pCXEap	Plásmido pCX19 inducible por xilosa conteniendo el gen <i>eap</i>	(53)

6. Detección de ICAM-1 por citometría de flujo

Las células EA.Hy926 se incubaron con las cepas bacterianas respectivas y se trataron con SAL 2 mM según lo descrito en el punto 4 de Materiales y Métodos. Para el control positivo de estimulación de la expresión de ICAM-1 las células se incubaron con 1 µg/ml de LPS de la cepa de E. coli 0111:B4. La expresión de ICAM-1

se detectó a las 6 h post infección. Brevemente, las células se trataron con tripsina 0,25%-EDTA 0,02% y se incubaron a 4°C con una dilución 1/400 del anticuerpo anti-CD54 humano conjugado a peroxidasa (clon HA58, BD Pharmingen) durante 20 min en oscuridad. A fin de detectar la unión no específica, el anticuerpo anti-CD54 se reemplazó por una concentración equivalente de IgG₁ inespecífica. Luego, las células se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído 1% durante 15 min a 4°C y se analizaron en un citómetro de flujo (citofluorómetro FACScan, programa FCS Express V3). El citómetro se calibró para examinar 10000 células por experimento. Los umbrales para calcular el porcentaje de células positivas se determinó mediante el uso de controles de isotipo.

7. Microscopía de fluorescencia

Las células MAC-T se crecieron sobre cubreobjetos. Luego, se infectaron con la cepa ALC4241 de *S. aureus* (moi:30) y se incubaron durante 1 h a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Luego de la infección, las monocapas se lavaron con PBS 1X y se trataron con lisostafin 25 µg/ml durante 1 h. Los cubreobjetos se lavaron con PBS 1X y se tiñeron con los colorantes fluorescentes azul de Evans y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) que tiñen el citoplasma de rojo y el ADN doble cadena de azul, respectivamente (Merck). Los cubreobjetos se visualizaron bajo un microscopio de fluorescencia (Nikon, Eclipse 600).

8. Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se realizó utilizando el equipo comercial QIAprep Miniprep (QIAGEN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, previo tratamiento de la bacteria con lisozima (10 mg/ml) (Sigma) y lisostafin (5 mg/ml). Los productos

de la extracción se cuantificaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en buffer TBE 1X (Tris-Borato EDTA) por comparación con un marcador de peso molecular y concentración (Precision Mass) (Bio-Rad).

9. Preparación de células competentes

Se realizó un cultivo en 3 ml de caldo LB a partir de una colonia aislada de *S. aureus* y se incubó durante 18 h a 37°C y 200 rpm en un incubador orbital. Luego, se realizó una dilución 1/10 del cultivo en caldo LB y se incubó a 37°C con agitación hasta DO_{650} : 0,5. El cultivo se colocó en hielo durante 15 min para detener el crecimiento bacteriano. Se cosecharon las células por centrifugación a 4°C, 12000 rpm, 15 min y se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril y un lavado con glicerol al 10%. El precipitado así obtenido se suspendió en 15 ml de glicerol al 10% y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Las células se centrifugaron, se suspendieron en glicerol al 10%, se alicuotaron y se conservaron a -70°C.

10. Electroporación de cepas bacterianas

Las células competentes de la cepa Newman de *S. aureus* se incubó con el plásmido a incorporar (pALC2335) (Tabla 1) durante 20 min a temperatura ambiente y luego 10 min en hielo. La electroporación se realizó a 2,3 Kv; 100 Ohms; 25 μ F e inmediatamente se agregaron 900 μ l de caldo TSB. Luego de incubar las bacterias electroporadas durante 1 h a 37°C en baño de agua, se sembraron en placas de TSA con 10 μ g/ml de cloramfenicol (Cm).

11. Transducción de cepas bacterianas

Se indujo el ciclo lítico del fago ϕ -11 lisógeno de la cepa de *S. aureus* 8325-4 utilizando 1 $\mu\text{g/ml}$ de mitomicina C. Las transducciones se realizaron en medio sólido conteniendo Cl_2Ca a una *moi* entre 0,5 y 1. El lisado obtenido a partir de la cepa RN6390sae (Tabla 1) se utilizó para infectar la cepa Newman de *S. aureus*. Las cepas transductantes así obtenidas se seleccionaron en medio TSA con 10 $\mu\text{g/ml}$ de eritromicina (Em).

12. Estudios de fusión transcripcional

Se realizaron diluciones 1/100 de los cultivos de *S. aureus* y se incubaron a 37°C con agitación en caldo CYGP_w con el agregado de 50 $\mu\text{g/ml}$ (0,36 mM) de SAL cuando fue necesario. Se transfirieron las alícuotas tomadas a cada hora a microplacas de 96 pocillos y se midieron la densidad óptica (DO_{650}) y la fluorescencia ($F_{485/516}$) durante 9 h en un fluorómetro FL600 (BioTek Instruments). La actividad de los promotores se graficó como la media de la relación F/DO para minimizar las variaciones por cambios en la densidad óptica entre experimentos. Se utilizaron los valores medios de tres lecturas para realizar la estadística.

13. Extracción de ARN

El ARN bacteriano se extrajo utilizando Trizol (Gibco BRL) y esferas de sílica de 0.1 mm de diámetro en un agitador de alta velocidad (Biospec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante a partir de cultivos en DO_{650} :1,3. El ácido nucleico extraído se trató con ADNasa usando el equipo comercial TURBO DNFree™ (Ambion) siguiendo el protocolo del fabricante. La cuantificación del ARN extraído se realizó espectrofotométricamente mediante lectura de la absorbancia a 260 nm.

14. Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa en tiempo real (qRT-PCR)

La síntesis del ADNc se realizó con el equipo comercial Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche) utilizando cebadores al azar. La PCR en tiempo real se llevó a cabo usando los equipos LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) y los siguientes pares de cebadores: *cap5H-f* 5'-CCA GTG AAT TGT TTG CAA CG-3'; *cap5H-r* 5'-CAT TTT CCC AAT AAA TGT TGA AAG-3'; *mgrA-f* 5'-GGG ATG AAT CTC CTG TAA AC-3'; *mgrA-r* 5'-GCT GAA GCG ACT TTG TCA GA-3'; *saeRS-f* 5'-ATG CTA ATA CCG TGA ATG TCC A-3'; *saeRS-r* 5'-TGG CCG TTA AAC CAC ATT AAA-3' (amplifican los transcritos *sae* de 3,1; 2,4; y 2,0 Kb); *gyrB-f* 5'-GGT GCT GGG CAA ATA CAA GT-3'; y *gyrB-r* 5'-TGG GAT ACC ACG TCC GTT AT-3'. La síntesis del transcripto *gyrB* se utilizó como calibrador y como control interno para normalizar los datos. Las condiciones de ciclado fueron 95°C por 10 min seguidos por 45 ciclos de 95°C por 10 s, 55°C por 10 s y 72°C por 15 s, y 1 ciclo de 40°C por 30 s. El número de copias de cada muestra se determinó con el programa LightCycler. Se estableció el análisis con unidades arbitrarias tomando como 1 al nivel de transcritos de la cepa sin tratar normalizada al transcripto *gyrB*. Además, se realizó el análisis según Lyvak *et al.* (76) en el cual, el valor $-\Delta\Delta C_T$ representa la diferencia del ciclo umbral (C_T) entre el blanco y el control (*gyrB*) tratados con SAL menos la diferencia en C_T entre el gen blanco y control no tratados.

15. RT-PCR

El ADNc se sintetizó como se describió previamente. A partir del ADNc se realizó una RT-PCR utilizando los siguientes cebadores específicos: *eap-f* 5'-TAG AGG TAT CGG GGA ACG TG-3'; *eap-r* 5'-TTG GTG TTG ATG TGC CAT TT-3'; *gyrB-f* 5'-GGT GCT GGG CAA

ATA CAA GT-3´; y *gyrB*-r 5´-TGG GAT ACC ACG TCC GTT AT-3´. Las condiciones de ciclado fueron: 94°C por 5 min seguido de 20 ciclos de 94°C por 30 s, 58°C por 30 s y 72°C por 30 s, y 1 ciclo de 72°C por 7 min. Los transcriptos amplificados se visualizaron a través de electroforesis en geles de agarosa teñidos con BrEt.

16. Preparación de extractos de antígenos capsulares

S. aureus se cultivó por 24 h a 37°C en agar Columbia (Difco) suplementado con 2% de NaCl para favorecer la producción de PC y conteniendo 0.36 o 2mM de SAL cuando fue necesario. Los controles se cultivaron en el mismo medio, pero sin el agregado de SAL. Se cosecharon todas las colonias de una placa en 1 ml de PBS 10 mM (NaCl 0.15 M, pH 7.2) y las suspensiones bacterianas se autoclavaron por 1 h a 121°C. Las bacterias se precipitaron por centrifugación a 10000 x g y los sobrenadantes se filtraron con filtros de 0,45 nm. Los extractos capsulares se conservaron a -20°C. Las cepas Reynolds PC5+ y PC- se utilizaron como controles positivo y negativo de expresión capsular, respectivamente (123).

17. Expresión de PC por inmunoprecipitación

Sobre un portaobjetos se preparó un gel delgado de agarosa al 1% y se realizaron ocho orificios circulares alrededor de un orificio central. En el orificio central se adicionaron 30 µl de antisuero capsular tipo 5 absorbido y sobre los demás orificios se agregaron 30 µl de diluciones seriadas al medio de los extractos bacterianos, incluyendo los controles positivo y negativo (65). El portaobjetos se colocó en una cámara húmeda a temperatura ambiente para permitir la inmunodifusión de los antígenos capsulares y del antisuero. Luego de 24 h las líneas de precipitación

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

18. Extracción de proteínas de pared con lisostafin

Un cultivo de 30 ml de *S. aureus* incubado durante 20 h en CYGP_w se centrifugó 15 min a 3600 x g. El sobrenadante se reservó para preparar las exoproteínas (ver punto 19). El precipitado se suspendió en 0,6 ml de buffer de digestión (sacarosa 30% en 0,05 M Tris pH 7.5 con NaCl 0.145 M) conteniendo 100 µg de lisostafin. La solución de sacarosa se utilizó como medio hipertónico para estabilizar los protoplastos que se formaron durante la digestión con lisostafin. Se adicionó fenilmetilsulfonil fluorado (PMSF) 1mM para controlar la actividad proteolítica de las enzimas liberadas durante la lisis celular. La mezcla celular se incubó durante 1 h a 37°C con rotación a 24 rpm. Los protoplastos se removieron por centrifugación a 8000 x g por 10 min, y el sobrenadante se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El sobrenadante conteniendo los antígenos de pared celular se alícuotó y se conservó a -70°C (20).

19. Preparación de exoproteínas

Las exoproteínas contenidas en el sobrenadante por centrifugación en el punto 18, se precipitaron adicionando 3 ml de ácido tricloroacético al 100% (Sigma). Luego de la incubación durante 18 h a 4°C, el precipitado se centrifugó 70 min a 8500 x g y a 4°C. Finalmente se efectuaron tres lavados con etanol helado al 70%. Las proteínas se secaron al aire durante 30 min. Los extractos se disolvieron en 0,5 ml de Tris 0,1 M conteniendo PMSF 2mM y las alícuotas se conservaron a -70°C (5).

20. Solubilización de proteínas de superficie

Se cultivaron las bacterias en CYGP_w a 37°C, 200 rpm hasta DO₆₀₀: 1,3 y se centrifugaron 5 min a 6000 x g. El precipitado se suspendió en 0,5 ml de duodecil sulfato de sodio (SDS) 2% (Sigma), se calentó a 95°C por 5 min, y se centrifugó durante 5 min a 10000 x g. El sobrenadante se alicuotó y se conservó a -70°C (53).

21. Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Todas las muestras proteicas se separaron en un gel de poliacrilamida al 12%. El gel separador al 12% se compuso de 4 ml de acrilamida 30% / bisacrilamida 8%; 2,5 ml de Tris HCl 1,5 M pH 8,8; 3,3 ml de agua destilada; 0,1 ml de SDS 10%; 0,1 ml de persulfato de amonio 10%; 4 µl de tetrametiletilendiamina (TEMED). El gel concentrador al 4% se compuso de 1,3 ml de acrilamida 30% / bisacrilamida 8%; 2,5 ml de Tris HCl 0,5 M pH 6,8; 6,1 ml de agua destilada; 0,1 ml de SDS 10%; 50 µl de persulfato de amonio 10%; 10 µl de TEMED. Las muestras se suspendieron en buffer de Laemmli 5X (SDS 10%; glicerol 50%; azul de bromofenol 0,3%; Tris-HCl 50mM; β-mercaptoetanol 5%), se hirvieron durante 3 min y se sembraron en los pocillos del gel. El gel se sumergió en buffer de corrida 1X y se corrió a 40V durante 30 min y a 110V por 2 h. Luego, los geles se tiñieron con azul de Coomassie 0,25% durante 15 min y se decoloraron con 3 cambios de solución de destinción (metanol 30%, ácido acético 10% y agua destilada 60%).

22. Modelo murino de colonización nasal

Grupos de 10 ratones machos se inocularon con 150 μl de SAL 100 mM o con PBS 1X por vía intraperitoneal. Luego de 30 min, ambos grupos de ratones se inocularon por vía intranasal (ina) con 10 μl de una suspensión bacteriana de 1×10^7 UFC en solución fisiológica. A las 4 h los ratones se sacrificaron, las narinas se extirparon y se realizaron homogenatos en 400 μl de TSB. Alícuotas de las muestras así obtenidas se sembraron en placas de TSA para determinar el número de UFC/ml. Luego de 24 h a 37°C se contaron las colonias.

23. Análisis estadístico

Los datos no paramétricos se analizaron con el test Mann-Whitney utilizando el programa GraphPad (PRISM, version 4.0). Se consideraron significativos los valores de P menores a 0,05. Los datos provenientes de los ensayos de ELISA se analizaron con el test Kruskal-Wallis. Los datos provenientes de las qRT-PCR se analizaron según lo propuesto por Livak *et al* (76).

1. Efecto del SAL sobre la capacidad de internalización de *S. aureus* en células epiteliales

Trabajos previos demostraron una disminución en la capacidad de adherencia de *S. aureus* a células endoteliales cuando las bacterias fueron expuestas al SAL (7, 72). A fin de determinar el efecto del SAL sobre la internalización de *S. aureus* se utilizó la línea establecida de células epiteliales MAC-T. Los ensayos de invasión se llevaron a cabo utilizando dos cepas de laboratorio con bagajes genéticos diferentes, la cepa Newman y la cepa RN6390. En base a lo reportado por otros autores se utilizó una concentración de SAL (0,36 mM), que representa los niveles alcanzados en suero humano luego de la ingestión de aspirina en bajas dosis (72, 90, 99). En experimentos preliminares se determinó que la concentración de SAL utilizada no afectó el crecimiento de *S. aureus*.

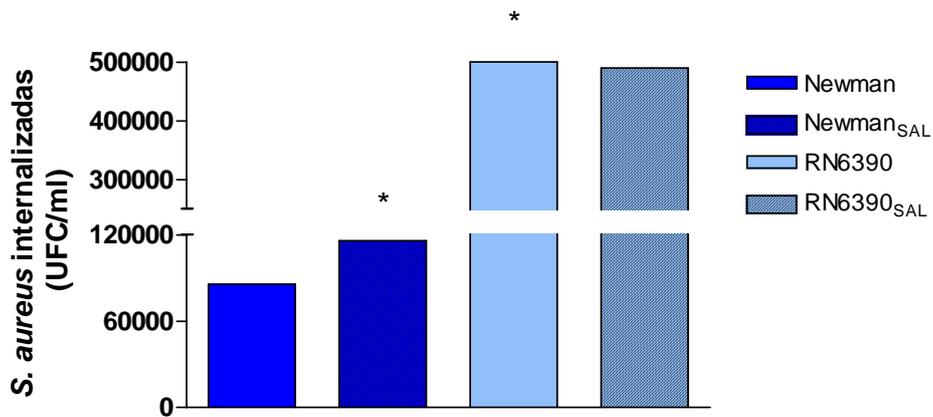


Figura 1. Efecto del SAL sobre la internalización de *S. aureus*. Se infectó una monocapa de células MAC-T en confluencia con los inóculos bacterianos previamente tratados o no con SAL. Cada barra representa la mediana de las UFC/ml internalizadas de un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Newman: $8,5 \times 10^4$ vs Newman_{SAL}: $1,1 \times 10^5$ UFC/ml, * $p < 0,01$; Newman vs RN6390, * $p < 0,01$, Mann-Whitney test.

Para realizar los ensayos de invasión las monocapas celulares se infectaron con una suspensión de *S. aureus* previamente tratada o no con SAL. Transcurrida 1 h de incubación a 37°C en atmósfera

de 5% de CO₂, se agregó lisostafin para eliminar a las bacterias no adheridas. Luego de 2 h de incubación, las células se lisaron y se realizaron los recuentos del número de bacterias intracelulares. En la figura 1 se observa que el tratamiento con SAL produjo un incremento significativo en la internalización de la cepa Newman. Sin embargo, el tratamiento con SAL no afectó la capacidad de invasión celular de la cepa RN6390. En concordancia con lo reportado por Pohlmann-Dietze *et al.* (101) en células endoteliales, la cepa RN6390 se internalizó en mayor medida que la cepa Newman en células MAC-T. Cabe destacar que la cepa Newman expresa PC5, mientras que la cepa RN6390 no expresa PC debido a que posee una mutación puntual en el gen esencial *capE5* (130). Por lo tanto, el efecto del SAL sobre la capacidad de internalización de *S. aureus* podría ser dependiente de la cepa.

2. Rol de la cápsula en la internalización

Otros autores observaron que la ausencia de cápsula genera una capacidad de adhesión aumentada de *S. aureus* a las células endoteliales (101). Al respecto, se estableció que la cepa Newman (PC5+) se internalizó en menor medida que la cepa RN6390 (PC5-) (Fig. 1). La diferencia hallada, sin embargo, no puede ser atribuida sólo a la presencia o no de PC, ya que ambas cepas poseen bagajes genéticos diferentes. Además, los resultados obtenidos en la figura 1 sugieren que el SAL podría estar afectando la producción de PC y de esta forma modificar la capacidad de invasión de *S. aureus*. Consecuentemente, se realizaron ensayos de invasión utilizando la cepa Reynolds (PC5+) y su mutante isogénica acapsular (PC5-) en presencia o no de SAL, a fin de determinar el efecto de este compuesto sobre la internalización de cepas capsuladas. Los resultados demostraron que la cepa Reynolds capsulada posee una menor capacidad de internalización comparada con la mutante PC5-

(Fig. 2). Más aún, la cepa Reynolds PC5+ tratada con SAL mostró una capacidad de internalización significativamente mayor respecto de la no tratada. Cabe destacar que no se observaron diferencias significativas entre el grado de invasión de la cepa PC5+ tratada con SAL y su mutante acapsular no tratada (Fig. 2).

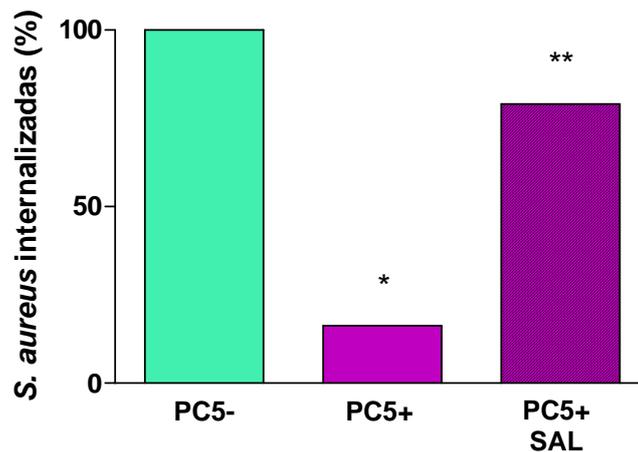


Figura 2. Efecto del SAL sobre la invasión de cepas Reynolds de *S. aureus*. Monocapas de células MAC-T se infectaron con los inóculos bacterianos previamente tratados o no con SAL. Se muestra el porcentaje de internalización de *S. aureus* relativo a la cepa PC5- de un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Cepas Reynolds, PC5+: 16,3% vs PC5+_{SAL}: 79%, ** $p < 0,01$; PC5-: 100% vs PC5+: 16,3%, * $p < 0,01$; Mann-Whitney test.

Estos resultados indican que las cepas capsuladas de *S. aureus* tratadas con SAL exhiben una capacidad incrementada para invadir células epiteliales MAC-T, probablemente debido a la expresión disminuida del PC.

3. Efecto del SAL sobre la expresión del polisacárido capsular serotipo 5

Con el fin de confirmar un descenso en la producción de PC5 provocado por la acción del SAL, se realizaron ensayos de actividad transcripcional. Estudios previos mostraron que la expresión del operón *cap* está manejada principalmente por el promotor localizado al principio del operón (96, 115).

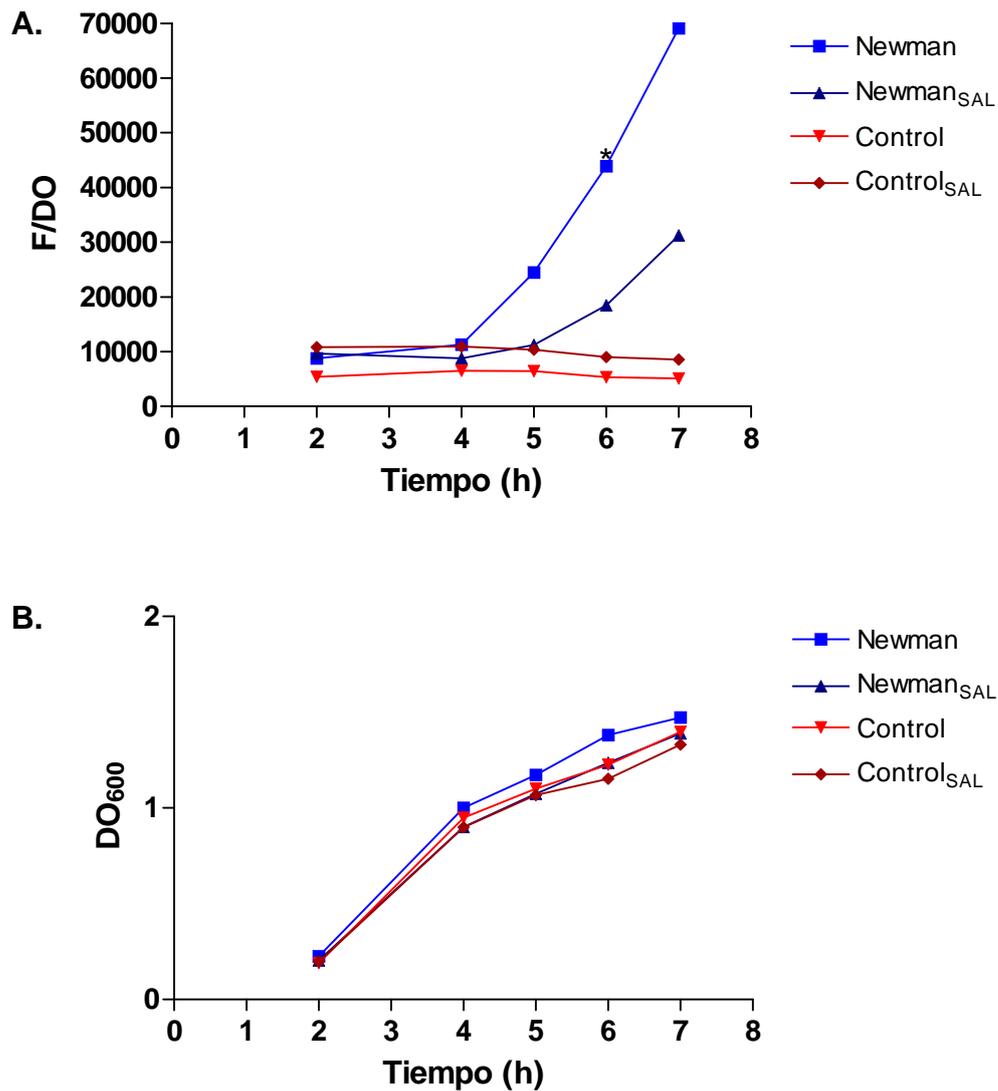


Figura 3. Actividad del promotor *cap* bajo la acción del SAL. **A.** La actividad del promotor se determinó por fusión con *gfp* y medición de la fluorescencia en relación con la densidad óptica ($F_{405/516}/DO_{600}$) en función del tiempo. Se muestra un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Control: cepa Newman transformada con plásmido pALC1484 conteniendo el gen *gfp* sin promotor. Tiempo 6h, Newman: 43887 F/DO vs Newman_{SAL}: 18461 F/DO, * $p < 0,0001$; Mann-Whitney test. **B.** Crecimiento bacteriano (DO_{600}) en función del tiempo.

Por lo tanto, la expresión del promotor *cap5* fue monitoreada con la fusión del promotor principal *cap5* al gen *gfp* midiendo la emisión de fluorescencia. Inicialmente, la cepa Newman transformada con el plásmido que contiene la fusión *Pcap-gfp* (Tabla 1) se incubó en presencia o ausencia de SAL. A cada hora se tomaron alícuotas del cultivo y se midieron la $F_{485/516}$ para detectar

la fluorescencia emitida por la *gfp* y la DO_{600} para medir el crecimiento bacteriano. Los resultados obtenidos se analizaron graficando $F_{485/516}/DO_{600}$ a fin de independizarse de las diferencias en el crecimiento bacteriano que pudieran presentar las cepas.

Los valores de DO_{600} demuestran que el tratamiento de la cepa Newman con SAL no afectó su crecimiento (Fig. 3B). En la figura 3A se observa que el promotor del cluster *cap* fue influido negativamente por el SAL a lo largo del tiempo.

Por otro lado, se realizó una qRT-PCR con el fin de determinar los niveles del transcripto *cap5H* alcanzados luego del tratamiento de la cepa Newman con SAL. Para ello, las suspensiones bacterianas tratadas o no con SAL se cultivaron hasta $DO_{600}:1,3$ y se procesaron para extraer el ARN y realizar la qRT-PCR utilizando los cebadores específicos según lo descrito en Materiales y Métodos. La figura 4 muestra una disminución de los transcriptos correspondientes al gen *cap5H* de la cepa Newman luego del tratamiento con SAL. Además, los resultados se analizaron según Livak *et al.* (76) el cual establece que un valor de $2^{-\Delta\Delta CT}$ menor a 1 corresponde a una disminución en la expresión del transcripto de interés luego del tratamiento, mientras que un índice mayor a 1 indica un aumento en la expresión. El valor $2^{-\Delta\Delta CT}$ para el transcripto *cap* fue de 0,5.

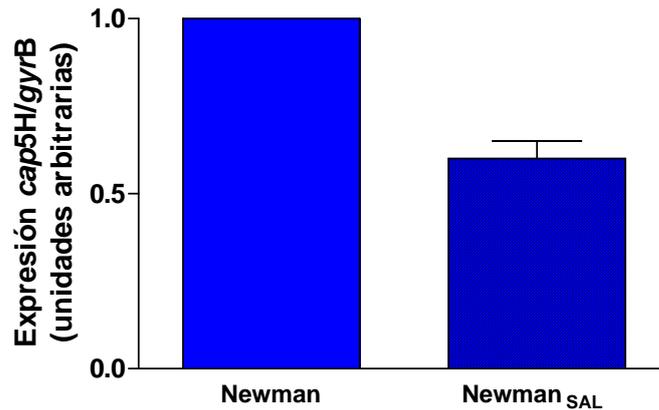


Figura 4. Efecto del SAL sobre la transcripción del gen *cap5H*. El estudio transcripcional se llevó a cabo por RT-PCR en tiempo real a partir de ARN extraído de la cepa Newman previamente tratada o no con SAL. Cada barra representa la expresión del ARNm *cap5H* normalizada a la expresión del transcrito *gyrB* de 3 experimentos independientes expresada en unidades arbitrarias \pm DS.

Con el objetivo de analizar la expresión del PC a nivel fenotípico se realizaron ensayos de inmunoprecipitación doble con antisuero anti-PC5 específico. Para ello, diluciones seriadas al medio de los extractos capsulares de la cepa Newman tratada o no con SAL, se depositaron sobre los orificios de un gel delgado de agarosa. En el orificio central se colocó la solución de antisuero anti-PC5. Luego de 24 h de incubación en una cámara húmeda para permitir la inmunodifusión, se observaron las líneas de precipitación. En la figura 5 se observa un título de expresión de PC igual a 4 para la cepa Newman sin tratar. Cuando la cepa Newman se trató con SAL a dosis bajas (0,36 mM) el título de expresión de PC descendió a 2. Más aún, el aumento en la concentración de SAL (2 mM) evidenció este descenso en la expresión de PC, ya que el título alcanzado fue igual a 1. La concentración 2 mM de SAL utilizada no afectó el crecimiento bacteriano. Estos resultados demuestran que el SAL provocó una disminución de la expresión de PC5 a nivel fenotípico. Además, este efecto es mayor cuanto mayor es la dosis de SAL utilizada.

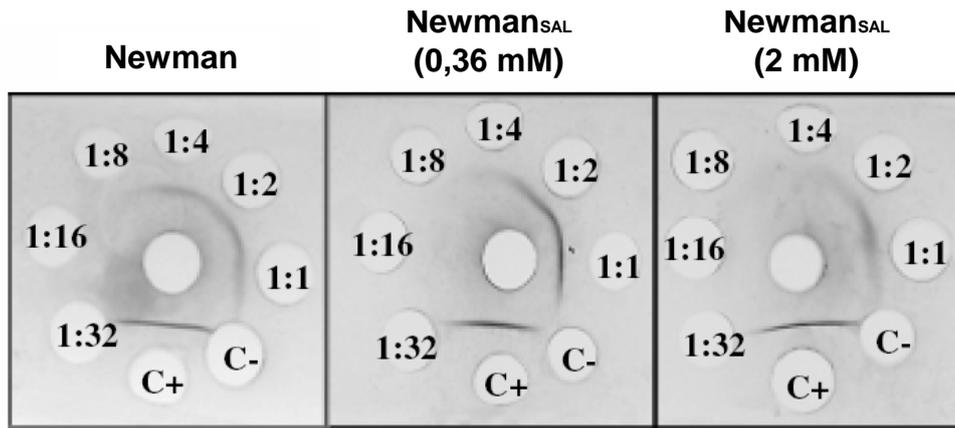


Figura 5. Efecto del SAL sobre la expresión fenotípica de PC5. La expresión de cápsula se ensayó mediante inmunoprecipitación doble con diluciones seriadas al medio de los extractos capsulares de la cepa Newman previamente incubada o no con 0,36 mM o 2 mM de SAL. C+: Extracto capsular de la cepa Reynolds PC5+; C-: Extracto capsular de la cepa Reynolds PC5-.

El conjunto de los resultados obtenidos indican que el SAL afectó negativamente la expresión del PC de *S. aureus* tanto a nivel transcripcional como a nivel fenotípico. Este efecto fue dosis dependiente y sería el responsable del incremento de la capacidad de internalización de *S. aureus* en células epiteliales.

4. Efecto del SAL sobre la expresión de proteínas

Paralelamente se analizó si el aumento en la internalización alcanzado por la cepa Newman pretratada con SAL también podía deberse a una expresión diferencial de adhesinas. Para ello, se realizaron extracciones de las diferentes fracciones proteicas (exoproteínas, proteínas de pared y de superficie) de la cepa Newman tratada o no con SAL. Los extractos se visualizaron a través de SDS-PAGEs teñidos con azul de Coomassie. Según indican las flechas se observaron algunos cambios en el perfil de exoproteínas (Fig. 6A) y de proteínas de pared (Fig. 6B) de la cepa Newman luego del tratamiento con SAL.

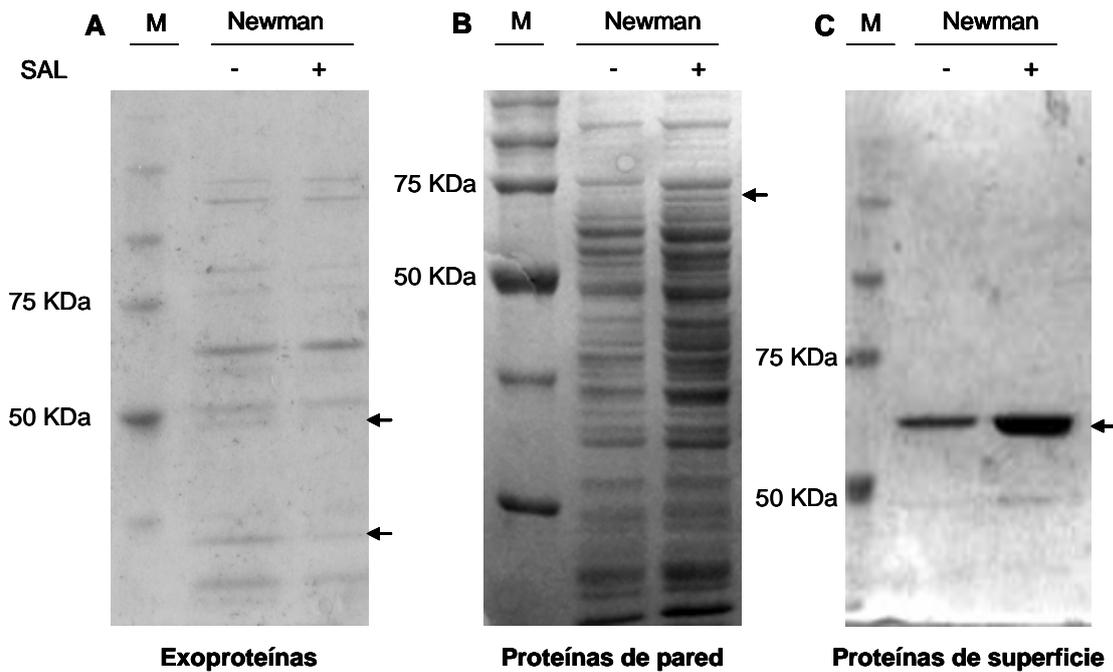


Figura 6. Expresión de proteínas de *S. aureus* bajo la acción del SAL. SDS-PAGEs de exoproteínas (A), proteínas de pared (B) y proteínas de superficie (C) de la cepa Newman de *S. aureus*. Las bandas proteicas se visualizaron por tinción con azul de Coomassie. M: Marcador de peso molecular. Las flechas indican las bandas con cambios debido al tratamiento con SAL.

Con respecto al perfil de proteínas de superficie (Fig. 6C) se observó una banda mayoritaria de aproximadamente 60 KDa que se incrementó cuando la cepa Newman fue tratada con SAL. Considerando el peso molecular y la fracción proteica de la banda aumentada, se presumió que esta banda podría corresponder a la proteína Eap, la cual posee un peso molecular de 62 KDa y se encuentra adherida a la superficie bacteriana. De estos resultados se desprende que el SAL afectó la expresión de proteínas de *S. aureus*.

5. Efecto del SAL sobre la proteína Eap

Con el fin de confirmar si la banda de ~ 60 KDa observada en la fracción de proteínas de superficie correspondía a la proteína Eap, se llevaron a cabo SDS-PAGEs de la fracción de proteínas de

superficie de la cepa Newman, de su mutante isogénica *eap* (AH12) y de la cepa AH12 complementada (Tabla 1). En la figura 7 se observa que la banda de ~60 KDa estuvo ausente en la calle correspondiente a la mutante AH12, mientras que esta banda se observó en la cepa complementada. Por lo tanto, se puede concluir que el tratamiento con SAL provocó un aumento en la expresión de la banda de ~60 KDa correspondiente a la proteína Eap.

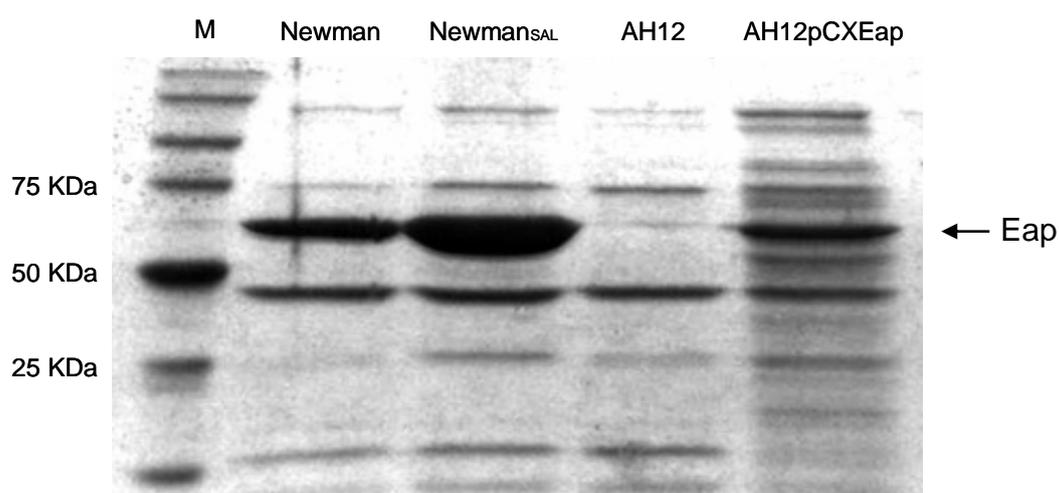


Figura 7. Perfil de proteínas de superficie de *S. aureus*. SDS-PAGE de las proteínas de superficie de la cepa Newman tratada o no con SAL, de su mutante Eap (AH12) y de la mutante complementada (AH12pCXEap) de *S. aureus*. Las bandas proteicas se visualizaron por tinción con azul de Coomassie. M: Marcador de peso molecular.

Posteriormente se realizaron experimentos de fusión transcripcional con el fin de evaluar el efecto del SAL sobre la transcripción del gen *eap*. El tratamiento con SAL de la cepa Newman transformada con el plásmido *Peap-gfp* provocó un aumento en la actividad del promotor *eap* (Tabla 1) (Fig. 8A).

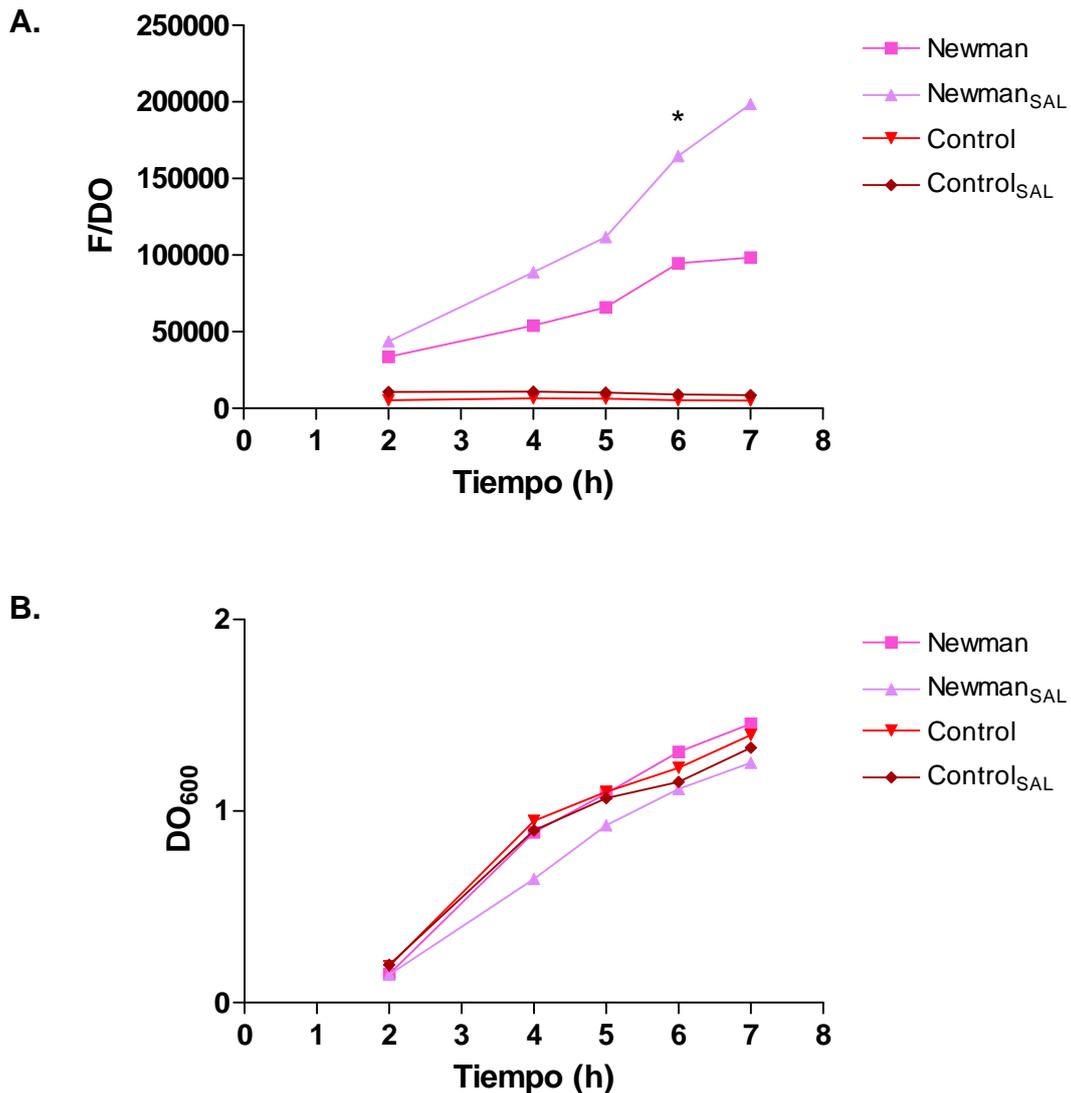


Figura 8. Actividad del promotor *eap* bajo la acción del SAL. **A.** La actividad del promotor se determinó por fusión con *gfp* y medición de la fluorescencia en relación con la densidad óptica ($F_{405/516}/DO_{600}$) en función del tiempo. Se muestra un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Control: cepa Newman transformada con plásmido conteniendo el gen *gfp* sin promotor. Tiempo 6h, Newman: 94698 F/DO vs Newman_{SAL}: 164723 F/DO, * $p=0,01$; Mann-Whitney test. **B.** Crecimiento bacteriano (DO_{600}) en función del tiempo.

Por otro lado, se realizó una qRT-PCR a partir del ARN de la cepa Newman tratada o no con SAL utilizando cebadores específicos para el transcripto *eap*. El resultado hallado confirmó el aumento de los niveles de transcriptos del gen *eap* en la cepa Newman luego del

tratamiento con SAL (Fig. 9). El valor $2^{-\Delta\Delta CT}$ para el transcripto *eap* luego del tratamiento con SAL fue igual a 2.

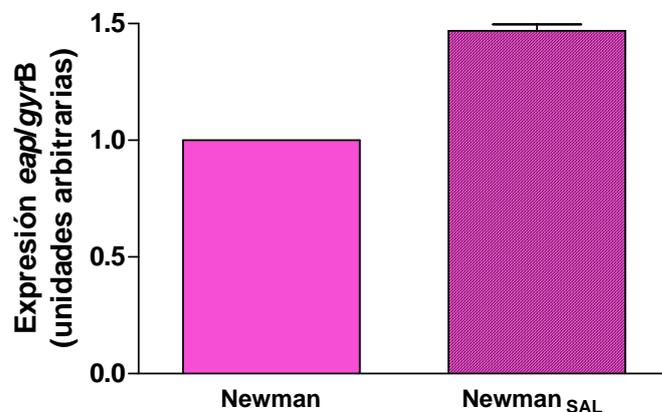


Figura 9. Efecto del SAL sobre la transcripción de *eap*. El análisis de la expresión se llevó a cabo por RT-PCR en tiempo real a partir del ARN extraído de la cepa Newman previamente tratada o no con SAL. Cada barra representa la expresión del ARNm *eap* normalizada a la expresión del transcripto *gyrB* expresada en unidades arbitrarias \pm DS.

Con el objeto de evaluar si el aumento en la expresión de Eap por acción del SAL tenía algún efecto sobre la internalización celular, se realizaron ensayos de invasión con las cepas Newman y su mutante AH12 tratadas o no con SAL. En la figura 10 se observa que la mutante AH12 presentó una capacidad significativamente menor de internalización comparada con la cepa Newman. Por lo tanto, Eap es importante para el proceso de internalización de *S. aureus* en las células MAC-T. Por otra parte, cuando la cepa AH12 se trató con SAL se observó un aumento significativo en su capacidad de invasión, indicando que en ausencia de Eap, el SAL actuaría sobre otro/s factor/es de virulencia que estarían involucrados en el proceso de internalización celular.

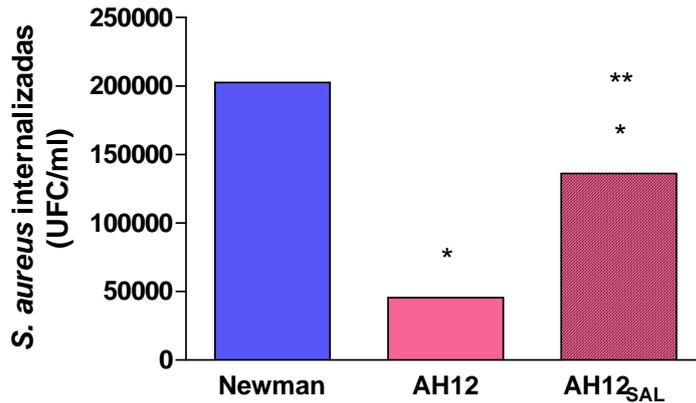


Figura 10. Internalización de la mutante *eap* de *S. aureus* y efectos del tratamiento con SAL. Se infectaron células MAC-T en monocapa con inóculos bacterianos previamente tratados o no con SAL. Se muestra las medianas de las UFC/ml internalizadas de un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Newman: 2×10^5 vs AH12: 4×10^4 UFC/ml, * $p=0,001$; AH12 vs AH12_{SAL}: $1,3 \times 10^5$ UFC/ml, ** $p < 0,0001$, Mann-Whitney test.

Con el fin de establecer la importancia del aumento en la expresión de Eap por acción del SAL para la internalización en células epiteliales, se realizaron ensayos de invasión celular con la cepa Newman transformada con el plásmido *Peap-gfp* (Tabla 1) cultivada previamente o no con SAL. Una vez realizado el ensayo de invasión sobre las células MAC-T adheridas a cubreobjetos, las células se incubaron con azul de Evans (rojo) y DAPI (azul), para visualizar el citoesqueleto y el núcleo de las células eucariotas, respectivamente. Los cubreobjetos se observaron bajo el microscopio de fluorescencia a 40X. Luego, para cada condición ensayada se contabilizaron las bacterias que presentaron actividad del promotor *eap* (verde) en 30 campos y se calculó el promedio de bacterias adheridas e internalizadas. Para la cepa Newman *Peap-gfp* se contó un promedio de 34 bacterias totales, mientras que para la misma cepa tratada con SAL se contabilizó una media de 70 bacterias en los 30 campos estudiados. Los resultados indican que la cepa Newman tratada con SAL se adhirió a las células MAC-T en mayor número que la no tratada y esto podría ser consecuencia de una mayor expresión de Eap por acción del SAL (Fig. 11).

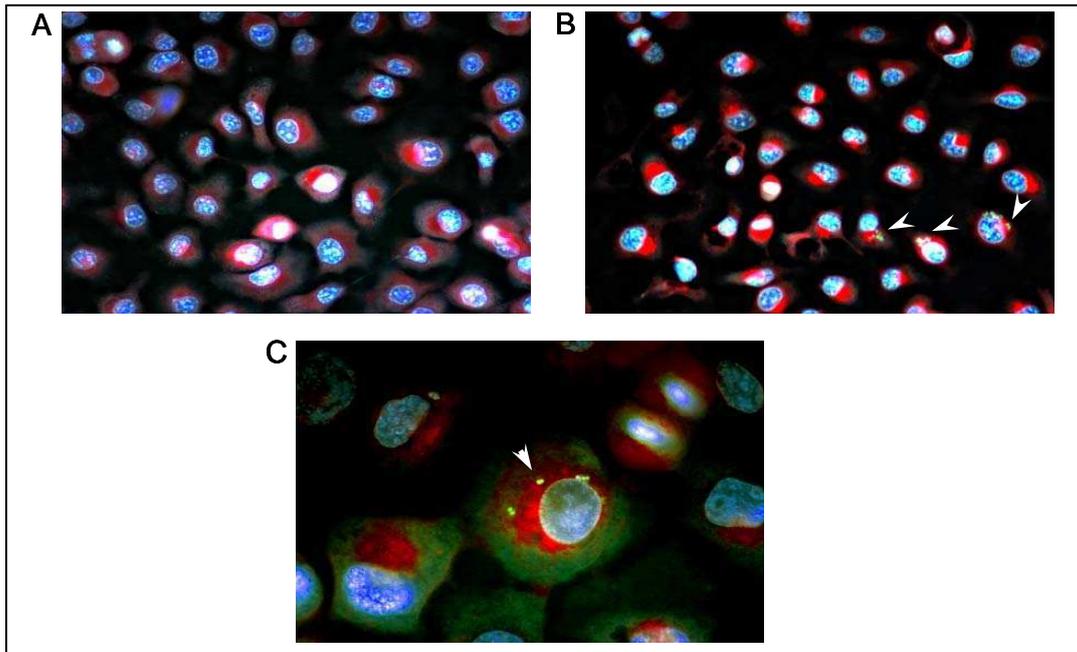


Figura 11. Adhesión de la cepa Newman a las células epiteliales MAC-T. **A.** Células infectadas con Newman *Peap-gfp*, 40X; **B.** Células infectadas con cepa Newman *Peap-gfp* previamente tratada con SAL, 40X; **C.** Células infectadas con Newman *Peap-gfp* tratada con SAL, 100X. En todos los casos se muestra un campo representativo de 30 campos observados. Las flechas señalan las bacterias adheridas que expresan *gfp* (verde). Se observa el citoplasma en color rojo y el ADN eucariota en color azul.

En conjunto, los resultados demuestran que el SAL provocó un aumento de la transcripción del gen *eap*, así como también de la expresión de la proteína Eap, lo que se tradujo en un aumento en la internalización celular de *S. aureus*. Además se estableció la importancia de Eap para la adhesión y posterior internalización de la cepa Newman de *S. aureus* en las células MAC-T.

6. Efecto del SAL sobre reguladores de los factores de virulencia

6.1. Sistema regulador *sae*

El locus *sae* es uno de los reguladores globales más importantes de *S. aureus*. Este sistema de dos componentes es el principal modulador positivo de la transcripción de *eap*, mientras

que regula negativamente la transcripción de *cap* (49, 82). Teniendo en cuenta que el SAL provocó un aumento en la expresión de *eap* y una disminución en la expresión de *cap*, se investigó la acción del SAL sobre el sistema regulatorio *sae* mediante diferentes ensayos. En primer término, se estudió el efecto del SAL sobre el nivel de internalización de las mutantes *sae* deficientes de las cepas Newman y RN6390. Para ello, a partir de la mutante RN6390*sae* se obtuvo la mutante Newmansae mediante transducción con el fago ϕ -11 (Tabla 1). Luego, se realizaron ensayos de invasión infectando monocapas de células MAC-T con las suspensiones bacterianas previamente incubadas o no con SAL.

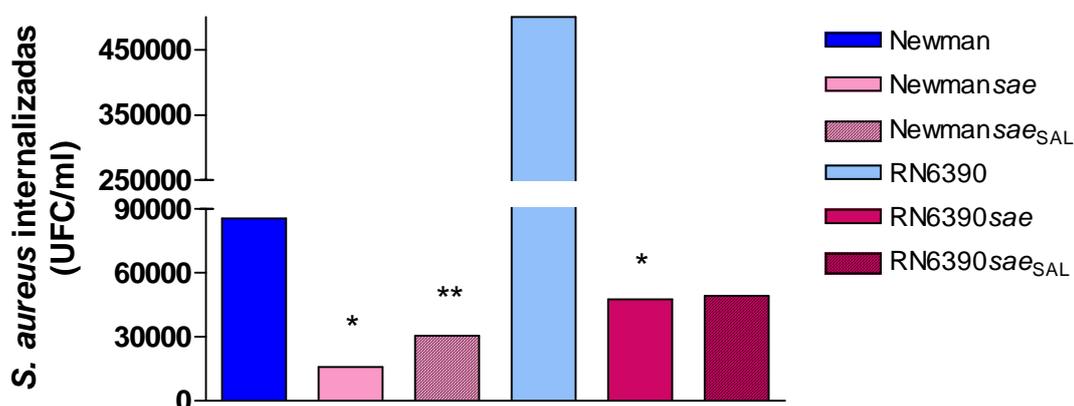


Figura 12. Efecto del SAL sobre la internalización de *S. aureus* y sus mutantes *sae*. Se infectaron células MAC-T en monocapa con inóculos bacterianos previamente tratados o no con SAL. Se muestra la mediana de las UFC/ml internalizadas de un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Cepa Newman: 8.5×10^4 vs Newmansae: 1.5×10^4 , * p < 0,01; Newmansae vs Newmansae_{SAL}: 3.4×10^4 UFC/ml, ** p < 0,01, Mann-Whitney test. Cepa RN6390: 5×10^5 vs RN6390*sae*: 4.7×10^4 , * p < 0,01; Mann-Whitney test. RN6390*sae* vs RN6390*sae*_{SAL}: 4.9×10^4 UFC/ml p > 0,05

En la figura 12 se observa que la inactivación del locus *sae* provocó una disminución significativa en la internalización de ambas mutantes comparada con las cepas parentales Newman y RN6390. El resultado obtenido permite sugerir que los factores regulados por *sae* estarían involucrados en el proceso de invasión celular. Cabe destacar que cuando se trató a las mutantes *sae* con SAL, sólo en el bagaje Newman se observó un aumento significativo en la

internalización. Por lo tanto, en esta cepa, otros reguladores distintos de *sae* estarían siendo afectados por el SAL.

Posteriormente, se analizó la actividad del promotor principal (P_c) del locus *sae* fusionado al gen reportero *gfp* en presencia o ausencia de SAL. En la figura 13A se muestra que la actividad del promotor principal del sistema *sae* en presencia de SAL fue similar a la observada en ausencia de tratamiento.

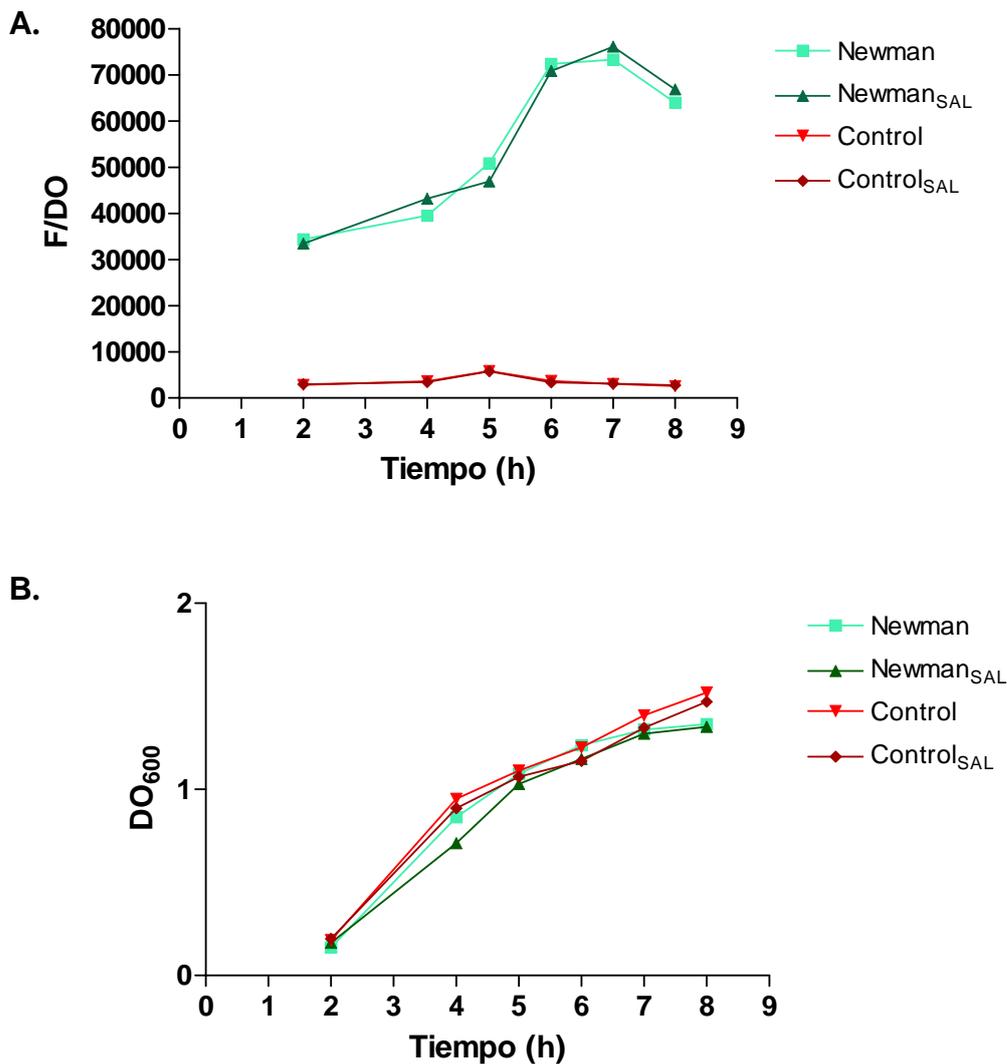


Figura 13. Actividad del promotor principal *sae* bajo la acción del SAL. A. La actividad del promotor principal *sae* se determinó por fusión con *gfp* y medición de la fluorescencia en relación con la densidad óptica (F/DO) en función del tiempo. Se muestra un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Control: cepa Newman transformada con el plásmido conteniendo el gen *gfp* sin promotor. Tiempo 6h, Newman: 72382 F/DO vs Newman_{SAL}: 70841 F/DO. **B.** Crecimiento bacteriano (DO₆₀₀) en función del tiempo.

Además, se estudió el efecto del SAL sobre el nivel de expresión de los transcritos *sae* utilizando cebadores específicos que abarcaron *saeR* y *saeS* (transcritos A, B y C) mediante qRT-PCR. Los resultados demostraron que efectivamente el SAL provocó un aumento en la cantidad de transcritos *sae* (Fig. 14). El valor de $2^{-\Delta\Delta CT}$ fue de 1,6.

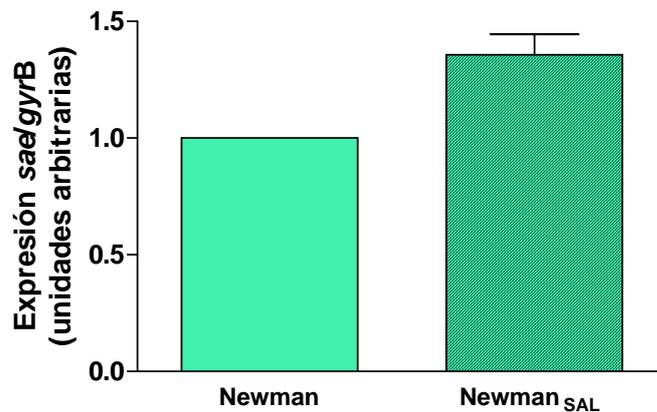


Figura 14. Impacto del SAL sobre la expresión de *sae*. El análisis de la expresión se llevó a cabo por RT-PCR en tiempo real a partir de ARN extraído de la cepa Newman previamente tratada o no con SAL. Cada barra representa la expresión de *sae* normalizada a la expresión de *gyrB* de 3 experimentos independientes expresada en unidades arbitrarias \pm DS.

Por otro lado, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación doble con antisuero específico para PC5 utilizando los extractos capsulares de la mutante *Newmansae*. En la figura 15 se observa que el título para la mutante sin tratamiento fue de 4, al igual que el obtenido para la cepa Newman (ver Fig. 5). Sin embargo, el título se incrementó al doble (título: 8) cuando la mutante *Newmansae* se trató con altas dosis de SAL (Fig. 15). Estos resultados sugieren que en ausencia del locus *sae*, el SAL podría afectar a otro/s regulador/es provocando un aumento en la expresión de PC.

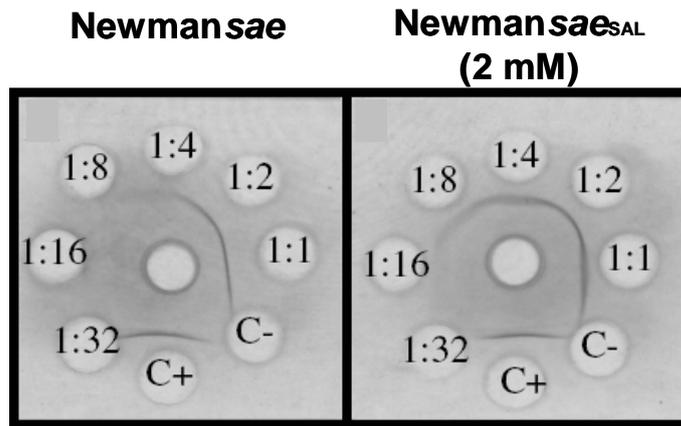


Figura 15. Efecto del SAL sobre la expresión de PC en la mutante sae. La expresión de PC5 se determinó mediante inmunoprecipitación doble de diluciones seriadas de los extractos capsulares de la cepa *Newmansae* previamente incubada o no con 2 mM de SAL. El antisuero se sembró en el pocillo central. C+ : Extracto capsular de la cepa Reynolds PC5+; C-: Extracto capsular de la cepa Reynolds PC5-.

Con el objetivo de evaluar el efecto del SAL sobre la expresión de la proteína Eap en la mutante *Newmansae*, se realizaron SDS-PAGEs de las proteínas de superficie extraídas de los cultivos bacterianos pretratados o no con SAL.

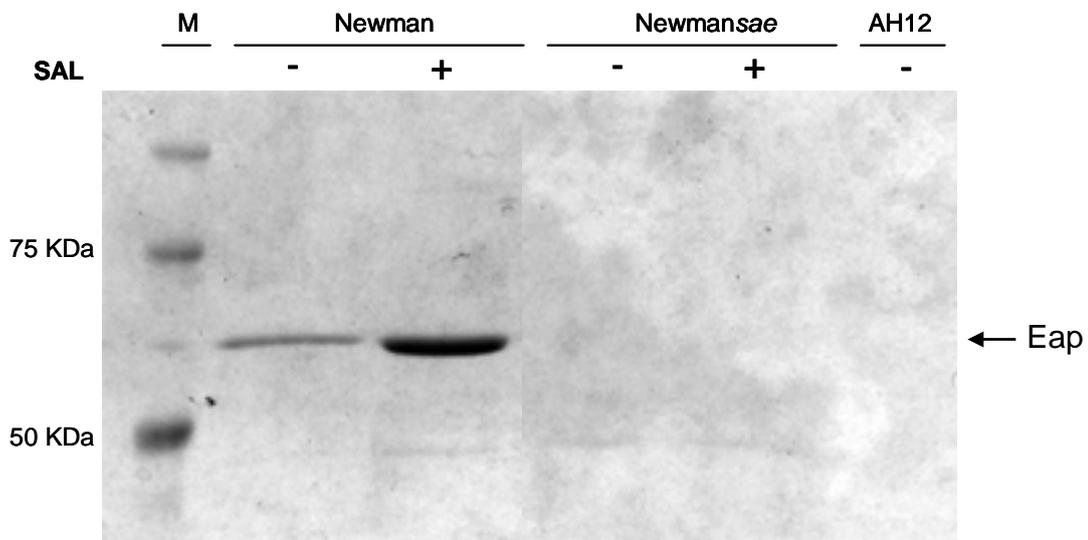


Figura 16. Efecto del SAL sobre la expresión de Eap en la mutante sae. SDS-PAGE de las proteínas de superficie de la cepa Newman de *S. aureus*, su mutante *sae* y su mutante *eap* (AH12) previamente tratadas o no con SAL. Las bandas proteicas se visualizaron por tinción con azul de Coomassie. M: Marcador de peso molecular.

En la figura 16 se observa la banda correspondiente a la proteína Eap en los perfiles de proteínas de superficie de la cepa Newman tratada o no con SAL. Contrariamente, en las calles correspondientes a la mutante *sae*, no se observó esta banda, independientemente del tratamiento con SAL. La ausencia de la proteína Eap también se evidenció en la mutante AH12 (control). Por lo tanto, estos resultados corroboran que el sistema regulatorio *sae* es esencial para la expresión de Eap.

El conjunto de los resultados obtenidos permiten concluir que el aumento de Eap y la disminución de PC podría deberse en parte a la acción positiva del SAL sobre el sistema regulatorio *sae*.

6.2. Regulador *mgrA*

Otro regulador importante que controla la expresión de más de 350 genes de *S. aureus* es *mgrA* (78). Este factor de transcripción regula positivamente la expresión de *cap*, sin embargo se desconoce la acción de MgrA sobre la regulación de *eap* (81).

Con el fin de determinar el efecto del SAL sobre la internalización de la cepa Newman y su mutante *mgrA*, se realizaron ensayos de invasión en células MAC-T. Los resultados obtenidos indican que la ausencia del gen *mgrA* provocó un incremento significativo en la capacidad de invasión de *S. aureus* en células epiteliales (Fig. 17). Por lo tanto, algunos de los factores de virulencia regulados por *mgrA* estarían implicados en el proceso de internalización de *S. aureus*. Además, cuando se trató a la mutante *mgrA* con SAL se observó un aumento significativo en su grado de invasión (Fig. 17), lo cual sugiere que otros reguladores podrían también ser afectados por este compuesto.

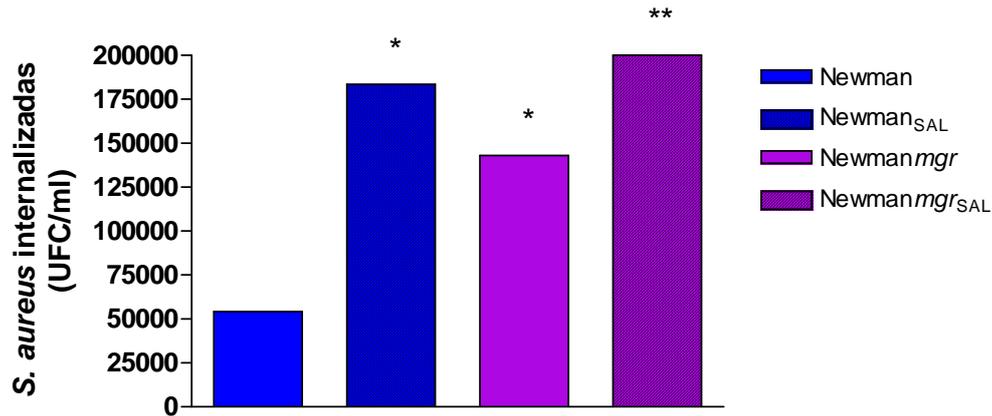


Figura 17. Efecto del SAL sobre la internalización de la cepa Newman de *S. aureus* y su mutante *mgrA*. Se infectaron células MAC-T en monocapa con inóculos bacterianos previamente tratados o no con SAL. Se muestra el porcentaje de internalización de un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Newman: $5,4 \times 10^4$ vs Newman_{SAL}: $1,8 \times 10^5$, * $p < 0,01$; Newman vs Newman_{mgr}: $1,4 \times 10^5$ * $p < 0,01$; Newman_{mgr} vs Newman_{mgr}_{SAL}: 2×10^5 UFC/ml, ** $p < 0,01$, Mann-Whitney test.

Con el fin de investigar la acción del SAL sobre *mgrA* a nivel transcripcional, se llevaron a cabo experimentos de fluorescencia con el promotor del gen *mgrA* fusionado al gen *gfp*. Los resultados demostraron que el tratamiento con SAL produjo en la cepa Newman una disminución significativa en la actividad del promotor *mgrA* comparado con lo observado en la misma cepa sin tratamiento (Fig. 18).

Mediante qRT-PCRs se estableció que la cepa Newman tratada con SAL expresó una cantidad menor de transcritos de *mgrA* comparado con los niveles obtenidos para la cepa Newman no tratada (Fig. 19). El valor de $2^{-\Delta\Delta CT}$ fue igual a 0,7.

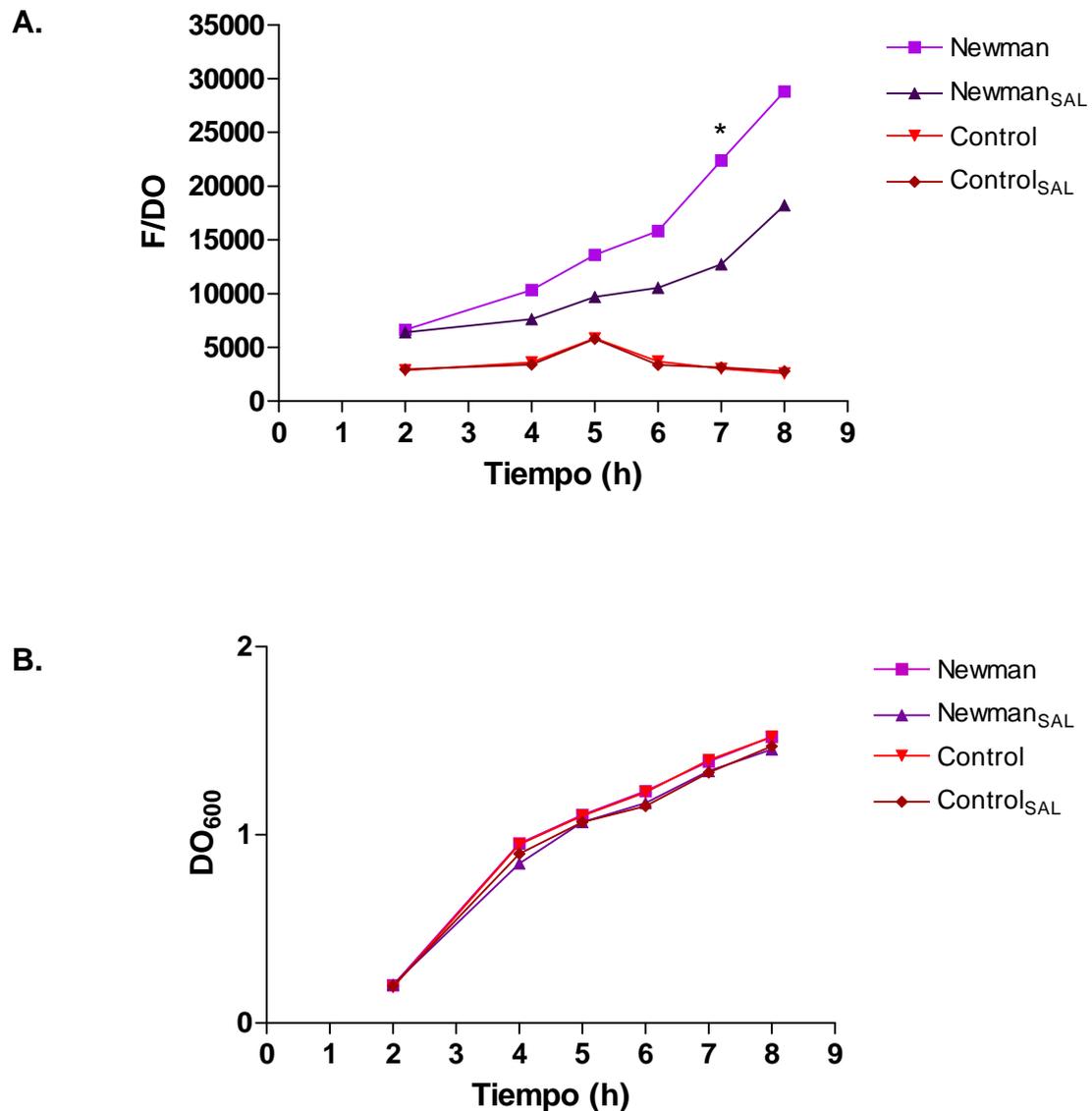


Figura 18. Efecto del SAL sobre la actividad del promotor *mgrA*. **A.** La actividad del promotor *mgrA* se determinó por fusión con *gfp* y medición de la fluorescencia en relación con la densidad óptica (F/DO) en función del tiempo. Se muestra un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Control: cepa Newman transformada con el plásmido conteniendo el gen *gfp* sin promotor. Tiempo th, Newman: 22378 F/DO vs Newman_{SAL}: 12724 F/DO, *p=0,01, Mann-Whitney test. **B.** Crecimiento bacteriano (DO₆₀₀) en función del tiempo.

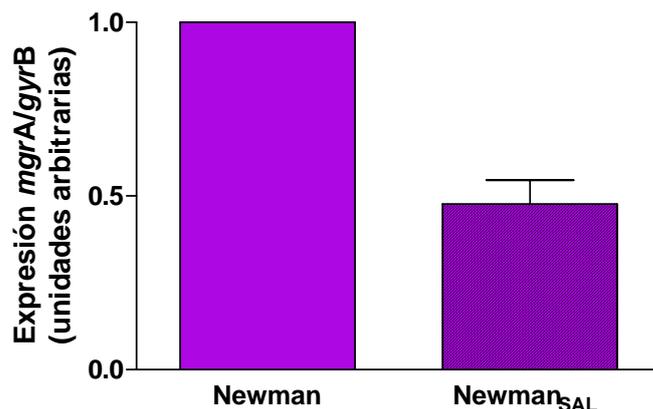


Figura 19. Efecto del SAL sobre la expresión de *mgrA*. El análisis de la expresión se llevó a cabo por RT-PCR en tiempo real a partir de ARN extraído de la cepa Newman previamente tratada o no con SAL. Cada barra representa la expresión de *mgrA* normalizada a la expresión de *gyrB* de 3 experimentos independientes expresada en unidades arbitrarias \pm DS.

Además, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación con antisuero específico para PC5 en la mutante Newman*mgr* tratada o no con SAL. La figura 20 muestra que la ausencia de *mgrA* afectó negativamente la expresión de PC. Este resultado demuestra que *mgrA* es indispensable para la expresión de *cap*.

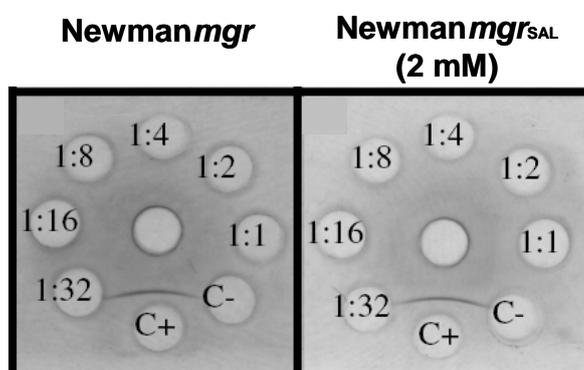


Figura 20. Expresión de PC en la mutante *mgrA* tratada o no con SAL. La expresión de PC5 se ensayó mediante inmunoprecipitación de diluciones seriadas de extractos capsulares de la cepa Newman*mgr* previamente incubada o no con 2 mM de SAL. C+: Reynolds PC5+; C-: Reynolds PC5-.

Por lo tanto, la disminución en la expresión de PC5 podría deberse en parte a la acción negativa del SAL sobre *mgrA*, uno de sus reguladores.

7. Acción regulatoria de *mgrA* sobre Eap

Trabajos previos han demostrado que *mgrA* es capaz de regular la expresión de proteínas extracelulares, tales como Hla y Spa (55, 78, 81). Con el fin de investigar si *mgrA* controla la expresión de Eap, se realizaron experimentos para medir la actividad transcripcional del promotor *eap* fusionado a *gfp* en la cepa salvaje Newman y en su mutante *mgrA*.

En la figura 21 se muestra que en la mutante *mgrA*, la actividad del promotor *eap* disminuyó significativamente comparada con la cepa salvaje. Por lo tanto, *mgrA* podría actuar regulando positivamente la expresión de *eap* a nivel transcripcional. Sin embargo, cuando la cepa mutante *mgrA* fue tratada con SAL, la actividad del promotor *eap* aumentó, sugiriendo que el SAL estaría actuando positivamente sobre otro regulador, probablemente *sae*.

Además, mediante RT-PCR para el transcripto *eap*, se corroboró la disminución de los niveles del transcripto *eap* en la mutante *mgrA* comparado con el valor determinado para la cepa parental. Asimismo, el tratamiento con SAL provocó un incremento en la expresión de ARNm de *eap* en la cepa Newman. (Fig. 22).

Con el fin de investigar el efecto del SAL sobre la expresión de la proteína Eap en la mutante *mgrA*, se realizaron SDS-PAGEs a partir de las proteínas de superficie de la cepa Newman *mgrA* tratada o no con SAL.

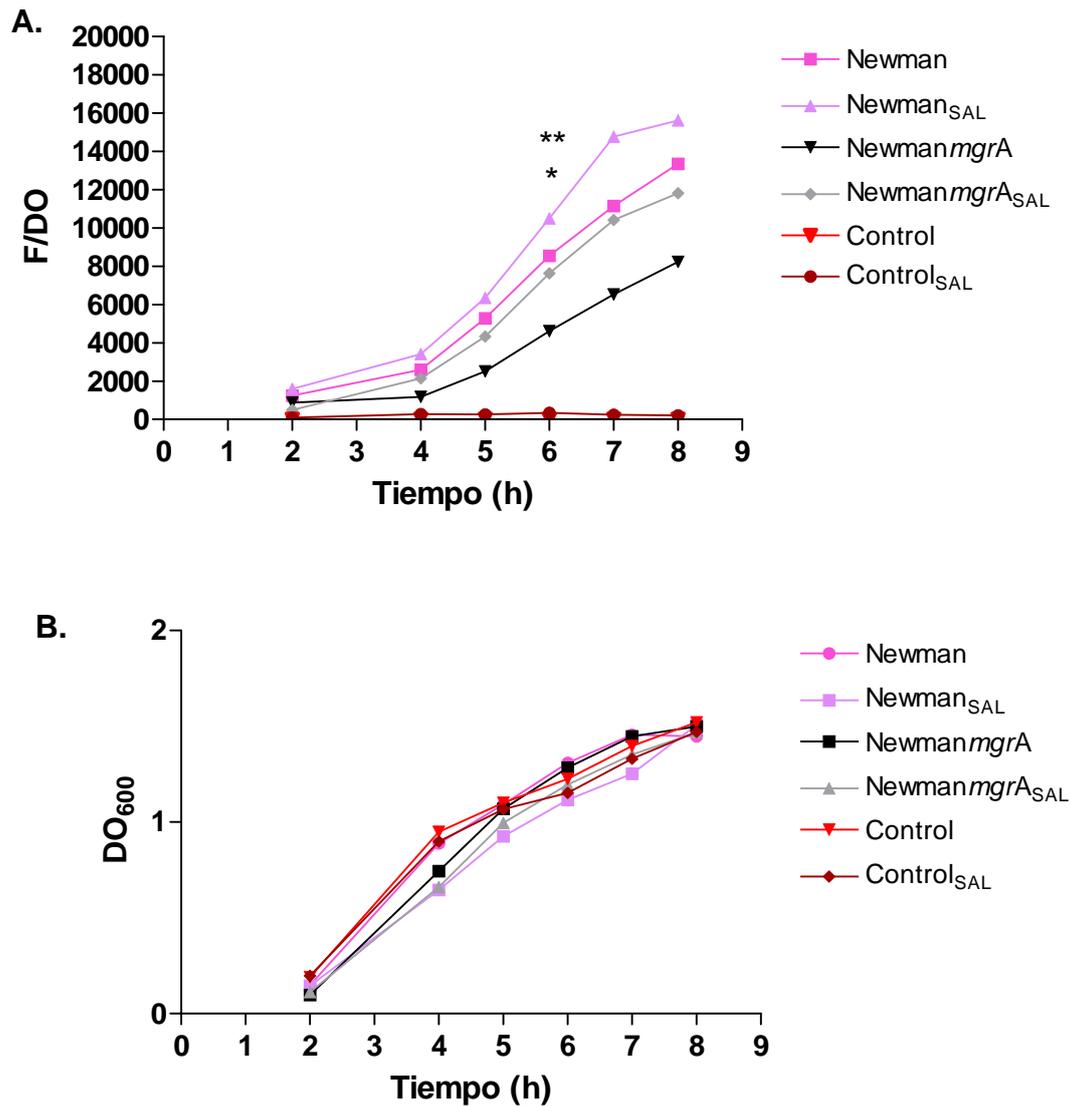


Figura 21. Actividad del promotor *eap* en la mutante *mgrA*. **A.** La actividad del promotor se determinó por fusión con *gfp* y medición de la fluorescencia en relación con la densidad óptica (F/DO) en función del tiempo. Se muestra un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Control: cepa Newman transformada con el plásmido conteniendo el gen *gfp* sin promotor. Tiempo 6h, Newman: 8545 F/DO vs Newman_{mgrA}: 4611 F/DO, *p<0,01; Newman_{mgrA} vs. Newman_{mgrA_{SAL}}: 7617 F/DO, *p<0,01. Mann-Whitney test. **B.** Crecimiento bacteriano (DO₆₀₀) en función del tiempo.

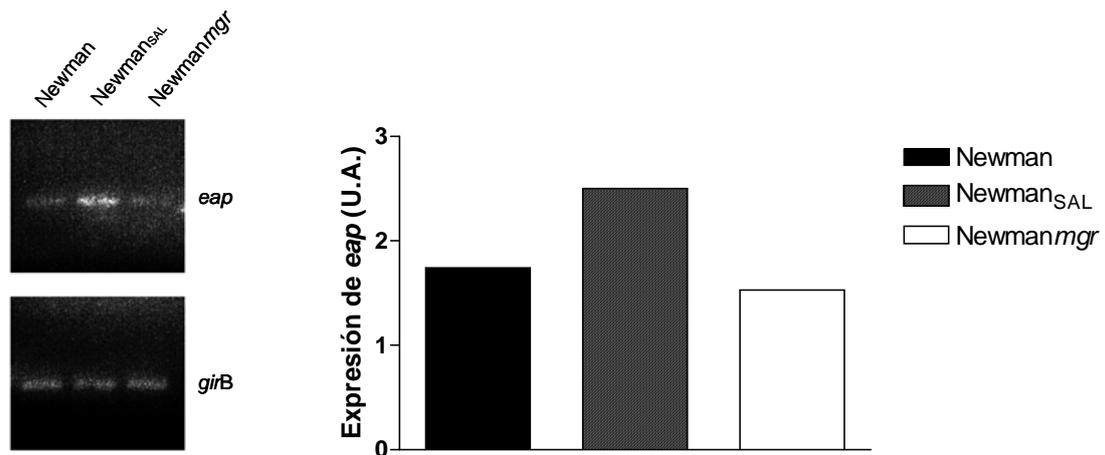


Figura 22. Expresión del transcrito *eap* en la mutante *mgrA*. Se realizó una RT-PCR con cebadores específicos para el transcrito *eap* a partir de ARN obtenido de la cepa Newman tratada previamente con SAL o no y de la cepa Newman*mgr*. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa teñidos con BrEt y se visualizaron bajo luz UV. La foto del gel se acompaña con la densitometría realizada con el programa Scion Image para semicuantificar el nivel de transcritos.

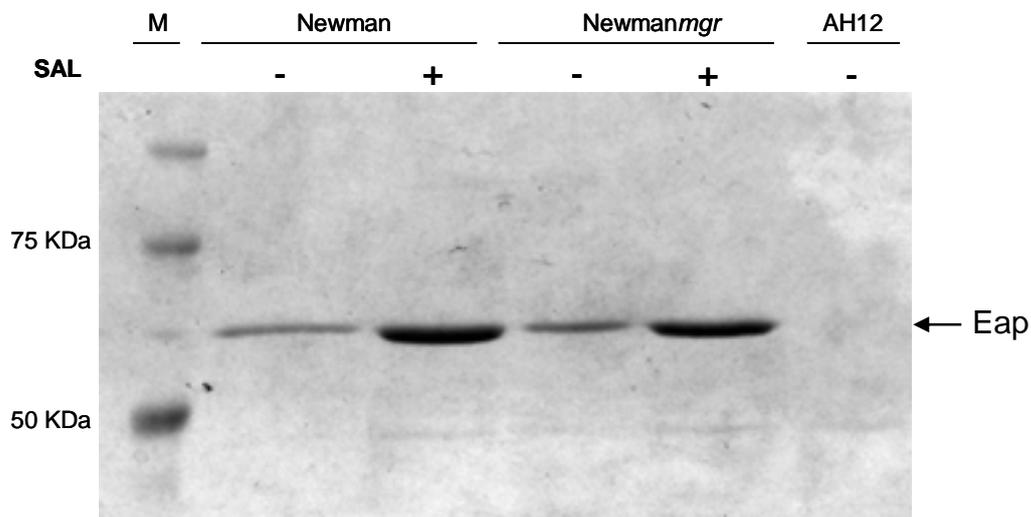


Figura 23. Expresión de Eap en la mutante *mgrA*. SDS-PAGE de las proteínas de superficie de la cepa Newman de *S. aureus*, su mutante *mgrA* y su mutante *eap* (AH12). Las bandas proteicas se visualizaron por tinción con azul de Coomassie.

En la figura 23 se muestra que la banda correspondiente a la proteína Eap no difirió entre la cepa salvaje Newman y su mutante *mgrA* sin tratamiento. En ausencia del gen *mgrA*, el tratamiento con

SAL provocó un aumento en la expresión de la proteína Eap, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por fusión transcripcional.

En conjunto, los resultados sugieren que *mgrA* actuaría como un regulador positivo de Eap a nivel transcripcional, sin embargo esto no se traduciría en un cambio a nivel de proteína. Además, en ausencia de *mgrA*, el SAL afectaría a otro/s regulador/es provocando un aumento de la proteína Eap.

8. Internalización de *S. aureus* en células endoteliales tratadas con SAL

Estudios previos demostraron que el SAL presenta diversas actividades sobre las células eucariotas incluyendo el control de la expresión génica (14, 24, 68, 136). Con el objetivo de estudiar el efecto del SAL sobre las células endoteliales y sus consecuencias en la interacción de estas células con *S. aureus*, se realizaron ensayos de invasión utilizando la línea celular EA.Hy926. En ensayos preliminares, las células eucariotas se trataron con SAL 2mM durante 2 h. Luego, las células se infectaron durante 1 h con la suspensión bacteriana de la cepa Newman o de su mutante AH12 y, transcurridas 2, 6 y 24 h post infección se contabilizaron las UFC/ml internalizadas y los sobrenadantes se ensayaron para detectar TNF- α mediante ELISA. Sorprendentemente, ni la cepa Newman ni su mutante *eap* lograron internalizarse en este tipo celular. Como control se utilizó la cepa R0 (Newman transformada con un plásmido que porta la FnBP-A defectuosa) (Tabla 1) que como se esperaba, presentó niveles de internalización tan bajos como los de la cepa Newman (Fig. 24). Por lo tanto, se decidió utilizar la cepa R11 (Newman transformada con un plásmido que porta la FnBP-A salvaje) y su mutante R11*eap* (Tabla 1). En los ensayos de invasión preliminares utilizando dichas cepas se determinó que el mejor tiempo post infección para detectar TNF- α en el sobrenadante fue

de 6 h. Por lo tanto, transcurridas 6 h luego del agregado de lisostafin se guardaron los sobrenadantes para detectar TNF- α y se lisaron las células para contabilizar las UFC/ml.

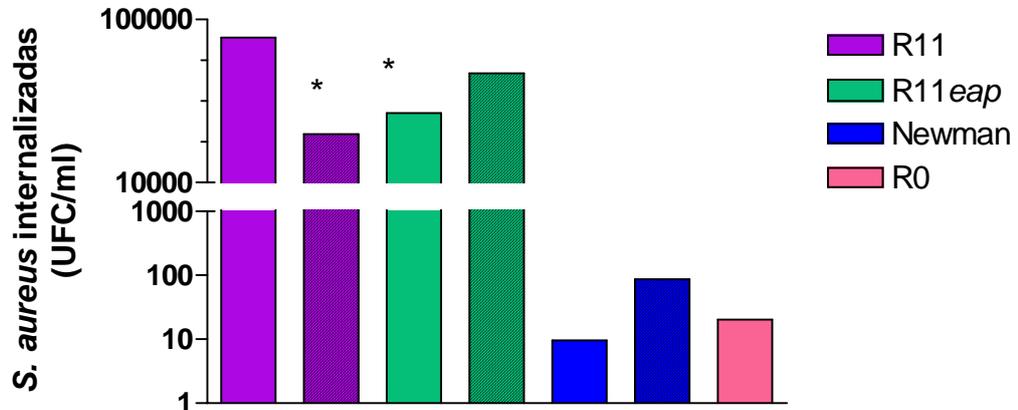


Figura 24. Internalización de *S. aureus* en células endoteliales tratadas con SAL. Monocapas de células EA.Hy926 tratadas o no con SAL 2 mM se infectaron con las suspensiones bacterianas. Se muestran las medianas de las UFC/ml internalizadas de un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes luego de 6 h postinfección. Barras rayadas: células endoteliales tratadas con SAL. Barras lisas: células endoteliales no tratadas. R11, -SAL: $7,7 \times 10^4$ vs +SAL: $1,9 \times 10^4$ * $p < 0,01$; R11 -SAL: $7,7 \times 10^4$ vs R11eap -SAL: $2,6 \times 10^4$ * $p < 0,01$; Mann-Whitney test.

En la figura 24 se observa que la acción del SAL sobre las células endoteliales provocó una disminución en la internalización de la cepa R11 comparada con la invasión de la misma cepa en las células no tratadas. Por otra parte, la mutante R11eap mostró una menor capacidad de invasión comparada con la cepa salvaje. La acción del SAL sobre las células endoteliales no afectó significativamente la invasión de la mutante R11eap.

Estos resultados sugieren que Eap es importante para la internalización de *S. aureus* en células endoteliales y que el SAL estaría afectando algún/os receptor/es de membrana de este tipo celular provocando una disminución significativa en la invasión de la bacteria salvaje. Más aún, Eap podría interactuar con uno de los

receptores, ya que el tratamiento de las células con SAL no provocó diferencias en la invasión de la mutante *eap*.

9. Expresión de ICAM-1 en células endoteliales tratadas con SAL e infectadas con *S. aureus*

Un estudio previo demostró que la proteína Eap purificada es capaz de unirse a la proteína de membrana ICAM-1 (16). Por otro lado, se estableció que el salicilato de sodio afectó la expresión de ICAM-1 en células HUVEC estimuladas con LPS (136). Con el fin de establecer el efecto del SAL sobre la expresión de ICAM-1 en las células endoteliales, se realizaron ensayos de invasión utilizando las células EA.Hy926 tratadas o no con SAL e infectadas con la cepa R11 y su mutante R11*eap*. Luego, mediante citometría de flujo se determinó la cantidad de células positivas para ICAM-1.

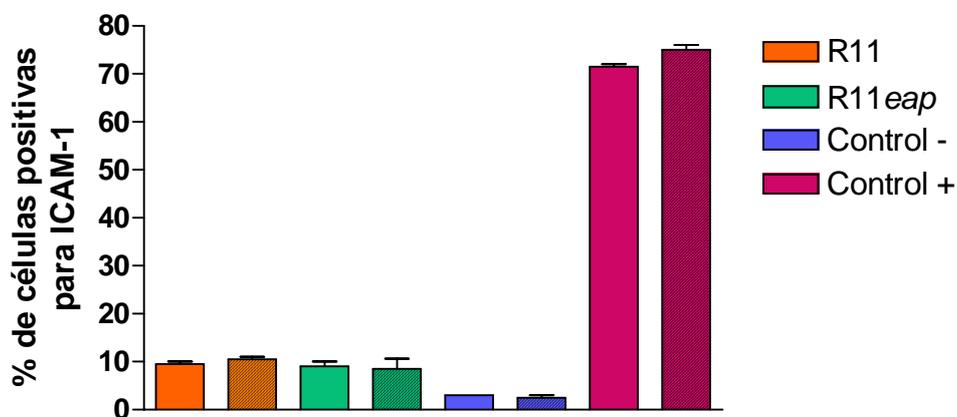


Figura 25. Expresión de ICAM-1 en células endoteliales tratadas con SAL e infectadas con *S. aureus*. Las células EA.Hy926 en confluencia tratadas o no con SAL 2 mM se infectaron (moi: 200) con las suspensiones bacterianas. Se muestran las medias \pm DS del porcentaje de células positivas para ICAM-1 de un experimento representativo de 2 experimentos independientes luego de 6 h postinfección. Los ensayos se realizaron por duplicado. Barras rayadas: células endoteliales tratadas con SAL. Barras lisas: células endoteliales no tratadas. Control -: Células sin infectar. Control +: Células tratadas con 1 μ g/ml de LPS. $p > 0,05$; Kruskal-Wallis test.

En la figura 25 se observa un bajo nivel de expresión de ICAM-1 en las células endoteliales infectadas tanto con la cepa R11

como con su mutante R11*eap*. Por otra parte, el tratamiento de las células con SAL no provocó cambios en la expresión de ICAM-1 en ninguno de los casos estudiados.

10. Producción de TNF- α en respuesta a la infección con *S. aureus* y al tratamiento con SAL

Los sobrenadantes de cultivo provenientes de los ensayos de invasión de las células endoteliales luego de 6 h post infección se ensayaron mediante ELISA para detectar los niveles de TNF- α .

La figura 26 muestra que la mutante R11*eap* produjo un aumento significativo de la síntesis de TNF- α comparado con los niveles alcanzados por las células infectadas con la cepa salvaje. Por cierto, el tratamiento de las células endoteliales con SAL 2 mM no produjo diferencias significativas en la síntesis de TNF- α .

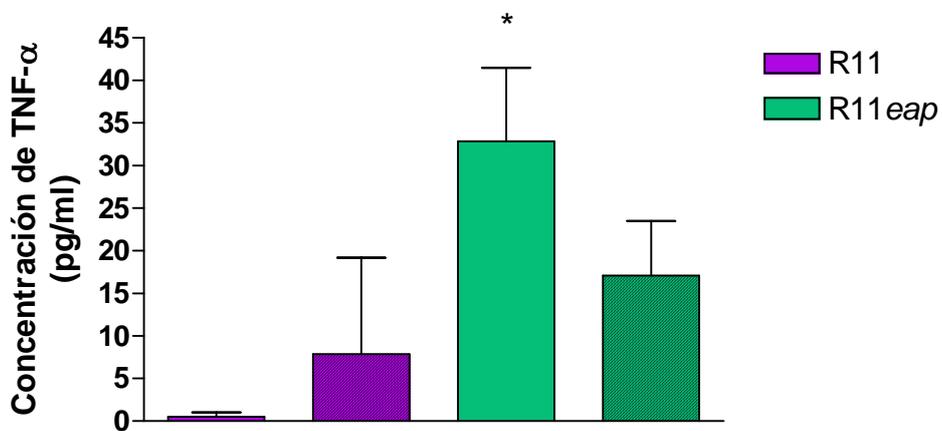


Figura 26. Efecto del SAL sobre la síntesis de TNF- α por parte de células endoteliales infectadas con *S. aureus*. Niveles de TNF- α detectados en los sobrenadantes provenientes de los ensayos de invasión de las células EA.Hy926 tratadas o no con SAL 2 mM. Se muestran las medias \pm DS de la concentración de TNF- α en pg/ml. Barras rayadas: células endoteliales tratadas con SAL. Barras lisas: células endoteliales no tratadas. R11 -SAL: 0,51 pg/ml vs R11*eap* -SAL: 32,83 * $p < 0,001$; Kruskal-Wallis test.

Por lo tanto, la presencia de la proteína Eap inhibiría la síntesis de TNF- α en células endoteliales humanas.

11. Efecto del SAL sobre la colonización intranasal de *S. aureus in vivo*

Con el fin de estudiar el efecto del SAL *in vivo*, se realizaron experimentos de colonización nasal utilizando las cepas Newman y su mutante AH12. Para ello, grupos de ratones CF-1 se inyectaron con SAL 100 mM o con PBS 1X por vía intraperitoneal, al cabo de 30 min los ratones se inocularon por vía intranasal con las suspensiones bacterianas correspondientes. Luego de 4 h, las narinas de los animales se extirparon y se procesaron para contabilizar las UFC/ml de los homogenatos.

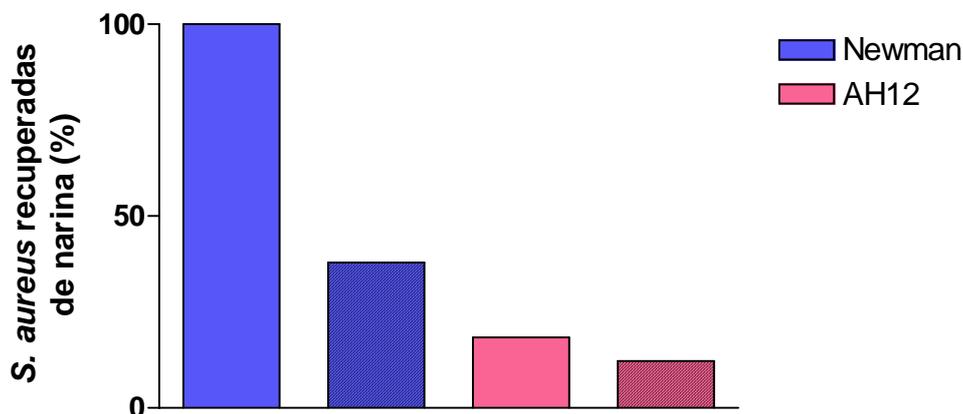


Figura 27. Efecto del SAL sobre la colonización intranasal de *S. aureus*. Se muestran los porcentajes de las medianas de un experimento representativo de 3 experimentos independientes relativos a la cepa Newman sin tratamiento (100%). Barras rayadas: ratones previamente tratados con SAL. Barras lisas: ratones previamente tratados con PBS. Newman, PBS: 100%, SAL: 34%; AH12, PBS: 16%, SAL: 8%.

La figura 27 muestra que la mutante AH12 posee una capacidad menor de colonización que la cepa Newman. Asimismo, el SAL inyectado por vía intraperitoneal provocó una disminución de la colonización intranasal tanto de la cepa Newman como de su

mutante AH12 comparado con los valores de colonización obtenidos cuando se inyectó PBS previamente a los animales.

Los resultados obtenidos sugieren que la proteína Eap es un factor importante para la colonización de *S.aureus in vivo* y que el SAL actuaría en el huésped provocando una disminución en la colonización nasal de *S. aureus*.

S. aureus es una bacteria patógena capaz de causar enfermedades de leves a severas en el huésped infectado que pueden causar incluso la muerte. La capacidad de *S. aureus* para generar estas infecciones está dada por la expresión coordinada de un arsenal de factores de virulencia, los cuales están modulados por importantes reguladores globales. El SAL, componente principal de la aspirina, interfiere en la expresión de los factores de virulencia de algunos géneros bacterianos.

En este trabajo se demostró, en primer lugar, que el tratamiento con SAL de la cepa Newman de *S. aureus* provocó un aumento significativo en la capacidad de internalización en las células epiteliales MAC-T. Los experimentos del presente trabajo se realizaron en medio sin glucosa para evitar la represión de la producción de factores de virulencia, como por ejemplo PC (115). Asimismo, la concentración de SAL utilizada de 0,36 mM correspondió a la concentración antiplaquetaria alcanzada en el plasma humano (30), mientras que la concentración de SAL de 2 mM está dentro del rango terapéutico alcanzado en suero humano en pacientes tratados para enfermedades crónicas inflamatorias. Los niveles terapéuticos en suero de salicilato en pacientes tratados para enfermedades reumáticas están entre 150 y 300 µg/ml, lo cual es equivalente a 1-2 mM de SAL (66). Recientemente, se estableció que la cepa 8325-4 de *S. aureus* (no capsulada) cultivada en presencia de SAL mostró una adherencia reducida a células endoteliales umbilicales humanas (99). En los experimentos realizados en este trabajo con la cepa RN6390 de *S. aureus* (derivada de la 8325-4), no se pudieron corroborar esos resultados. Esta discrepancia podría ser explicada por las diferentes líneas celulares, o quizás sean de mayor importancia las diferencias en el diseño experimental y las condiciones de crecimiento bacteriano utilizadas.

La internalización de *S. aureus* en células de mamífero depende del puente de Fn formado entre las FnBPs de la bacteria y la integrina $\alpha_5\beta_1$ del huésped (119). Kupferwasser *et al.* (72) describieron que el tratamiento con SAL de distintas cepas de *S. aureus* provocó una disminución en la adhesión a proteínas de la matriz extracelular, tales como Fn y Fg. En tal estudio la disminución de la expresión de proteínas que se unen a la matriz sobre la superficie de la bacteria, se representó como el conjunto de datos derivados de las cepas de *S. aureus* RN6390, COL, Newman e ISP479C, además de varios aislamientos clínicos de *S. aureus* meticilino resistentes. Por otro lado, los genes *fnbA* y *fnbB* de la cepa Newman contienen una mutación puntual que resulta en un codón stop, lo que genera FnBPs truncadas al final del dominio C (43). Consecuentemente, esto provoca una adherencia deficiente de la cepa Newman comparada con otras cepas de *S. aureus* que contienen FnBPs salvajes. Los resultados de esta tesis confirmaron que la cepa Newman se internalizó en menor grado en las células MAC-T comparada con la cepa RN6390. Sin embargo, cuando ambas cepas se trataron con SAL, sólo la capacidad de internalización de la cepa Newman se vio incrementada.

Es importante destacar que las cepas Newman y RN6390 de *S. aureus* poseen diferencias en lo que respecta a su bagaje genético. Además de lo mencionado anteriormente respecto de las FnBPs, existen otras diferencias relevantes. La cepa Newman produce el serotipo capsular 5, por el contrario la cepa RN6390 posee una mutación puntual en el gen *cap5E* que la convierte en no capsulada (130). Por otra parte, la cepa RN6390 es una mutante natural *sigB*, mientras que la cepa Newman posee un *sigB* salvaje (71). Además, la cepa Newman posee una mutación puntual en el locus *saeS*, que genera una sobreproducción de Coa, FnBP-A y Eap, mientras que no afecta la expresión de Hla, Hlb y PC comparado con otras cepas que poseen un *saeS* salvaje (1, 35, 82). Por lo

expuesto, los cambios observados en el grado de invasión de las cepas Newman y RN6390 de *S. aureus* no pueden ser atribuidos sólo a la expresión diferencial del PC5. Pholmann-Dietze *et al.* (101) observaron que la presencia de la cápsula podría interferir con la adherencia de *S. aureus* a los tejidos del huésped. Ciertamente, cuando se trató con SAL a la cepa Reynolds PC5+ de *S. aureus* se observó una capacidad aumentada en la internalización respecto de esta cepa y de su mutante isogénica acapsular no tratadas. En vista de los resultados obtenidos se sugiere que el PC5 podría estar enmascarando a las moléculas de adhesión que posee *S. aureus* en su superficie. Más aún, el tratamiento con SAL estaría afectando negativamente la producción de PC5.

La expresión *in vitro* del PC de *S. aureus* es altamente sensible a diversas señales ambientales (95). Al respecto, en este trabajo se demostró que la actividad del promotor principal del locus *cap5*, al igual que el nivel de los transcriptos *cap5H*, disminuyeron luego de tratar a la bacteria con SAL. Por otro lado, Blickwede *et al.* (7) observaron que la expresión de *cap5A* disminuyó en la cepa Newman luego del tratamiento con concentraciones subinhibitorias de florfenicol (antibiótico utilizado en medicina veterinaria), indicando que la expresión de *cap* puede ser afectada por diferentes agentes farmacológicos. Por cierto, cuando se evaluó la expresión fenotípica del PC5 por inmunoprecipitación utilizando antisuero específico para PC5, se observó una reducción de la producción de cápsula dosis dependiente luego del tratamiento con SAL de la cepa Newman. Asimismo, el crecimiento en presencia de SAL de un microorganismo Gram negativo y con una cápsula gruesa, como *Klebsiella pneumoniae*, resultó en una síntesis disminuida del PC (22, 23). En particular, el PC fue reducido un 60% a una concentración de SAL de 0,21 mM. En ambos casos, el SAL provocó este efecto sobre la producción de cápsula a concentraciones

normalmente alcanzadas en plasma luego de la ingestión de aspirina dentro del rango terapéutico.

Ciertamente, la internalización incrementada en las células epiteliales de la cepa Newman de *S. aureus* luego del tratamiento con SAL podría deberse no sólo a la disminución de la producción de PC5 sino también a cambios en la expresión de sus adhesinas. Trabajos previos determinaron que el SAL interfirió con la expresión de varias proteínas de *S. aureus*, incluyendo FnBP-A y Hla (72, 73). En este trabajo, cuando se analizaron los perfiles de proteínas de la cepa Newman se observó que el tratamiento con SAL afectó la expresión de unas pocas exoproteínas y proteínas de pared. Además, un aumento importante de una banda de ~60 KDa se observó en la fracción de proteínas de superficie cuando se trató a la bacteria con SAL. La proteína que se encuentra en esa fracción proteica y que posee un peso molecular semejante al de la banda observada correspondió a la caracterizada por Palma *et al.* (98) quienes la denominaron Eap (8). Su identificación fue confirmada mediante ensayos con la mutante *Newmaneap* (AH12). En conclusión, el tratamiento con SAL provocó un incremento en la expresión de Eap en la cepa de *S. aureus* Newman. Este efecto también se observó a nivel transcripcional. Harraghy *et al.* (49) establecieron que la glucosa al 0,5% reprime la expresión de *eap* probablemente por su acción negativa sobre el sistema regulador *sae*. Por esta razón, los experimentos realizados se llevaron a cabo en ausencia de glucosa. Además, la producción de Eap es reprimida a altas concentraciones de hierro (60). Por lo tanto, la expresión de Eap es sensible a la acción de diferentes compuestos, a los que se suma el SAL.

Por otro lado, en el presente trabajo se estableció que la ausencia de expresión de Eap provocó una disminución en la internalización de *S. aureus* tanto en células epiteliales como

endoteliales. En concordancia con estos resultados, Hagggar *et al.* (45) observaron una capacidad disminuida en la adhesión de la mutante AH12 a los fibroblastos y queratinocitos comparada con la cepa Newman. En este trabajo de tesis, se determinó en el modelo murino de portación nasal una menor colonización de la mutante AH12 con respecto a la cepa salvaje a las 4 hs post infección. Por lo tanto, Eap es un factor importante que contribuye a la adhesión de *S. aureus* y posterior colonización del vestíbulo nasal. Por el contrario, en un modelo murino de herida superficial no se encontraron diferencias en el diámetro de los abscesos ni en la cantidad de bacterias de la cepa Newman y su mutante AH12 (16). Los mismos autores utilizando un modelo murino de sepsis tampoco encontraron diferencias significativas en el número de bacterias encontradas en riñón luego de 5 días. La discrepancia entre los resultados obtenidos en este trabajo y los reportados por Chavakis *et al.* (16) puede explicarse por los diferentes modelos animales, como así también por los distintos tiempos post infección utilizados. Por lo tanto, la proteína Eap en la cepa Newman que posee sus FnBPs truncadas, juega un rol importante en la internalización celular y adherencia *in vivo*.

Estudios previos establecieron que el locus *sae* controla en concierto con otros reguladores globales la producción de Eap a nivel transcripcional (1, 49, 60, 82, 113, 117). Se identificaron cuatro transcritos superpuestos del locus *sae* (1, 94, 121). Los transcritos *saeB*, C y D son fuertemente expresados en la cepa Newman comparado con la cepa de *S. aureus* 8325-4 (41, 82, 121). Por otro lado, el promotor principal del locus *sae* es *Pc*, el cual es autorregulado y también reprimido por SigB en las cepas de *S. aureus* 8325-4, ISP479R, UAMS-1 y COL (35, 75). Este promotor es activado por H₂O₂ y concentraciones subinhibitorias de α -defensinas, pero no responde a altas concentraciones de sales (1, 35). En el presente trabajo, el tratamiento con SAL no afectó la

actividad del promotor P_C en las condiciones estudiadas. Sin embargo, el nivel de los transcritos *saeA*, B y C controlados por los promotores P_A y P_C (ver Fig. 2, Introducción) se incrementaron luego de la exposición al SAL. Por otro lado, Steinhuber *et al.* (121) demostraron que la mutante *sae* de la cepa ISP479C de *S. aureus* tuvo una tasa de invasión disminuida en células endoteliales comparada con la cepa salvaje, mientras que la cepa Newman y su mutante *sae* mostraron tasas de invasión muy reducidas. En el presente trabajo se determinó que las mutantes *Newmansae* y RN6390*sae* presentaron una capacidad disminuida de invasión en células epiteliales MAC-T comparada con sus respectivas cepas salvajes. Además, el tratamiento con SAL indujo un aumento significativo en la capacidad de invasión de la mutante *Newmansae* con respecto a la misma cepa no tratada. Sin embargo, el SAL no provocó cambios en la internalización de la mutante RN6390*sae*. Estos resultados podrían sugerir que en ausencia de *sae* en el bagaje Newman, el SAL ejercería su acción sobre algún otro regulador que provocaría los cambios observados.

El locus *sae* es un importante regulador de múltiples proteínas de *S. aureus* (39, 42, 49). Al respecto, en este trabajo de tesis se estableció que la mutante *Newmansae* no expresó proteínas de superficie. Blickwede *et al.* (7) observaron que la mutante *Newmansae* no expresó niveles detectables de *emp*, *eap* y *fnbB*. Además, Harraghy *et al.* (49) demostraron que una mutante *sae* de la cepa Newman no expresó *Eap*. Teniendo en cuenta esta información, puede concluirse que el sistema regulatorio *sae* es esencial para la expresión de esta adhesina. Recientemente, se demostró que la cepa Newman posee una fuerte expresión de *sae* y de *eap* debido a la mutación que esta cepa presenta en *saeS* (82). La expresión constitutiva de *sae* sugiere que en la cepa Newman este sistema no podría ser modulado por compuestos externos (1, 35). Sin embargo, Schafer *et al.* (117) observaron que la actividad

y las funciones dependientes de *sae* se incrementaron por la acción de un biocida (Perform[®]) y de SDS, aún sobre sus niveles basales altos. En concordancia con estos autores, los resultados encontrados en este trabajo demuestran que el locus *sae* puede ser activado por SAL en la cepa Newman y que esta activación resultó en una expresión aumentada de Eap.

En *S. aureus* existen resultados contradictorios respecto de la regulación que ejerce *sae* sobre el operón *cap*. Al respecto, el locus *sae* reprimiría los genes *cap5* (82, 121). Sin embargo, Rogasch *et al.* (113) no encontraron ninguna influencia del locus *sae* sobre la transcripción del operón *cap* en la cepa Newman ni en la cepa COL. El aumento de la expresión de PC5 en la mutante Newmansae tratada con SAL sugiere que este compuesto podría estar afectando a otro regulador. La expresión aumentada del PC5 inducida por el SAL parecería contradecirse con la mayor capacidad de adhesión observada en la mutante Newmansae tratada con SAL. Sin embargo, esta discrepancia podría explicarse por el hecho de que otras adhesinas estarían aumentadas por acción del SAL en la mutante Newmansae. Cabe destacar que, a pesar de que Eap es la adhesina más importante en la cepa Newman, tanto las mutantes Newmanep como Newmansae son capaces aún de internalizarse, lo que sugiere que estas cepas estarían utilizando otras adhesinas para dicho proceso.

Otro regulador importante en *S. aureus* es *mgrA*. Hasta el momento, no hay trabajos que reporten la función de *mgrA* en la internalización de *S. aureus* en células eucariotas. En este trabajo se observó que la mutante *mgrA* de la cepa Newman se internalizó en mayor grado en las células epiteliales que la cepa salvaje. Esto podría deberse a que *mgrA* es un regulador positivo de *cap5* y *cap8*, por lo que, cuando *mgrA* está ausente la disminución de PC podría desenmascarar las adhesinas, generando una mayor tasa de

invasión (78). Por otra parte, el tratamiento con SAL de la mutante *mgrA* provocó un aumento de su internalización, lo que sugiere que ciertas adhesinas podrían estar aumentadas. Más aún el efecto positivo del SAL sobre la expresión del locus *sae* en ausencia de *mgrA* redundaría en el aumento de la adhesina Eap.

No se conocen antecedentes que determinen la acción de *mgrA* sobre la expresión de Eap. La mutante Newman*mgrA* presentó una actividad reducida del promotor *eap* comparada con la cepa salvaje. Además, se observó un descenso en el nivel de transcriptos de *eap* por RT-PCR. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre el nivel de expresión de la proteína Eap de la cepa Newman y de su mutante *mgrA*. Esto sugiere que el aumento observado a nivel transcripcional no sería suficiente como para detectar cambios a nivel fenotípico por la metodología utilizada. Esto nos permite inferir que el aumento observado en la proteína Eap luego del tratamiento con SAL, se debería principalmente al incremento de *sae*. Por lo tanto, la disminución de *mgrA* inducida por el SAL no afectaría significativamente la expresión final de la proteína Eap.

Estudios previos determinaron que la regulación del PC en *S. aureus* está afectada por diversos estímulos ambientales y es regulada a diferentes niveles (18, 51, 80). Los genes *sbcD* y *sbcC* están involucrados en la represión de la producción de PC5 a través de los reguladores *arl* y *mgrA* bajo condiciones subinhibitorias de ciprofloxacina o mitomicina C (18). En el presente trabajo, el tratamiento con SAL de la cepa Newman provocó una disminución de la actividad del promotor de *mgrA*. En concordancia con estos hallazgos, el nivel de transcriptos de *mgrA* también decreció luego de la exposición al SAL. Al respecto, Riordan *et al.* (112) demostraron que el salicilato provocó una disminución de los transcriptos *mgrA* en las cepas de *S. aureus* Becker y SH1000. Por

otra parte, cuando el factor transcripcional MgrA estuvo ausente en la cepa Newman no se observó producción de PC5 independientemente del tratamiento con SAL. En conjunto los resultados sugieren que en ausencia de MgrA, la disminución en la expresión de PC5 desenmascararía las adhesinas de superficie contribuyendo esto a una capacidad aumentada para invadir las células eucariotas. Ciertamente, la disminución de la expresión de *cap* observada luego del tratamiento con SAL en la cepa salvaje, podría deberse en parte a un efecto negativo del SAL sobre *mgrA*.

Cabe destacar que en ausencia de *mgrA*, la actividad del promotor *eap* y la expresión de la proteína Eap se ven aumentadas luego del tratamiento con SAL. Estos resultados indicarían que el SAL, en ausencia de *mgrA*, actuaría sobre otro regulador que provocaría un aumento en la expresión de *eap*. Este otro regulador podría ser *sae*. Estos resultados concuerdan con el aumento de la capacidad de invasión observada para la mutante *mgrA* tratada con SAL con respecto a la no tratada.

En la cepa Newman las FnBPs truncadas no están ancladas a la pared celular y son secretadas completamente al medio de cultivo (43). Por ello, se realizaron los experimentos de invasión en células endoteliales con la cepa Newman que expresa las FnBPs salvajes (R11) junto a su mutante isogénica *eap* deficiente. En este caso cuando las células endoteliales se incubaron en medio con SAL, se observó una disminución en la internalización de la cepa R11. Sin embargo, el mencionado tratamiento no afectó el grado de invasión de la mutante R11*eap*. Por lo tanto, el SAL afectaría la expresión de algún/os receptor/es celular/es involucrado/s en la interacción con la adhesina Eap. Estudios previos demostraron que la proteína Eap purificada es capaz de unirse a la molécula de superficie ICAM-1 sobre las células endoteliales (16). Strindhall *et al.* (122) demostraron que aislamientos clínicos de *S. aureus*

provenientes de infecciones agudas fueron capaces de inducir la expresión de ICAM-1 en células HUVEC. En el presente trabajo, el tratamiento de las células endoteliales con SAL no indujo cambios significativos en la expresión de ICAM-1. Además, la estimulación de la expresión de ICAM-1 por parte de la cepa Newman R11 y de su mutante R11 *eap* no fue significativa. Probablemente, los posibles factores estimulatorios de esta cepa de *S. aureus* (peptidoglicano, ácido araquidónico, Eap) no fueron suficientes como para inducir la expresión de ICAM-1 en este tipo celular. Por el contrario, Katerinaki *et al.* (66) observaron una disminución en la expresión de ICAM-1 en células de melanoma tratadas con SAL a concentraciones entre 1 y 5 mM. Asimismo, otros autores demostraron la disminución en la expresión de ICAM-1 por el ácido acetil salicílico en células HUVEC y retinales estimuladas con LPS (15, 63, 136). Además, el salicilato de sodio demostró reducir la expresión de ICAM-1 en las células HUVEC estimuladas con LPS (0,1 µg/ml) en el rango de concentraciones de 0,02 a 20 mM (136). Por lo tanto, la discrepancia de los resultados obtenidos en el presente trabajo podría deberse a las diferentes condiciones experimentales utilizadas respecto a los otros estudios.

S. aureus es capaz de generar una respuesta inflamatoria a través de diferentes factores, tales como el peptidoglicano, hemolisinas y proteína A (33). Por el contrario, muchos otros factores de virulencia de esta bacteria (Efb, CHIPS, entre otros) poseen una acción antiinflamatoria lo que le permite evadir la respuesta inmune del huésped (17). En particular, la proteína Eap puede actuar promoviendo la síntesis de citoquinas proinflamatorias en monocitos y macrófagos, mientras que posee una acción antiinflamatoria al unirse a ICAM-1 y de esta manera bloquear la interacción de los leucocitos con las células endoteliales (16, 116). Asimismo, altas concentraciones de Eap (81 µg/ml) produjeron un efecto inhibitorio de la proliferación de PBMCs, mientras que a bajas

concentraciones (9 $\mu\text{g/ml}$) Eap estimuló la proliferación de estas células (46). Recientemente, se determinó que Eap inhibió el reclutamiento de células T en un modelo de psoriasis en ratón a través de su interacción con ICAM-1 (129). Asimismo, Xie *et al.* (135) reportaron que Eap fue capaz de inhibir la encefalomiелitis en ratón a través del mismo mecanismo. En el presente trabajo, se demostró que la mutante R11eap generó un aumento significativo en la síntesis de TNF- α en las células endoteliales comparado con la cepa R11. Este resultado le atribuiría un rol antiinflamatorio a la proteína Eap. En conjunto, se desprende que Eap podría constituir un tratamiento efectivo contra enfermedades inflamatorias crónicas.

Endres *et al.* (29) demostraron que la administración de aspirina a personas sanas durante 14 días no generó cambios en los niveles de TNF- α sintetizados por los PBMCs luego de la estimulación con LPS. En concordancia con estos resultados, en el presente trabajo, el tratamiento de las células endoteliales con SAL no produjo diferencias significativas en la producción de TNF- α luego de la infección con la cepa Newman R11. Por otro lado, el salicilato de sodio a una concentración de 20 mM provocó una disminución en los niveles de TNF- α en macrófagos murinos estimulados con LPS (128). Esta discrepancia podría ser explicada por las diferentes líneas celulares, estímulos, concentraciones y diferentes salicilatos utilizados.

La portación nasal de *S. aureus* en humanos es un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades graves (67). Karabay *et al.* (64) observaron que los pacientes que ingirieron aspirina en bajas dosis por un tiempo prolongado tuvieron una baja prevalencia de portación nasal de *S. aureus*. Por otro lado, Eisen *et al.* (28) demostraron que la administración de aspirina a pacientes con endocarditis por *S. aureus* estaba asociada a un riesgo menor

de complicaciones post-infección (por ej. cirugía de reemplazo de válvula). Con el fin de evaluar el efecto del SAL *in vivo* se utilizó un modelo murino de colonización nasal de *S. aureus*. Al respecto, se observó una disminución del nivel de colonización de *S. aureus* a las 4 hs post-infección en el grupo de ratones inyectados previamente con SAL comparado con el grupo control. La aparente discrepancia de estos resultados con la mayor capacidad de invasión celular de *S. aureus* inducida por el SAL, puede ser explicada por el hecho de que el SAL administrado al huésped desencadenaría una serie de eventos que podrían promover la eliminación de la bacteria. Por otro lado, el tiempo de contacto entre la bacteria y el SAL en este modelo *in vivo* no sería suficiente para generar la expresión alterada de PC y Eap en la cepa Newman que se observó *in vitro*.

La importancia de este estudio radica en el hecho de que provee información básica acerca de un fármaco, el SAL, que afecta la expresión de los sistemas regulatorios de *S. aureus* lo que podría causar un impacto inesperado en el curso y tratamiento de la infección. Por cierto, la información obtenida mediante esta investigación podrá extenderse en un futuro al estudio de nuevas estrategias terapéuticas destinadas al control y prevención de las infecciones estafilocócicas en grupos de riesgo.

En el presente trabajo de tesis se realizaron ensayos para establecer el efecto del SAL sobre la virulencia de *S. aureus* y su interacción con el huésped. Los resultados descriptos permitieron concluir:

1. El tratamiento con SAL provocó un aumento en la capacidad de invasión de la cepa Newman en las células epiteliales.
2. Las cepas no capsuladas RN6390 y Reynolds PC- mostraron una capacidad aumentada para invadir las células epiteliales con respecto a las capsuladas Newman y Reynolds PC5+ , por lo tanto la ausencia de cápsula favoreció la internalización de *S. aureus*.
3. El SAL indujo una disminución en la actividad del promotor *cap*, como así también en la expresión de transcritos *cap* y de PC5.
4. La expresión de proteínas de pared, exoproteínas y proteínas de superficie de *S. aureus* fue afectada por el tratamiento con SAL.
5. El SAL indujo la actividad del promotor *eap*, como así también la expresión de los transcritos *eap* y de la proteína Eap.
6. Eap juega un rol importante en la internalización de la cepa Newman en células epiteliales y endoteliales.

7. La actividad del promotor P_c del locus *sae* no fue afectada por el SAL, mientras que la cantidad de transcritos *saeB*, C y D aumento luego del tratamiento con SAL.
8. El sistema regulatorio *sae* es esencial para la expresión de Eap.
9. La actividad de *sae* y, por lo tanto, los factores regulados por este locus, son importantes para la invasión celular de *S. aureus*.
10. El tratamiento con SAL provocó una disminución en la actividad del promotor *mgrA*, así como también en la expresión de los transcritos *mgrA*.
11. El regulador *mgrA* es esencial para la expresión de PC5.
12. *mgrA* indujo la expresión del promotor *eap*, sin embargo esto no se reflejó en un aumento de la proteína Eap.
13. La presencia del gen *mgrA* generó una disminución en la capacidad de adhesión de *S. aureus*.
14. La acción del SAL sobre las células endoteliales produjo una menor tasa de invasión por parte de la cepa Newman R11 de *S. aureus*, mientras que no modificó la internalización de su mutante *eap*.

15. La presencia del gen *eap* inhibió la síntesis de TNF- α en células endoteliales.

16. El tratamiento de las células endoteliales con SAL no produjo cambios significativos en la producción de TNF- α inducida por la infección de *S. aureus*.

17. La producción de Eap es fundamental para la colonización nasal de *S. aureus*.

18. La colonización nasal de *S. aureus* disminuyó luego del tratamiento del huésped con SAL.

1. **Adhikari, R. P., and R. P. Novick.** 2008. Regulatory organization of the staphylococcal *sae* locus. *Microbiology* **154**:949-959.
2. **Alekshun, M. N., and S. B. Levy.** 1999. The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol* **7**:410-413.
3. **Arrecubieta, C. L., FD.** 2006. *Staphylococcus aureus*-eukaryotic cell interactions., p. 517-525. *In* V. N. Fischetti, RP.; Ferretti, JJ.; Portnoy, DA.; Rood, JI. (ed.), *Gram-positive pathogens*., 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
4. **Bayles, K. W., C. A. Wesson, L. E. Liou, L. K. Fox, G. A. Bohach, and W. R. Trumble.** 1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun* **66**:336-342.
5. **Bernardo, K., N. Pakulat, S. Fleer, A. Schnaith, O. Utermohlen, O. Krut, S. Muller, and M. Kronke.** 2004. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:546-555.
6. **Bischoff, M., P. Dunman, J. Kormanec, D. Macapagal, E. Murphy, W. Mounts, B. Berger-Bachi, and S. Projan.** 2004. Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus* *sigmaB* regulon. *J Bacteriol* **186**:4085-4099.
7. **Blickwede, M., R. Goethe, C. Wolz, P. Valentin-Weigand, and S. Schwarz.** 2005. Molecular basis of florfenicol-induced increase in adherence of *Staphylococcus aureus* strain Newman. *J Antimicrob Chemother* **56**:315-323.

8. **Boden, M. K., and J. I. Flock.** 1992. Evidence for three different fibrinogen-binding proteins with unique properties from *Staphylococcus aureus* strain Newman. *Microb Pathog* **12**:289-298.
9. **Bronner, S., H. Monteil, and G. Prevost.** 2004. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev* **28**:183-200.
10. **Brouillette, E., G. Grondin, L. Shkreta, P. Lacasse, and B. G. Talbot.** 2003. In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb Pathog* **35**:159-168.
11. **Buckling, A., J. Neilson, J. Lindsay, R. ffrench-Constant, M. Enright, N. Day, and R. C. Massey.** 2005. Clonal distribution and phase-variable expression of a major histocompatibility complex analogue protein in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **187**:2917-2919.
12. **Buzzola, F. R., L. P. Alvarez, L. P. Tuchscher, M. S. Barbagelata, S. M. Lattar, L. Calvinho, and D. O. Sordelli.** 2007. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. *Infect Immun* **75**:886-891.
13. **Carlos, T. M., and J. M. Harlan.** 1994. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* **84**:2068-2101.
14. **Collins, T., M. A. Read, A. S. Neish, M. Z. Whitley, D. Thanos, and T. Maniatis.** 1995. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* **9**:899-909.

15. **Costanzo, A., F. Moretti, V. L. Burgio, C. Bravi, F. Guido, M. Levrero, and P. L. Puri.** 2003. Endothelial activation by angiotensin II through NFkappaB and p38 pathways: Involvement of NFkappaB-inducible kinase (NIK), free oxygen radicals, and selective inhibition by aspirin. *J Cell Physiol* **195**:402-410.
16. **Chavakis, T., M. Hussain, S. M. Kanse, G. Peters, R. G. Bretzel, J. I. Flock, M. Herrmann, and K. T. Preissner.** 2002. Staphylococcus aureus extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med* **8**:687-693.
17. **Chavakis, T., K. T. Preissner, and M. Herrmann.** 2007. The anti-inflammatory activities of Staphylococcus aureus. *Trends Immunol* **28**:408-418.
18. **Chen, Z., T. T. Luong, and C. Y. Lee.** 2007. The sbcDC locus mediates repression of type 5 capsule production as part of the SOS response in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* **189**:7343-7350.
19. **Cheung, A. L., A. S. Bayer, G. Zhang, H. Gresham, and Y. Q. Xiong.** 2004. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in Staphylococcus aureus. *FEMS Immunol Med Microbiol* **40**:1-9.
20. **Cheung, A. L., and V. A. Fischetti.** 1988. Variation in the expression of cell wall proteins of Staphylococcus aureus grown on solid and liquid media. *Infect Immun* **56**:1061-1065.
21. **Dassy, B., T. Hogan, T. J. Foster, and J. M. Fournier.** 1993. Involvement of the accessory gene regulator (agr) in expression of type 5 capsular polysaccharide by Staphylococcus aureus. *J Gen Microbiol* **139 Pt 6**:1301-1306.

22. **Domenico, P., D. R. Landolphi, and B. A. Cunha.** 1991. Reduction of capsular polysaccharide and potentiation of aminoglycoside inhibition in gram-negative bacteria by bismuth subsalicylate. *J Antimicrob Chemother* **28**:801-810.
23. **Domenico, P., S. Schwartz, and B. A. Cunha.** 1989. Reduction of capsular polysaccharide production in *Klebsiella pneumoniae* by sodium salicylate. *Infect Immun* **57**:3778-3782.
24. **Dong, Z., C. Huang, R. E. Brown, and W. Y. Ma.** 1997. Inhibition of activator protein 1 activity and neoplastic transformation by aspirin. *J Biol Chem* **272**:9962-9970.
25. **Donlan, R. M., and J. W. Costerton.** 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**:167-193.
26. **Duthie, E. S., and L. L. Lorenz.** 1952. Staphylococcal coagulase; mode of action and antigenicity. *J Gen Microbiol* **6**:95-107.
27. **Edgell, C. J., C. C. McDonald, and J. B. Graham.** 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:3734-3737.
28. **Eisen, D. P., G. R. Corey, E. S. McBryde, V. G. Fowler, Jr., J. M. Miro, C. H. Cabell, A. C. Street, M. G. Paiva, A. Ionac, R. S. Tan, C. Tribouilloy, O. Pachirat, S. B. Jones, N. Chipigina, C. Naber, A. Pan, V. Ravasio, R. Gattringer, V. H. Chu, and A. S. Bayer.** 2009. Reduced valve replacement surgery and complication rate in *Staphylococcus aureus* endocarditis patients receiving acetylsalicylic acid. *J Infect* **58**:332-338.

29. **Endres, S., R. E. Whitaker, R. Ghorbani, S. N. Meydani, and C. A. Dinarello.** 1996. Oral aspirin and ibuprofen increase cytokine-induced synthesis of IL-1 beta and of tumour necrosis factor-alpha ex vivo. *Immunology* **87**:264-270.
30. **Farthing, D., L. Gehr, H. T. Karnes, D. Sica, T. Gehr, T. Larus, C. Farthing, and L. Xi.** 2007. Effects of salicylic acid on post-ischaemic ventricular function and purine efflux in isolated mouse hearts. *Biomarkers* **12**:623-634.
31. **Foster, T. J.** 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* **3**:948-958.
32. **Foster, T. J., and M. Hook.** 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* **6**:484-488.
33. **Fournier, B., and D. J. Philpott.** 2005. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* **18**:521-540.
34. **Franklin D., L. M. D.** 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *Medical Progress* **339**:520-532.
35. **Geiger, T., C. Goerke, M. Mainiero, D. Kraus, and C. Wolz.** 2008. The virulence regulator Sae of *Staphylococcus aureus*: promoter activities and response to phagocytosis-related signals. *J Bacteriol* **190**:3419-3428.
36. **Geisbrecht, B. V., B. Y. Hamaoka, B. Perman, A. Zemla, and D. J. Leahy.** 2005. The crystal structures of EAP domains from *Staphylococcus aureus* reveal an unexpected homology to bacterial superantigens. *J Biol Chem* **280**:17243-17250.

37. **Giraud, A. T., A. Calzolari, A. A. Cataldi, C. Bogni, and R. Nagel.** 1999. Corrigendum to: "The sae locus of staphylococcus aureus encodes a two-component regulatory system". FEMS Microbiol Lett **180**:117.
38. **Giraud, A. T., A. Calzolari, A. A. Cataldi, C. Bogni, and R. Nagel.** 1999. The sae locus of Staphylococcus aureus encodes a two-component regulatory system. FEMS Microbiol Lett **177**:15-22.
39. **Giraud, A. T., A. L. Cheung, and R. Nagel.** 1997. The sae locus of Staphylococcus aureus controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. Arch Microbiol **168**:53-58.
40. **Giraud, A. T., C. Mansilla, A. Chan, C. Raspanti, and R. Nagel.** 2003. Studies on the expression of regulatory locus sae in Staphylococcus aureus. Curr Microbiol **46**:246-250.
41. **Goerke, C., U. Fluckiger, A. Steinhuber, V. Bisanzio, M. Ulrich, M. Bischoff, J. M. Patti, and C. Wolz.** 2005. Role of Staphylococcus aureus global regulators sae and sigmaB in virulence gene expression during device-related infection. Infect Immun **73**:3415-3421.
42. **Goerke, C., U. Fluckiger, A. Steinhuber, W. Zimmerli, and C. Wolz.** 2001. Impact of the regulatory loci agr, sarA and sae of Staphylococcus aureus on the induction of alpha-toxin during device-related infection resolved by direct quantitative transcript analysis. Mol Microbiol **40**:1439-1447.
43. **Grundmeier, M., M. Hussain, P. Becker, C. Heilmann, G. Peters, and B. Sinha.** 2004. Truncation of fibronectin-binding proteins in Staphylococcus aureus strain Newman leads to deficient

adherence and host cell invasion due to loss of the cell wall anchor function. *Infect Immun* **72**:7155-7163.

44. **Gustafson, J. E., P. V. Candelaria, S. A. Fisher, J. P. Goodridge, T. M. Lichocik, T. M. McWilliams, C. T. Price, F. G. O'Brien, and W. B. Grubb.** 1999. Growth in the presence of salicylate increases fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:990-992.

45. **Haggar, A., M. Hussain, H. Lonnie, M. Herrmann, A. Norrby-Teglund, and J. I. Flock.** 2003. Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect Immun* **71**:2310-2317.

46. **Haggar, A., O. Shannon, A. Norrby-Teglund, and J. I. Flock.** 2005. Dual effects of extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* on peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis* **192**:210-217.

47. **Hammel, M., D. Nemecek, J. A. Keightley, G. J. Thomas, Jr., and B. V. Geisbrecht.** 2007. The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein (Eap) adopts an elongated but structured conformation in solution. *Protein Sci* **16**:2605-2617.

48. **Harraghy, N., M. Hussain, A. Haggar, T. Chavakis, B. Sinha, M. Herrmann, and J. I. Flock.** 2003. The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology* **149**:2701-2707.

49. **Harraghy, N., J. Kormanec, C. Wolz, D. Homerova, C. Goerke, K. Ohlsen, S. Qazi, P. Hill, and M. Herrmann.** 2005. *sae* is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp. *Microbiology* **151**:1789-1800.

50. **Hauck, C. R., and K. Ohlsen.** 2006. Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol* **9**:5-11.
51. **Herbert, S., D. Worlitzsch, B. Dassy, A. Boutonnier, J. M. Fournier, G. Bellon, A. Dalhoff, and G. Doring.** 1997. Regulation of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5: CO₂ inhibition in vitro and in vivo. *J Infect Dis* **176**:431-438.
52. **Hussain, M., K. Becker, C. von Eiff, G. Peters, and M. Herrmann.** 2001. Analogs of Eap protein are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**:1271-1276.
53. **Hussain, M., A. Hagggar, C. Heilmann, G. Peters, J. I. Flock, and M. Herrmann.** 2002. Insertional inactivation of Eap in *Staphylococcus aureus* strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts. *Infect Immun* **70**:2933-2940.
54. **Hussain, M., A. Hagggar, G. Peters, G. S. Chhatwal, M. Herrmann, J. I. Flock, and B. Sinha.** 2008. More than one tandem repeat domain of the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation. *Infect Immun* **76**:5615-5623.
55. **Ingavale, S., W. van Wamel, T. T. Luong, C. Y. Lee, and A. L. Cheung.** 2005. Rat/MgrA, a regulator of autolysis, is a regulator of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **73**:1423-1431.

56. **Ingavale, S. S., W. Van Wamel, and A. L. Cheung.** 2003. Characterization of RAT, an autolysis regulator in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **48**:1451-1466.
57. **Jahreis, A., Y. Yousif, J. A. Rump, R. Drager, A. Vogt, H. H. Peter, and M. Schlesier.** 1995. Two novel cationic staphylococcal proteins induce IL-2 secretion, proliferation and immunoglobulin synthesis in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of both healthy controls and patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol* **100**:406-411.
58. **Jevon, M., C. Guo, B. Ma, N. Mordan, S. P. Nair, M. Harris, B. Henderson, G. Bentley, and S. Meghji.** 1999. Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect Immun* **67**:2677-2681.
59. **Joh, D., E. R. Wann, B. Kreikemeyer, P. Speziale, and M. Hook.** 1999. Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix Biol* **18**:211-223.
60. **Johnson, M., A. Cockayne, and J. A. Morrissey.** 2008. Iron-regulated biofilm formation in *Staphylococcus aureus* Newman requires *ica* and the secreted protein Emp. *Infect Immun* **76**:1756-1765.
61. **Jonsson, K., D. McDevitt, M. H. McGavin, J. M. Patti, and M. Hook.** 1995. *Staphylococcus aureus* expresses a major histocompatibility complex class II analog. *J Biol Chem* **270**:21457-21460.
62. **Joost, I., D. Blass, M. Burian, C. Goerke, C. Wolz, L. von Muller, K. Becker, K. Preissner, M. Herrmann, and M. Bischoff.** 2009. Transcription analysis of the extracellular adherence protein

from *Staphylococcus aureus* in authentic human infection and in vitro. *J Infect Dis* **199**:1471-1478.

63. **Joussen, A. M., V. Poulaki, N. Mitiades, B. Kirchhof, K. Koizumi, S. Dohmen, and A. P. Adamis.** 2002. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-alpha suppression. *FASEB J* **16**:438-440.

64. **Karabay, O., H. Arinc, H. Gunduz, A. Tamer, H. Ozhan, and C. Uyan.** 2006. A new effect of acetylsalicylic acid? Significantly lower prevalence of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among patients receiving orally administered acetylsalicylic acid. *Infect Control Hosp Epidemiol* **27**:318-319.

65. **Karakawa, W. W., J. M. Fournier, W. F. Vann, R. Arbeit, R. S. Schneerson, and J. B. Robbins.** 1985. Method for the serological typing of the capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **22**:445-447.

66. **Katerinaki, E., J. W. Haycock, R. Lalla, K. E. Carlson, Y. Yang, R. P. Hill, P. C. Lorigan, and S. MacNeil.** 2006. Sodium salicylate inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB activation, cell migration, invasion and ICAM-1 expression in human melanoma cells. *Melanoma Res* **16**:11-22.

67. **Kluytmans, J., A. van Belkum, and H. Verbrugh.** 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* **10**:505-520.

68. **Kopp, E., and S. Ghosh.** 1994. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* **265**:956-959.

69. **Kreikemeyer, B., D. McDevitt, and A. Podbielski.** 2002. The role of the map protein in *Staphylococcus aureus* matrix protein and eukaryotic cell adherence. *Int J Med Microbiol* **292**:283-295.
70. **Kubica, M., K. Guzik, J. Koziel, M. Zarebski, W. Richter, B. Gajkowska, A. Golda, A. Maciag-Gudowska, K. Brix, L. Shaw, T. Foster, and J. Potempa.** 2008. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One* **3**:e1409.
71. **Kullik, I., P. Giachino, and T. Fuchs.** 1998. Deletion of the alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *J Bacteriol* **180**:4814-4820.
72. **Kupferwasser, L. I., M. R. Yeaman, C. C. Nast, D. Kupferwasser, Y. Q. Xiong, M. Palma, A. L. Cheung, and A. S. Bayer.** 2003. Salicylic acid attenuates virulence in endovascular infections by targeting global regulatory pathways in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* **112**:222-233.
73. **Kupferwasser, L. I., M. R. Yeaman, S. M. Shapiro, C. C. Nast, P. M. Sullam, S. G. Filler, and A. S. Bayer.** 1999. Acetylsalicylic acid reduces vegetation bacterial density, hematogenous bacterial dissemination, and frequency of embolic events in experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis through antiplatelet and antibacterial effects. *Circulation* **99**:2791-2797.
74. **Lee, L. Y., Y. J. Miyamoto, B. W. McIntyre, M. Hook, K. W. McCrea, D. McDevitt, and E. L. Brown.** 2002. The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *J Clin Invest* **110**:1461-1471.

75. **Li, D., and A. Cheung.** 2008. Repression of hla by rot is dependent on sae in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **76**:1068-1075.
76. **Livak, K. J., and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**:402-408.
77. **Lowy, F. D.** 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **339**:520-532.
78. **Luong, T. T., P. M. Dunman, E. Murphy, S. J. Projan, and C. Y. Lee.** 2006. Transcription Profiling of the mgrA Regulon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **188**:1899-1910.
79. **Luong, T. T., and C. Y. Lee.** 2006. The arl locus positively regulates *Staphylococcus aureus* type 5 capsule via an mgrA-dependent pathway. *Microbiology* **152**:3123-3131.
80. **Luong, T. T., and C. Y. Lee.** 2002. Overproduction of type 8 capsular polysaccharide augments *Staphylococcus aureus* virulence. *Infect Immun* **70**:3389-3395.
81. **Luong, T. T., S. W. Newell, and C. Y. Lee.** 2003. Mgr, a novel global regulator in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **185**:3703-3710.
82. **Mainiero, M., C. Goerke, T. Geiger, C. Gonser, S. Herbert, and C. Wolz.** Differential target gene activation by the *Staphylococcus aureus* two-component system saeRS. *J Bacteriol* **192**:613-623.

83. **Manna, A., and A. L. Cheung.** 2001. Characterization of sarR, a modulator of sar expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **69**:885-896.
84. **McCormick, J. K., J. M. Yarwood, and P. M. Schlievert.** 2001. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol* **55**:77-104.
85. **Meade, E. A., W. L. Smith, and D. L. DeWitt.** 1993. Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* **268**:6610-6614.
86. **Menzies, B. E.** 2003. The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Curr Opin Infect Dis* **16**:225-229.
87. **Menzies, B. E., and I. Kourteva.** 1998. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect Immun* **66**:5994-5998.
88. **Mitchell, J. A., P. Akarasereenont, C. Thiemermann, R. J. Flower, and J. R. Vane.** 1993. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:11693-11697.
89. **Moreillon, P., Y.I. Que, and M.P. Glauser.** 2005. *Staphylococcus aureus*, p. 2321-2351. *In* J. E. B. G. L. Mandell, and R. Dolin (ed.), *Principles and practice of infectious disease*. Elsevier-Churchill Livingstone, Philadelphia.
90. **Needs, C. J., and P. M. Brooks.** 1985. Clinical pharmacokinetics of the salicylates. *Clin Pharmacokinet* **10**:164-177.

91. **Nitsche-Schmitz, D. P., M. Rohde, and G. S. Chhatwal.** 2007. Invasion mechanisms of Gram-positive pathogenic cocci. *Thromb Haemost* **98**:488-496.
92. **Novick, R. P.** 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* **48**:1429-1449.
93. **Novick, R. P.** 1991. Genetic systems in staphylococci. *Methods Enzymol* **204**:587-636.
94. **Novick, R. P., and D. Jiang.** 2003. The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with agr quorum sensing. *Microbiology* **149**:2709-2717.
95. **O'Riordan, K., and J. C. Lee.** 2004. Staphylococcus aureus capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* **17**:218-234.
96. **Ouyang, S., S. Sau, and C. Y. Lee.** 1999. Promoter analysis of the cap8 operon, involved in type 8 capsular polysaccharide production in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* **181**:2492-2500.
97. **Palma, M., A. Bayer, L. I. Kupferwasser, T. Joska, M. R. Yeaman, and A. Cheung.** 2006. Salicylic acid activates sigma factor B by rsbU-dependent and -independent mechanisms. *J Bacteriol* **188**:5896-5903.
98. **Palma, M., A. Hagggar, and J. I. Flock.** 1999. Adherence of Staphylococcus aureus is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol* **181**:2840-2845.
99. **Park, W. B., S. H. Kim, J. H. Cho, J. H. Bang, H. B. Kim, N. J. Kim, M. D. Oh, and K. W. Choe.** 2007. Effect of salicylic acid on

invasion of human vascular endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **49**:56-61.

100. **Patti, J. M., B. L. Allen, M. J. McGavin, and M. Hook.** 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* **48**:585-617.

101. **Pohlmann-Dietze, P., M. Ulrich, K. B. Kiser, G. Doring, J. C. Lee, J. M. Fournier, K. Botzenhart, and C. Wolz.** 2000. Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator agr, and bacterial growth phase. *Infect Immun* **68**:4865-4871.

102. **Poutrel, B., F. B. Gilbert, and M. Lebrun.** 1995. Effects of culture conditions on production of type 5 capsular polysaccharide by human and bovine *Staphylococcus aureus* strains. *Clin Diagn Lab Immunol* **2**:166-171.

103. **Poutrel, B., P. Rainard, and P. Sarradin.** 1997. Heterogeneity of cell-associated CP5 expression on *Staphylococcus aureus* strains demonstrated by flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* **4**:275-278.

104. **Prevost, G., P. Couppie, and H. Monteil.** 2003. Staphylococcal epidermolysins. *Curr Opin Infect Dis* **16**:71-76.

105. **Price, C. T., and J. E. Gustafson.** 2001. Increases in the mutation frequency at which fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus* arise with salicylate. *J Med Microbiol* **50**:104-106.

106. **Price, C. T., G. W. Kaatz, and J. E. Gustafson.** 2002. The multidrug efflux pump NorA is not required for salicylate-induced

reduction in drug accumulation by *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* **20**:206-213.

107. **Price, C. T., F. G. O'Brien, B. P. Shelton, J. R. Warmington, W. B. Grubb, and J. E. Gustafson.** 1999. Effects of salicylate and related compounds on fusidic acid MICs in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **44**:57-64.

108. **Prithiviraj, B., H. P. Bais, A. K. Jha, and J. M. Vivanco.** 2005. *Staphylococcus aureus* pathogenicity on *Arabidopsis thaliana* is mediated either by a direct effect of salicylic acid on the pathogen or by SA-dependent, NPR1-independent host responses. *Plant J* **42**:417-432.

109. **Prithiviraj, B., H. P. Bais, T. Weir, B. Suresh, E. H. Najarro, B. V. Dayakar, H. P. Schweizer, and J. M. Vivanco.** 2005. Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by salicylic acid attenuates its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*. *Infect Immun* **73**:5319-5328.

110. **Proctor, R. A., B. Kahl, C. von Eiff, P. E. Vaudaux, D. P. Lew, and G. Peters.** 1998. Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clin Infect Dis* **27 Suppl 1**:S68-74.

111. **Proctor, R. A., and G. Peters.** 1998. Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Infect Dis* **27**:419-422.

112. **Riordan, J. T., A. Muthaiyan, W. Van Voorhies, C. T. Price, J. E. Graham, B. J. Wilkinson, and J. E. Gustafson.** 2007. Response of *Staphylococcus aureus* to salicylate challenge. *J Bacteriol* **189**:220-227.

113. **Rogasch, K., V. Ruhmling, J. Pane-Farre, D. Hoper, C. Weinberg, S. Fuchs, M. Schmudde, B. M. Broker, C. Wolz, M. Hecker, and S. Engelmann.** 2006. Influence of the two-component system SaeRS on global gene expression in two different *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol* **188**:7742-7758.
114. **Ryan, K., and C. Ray.** 2004. *Sherris Medical Microbiology*, 4th ed. ed. McGraw Hill
115. **Sau, S., J. Sun, and C. Y. Lee.** 1997. Molecular characterization and transcriptional analysis of type 8 capsule genes in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **179**:1614-1621.
116. **Scriba, T. J., S. Sierro, E. L. Brown, R. E. Phillips, A. K. Sewell, and R. C. Massey.** 2008. The *Staphylococcus aureus* Eap protein activates expression of proinflammatory cytokines. *Infect Immun* **76**:2164-2168.
117. **Schafer, D., T. T. Lam, T. Geiger, M. Mainiero, S. Engelmann, M. Hussain, A. Bosserhoff, M. Frosch, M. Bischoff, C. Wolz, J. Reidl, and B. Sinha.** 2009. A point mutation in the sensor histidine kinase SaeS of *Staphylococcus aureus* strain Newman alters response to biocide exposure. *J Bacteriol*.
118. **Schaffer, A. C., and J. C. Lee.** 2008. Vaccination and passive immunisation against *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* **32 Suppl 1**:S71-78.
119. **Sinha, B., P. P. Francois, O. Nusse, M. Foti, O. M. Hartford, P. Vaudaux, T. J. Foster, D. P. Lew, M. Herrmann, and K. H. Krause.** 1999. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5\beta 1$. *Cell Microbiol* **1**:101-117.

120. **Springer, T. A.** 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**:425-434.
121. **Steinhuber, A., C. Goerke, M. G. Bayer, G. Doring, and C. Wolz.** 2003. Molecular architecture of the regulatory Locus sae of *Staphylococcus aureus* and its impact on expression of virulence factors. *J Bacteriol* **185**:6278-6286.
122. **Strindhall, J., P. E. Lindgren, S. Lofgren, and E. Kihlstrom.** 2002. Variations among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* to induce expression of E-selectin and ICAM-1 in human endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* **32**:227-235.
123. **Tollersrud, T., K. Kenny, A. J. Reitz, Jr., and J. C. Lee.** 2000. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. *J Clin Microbiol* **38**:2998-3003.
124. **Trotonda, M. P., S. Tamber, G. Memmi, and A. L. Cheung.** 2008. MgrA represses biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **76**:5645-5654.
125. **Truong-Bolduc, Q. C., Y. Ding, and D. C. Hooper.** 2008. Posttranslational modification influences the effects of MgrA on norA expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **190**:7375-7381.
126. **van Wamel, W., Y. Q. Xiong, A. S. Bayer, M. R. Yeaman, C. C. Nast, and A. L. Cheung.** 2002. Regulation of *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharides by agr and sarA in vitro and in an experimental endocarditis model. *Microb Pathog* **33**:73-79.

127. **Vane, J., and R. Botting.** 1992. The history of aspirin, p. 3-34. Aspirin and other salicylates. Chapman and Hall, London.
128. **Vittimberga, F. J., Jr., T. P. McDade, R. A. Perugini, and M. P. Callery.** 1999. Sodium salicylate inhibits macrophage TNF-alpha production and alters MAPK activation. *J Surg Res* **84**:143-149.
129. **Wang, H., J. von Rohrscheidt, J. Roehrbein, T. Peters, A. Sindrilaru, D. Kess, K. T. Preissner, and K. Scharffetter-Kochanek.** 2009. Extracellular Adherence Protein of *Staphylococcus aureus* Suppresses Disease by Inhibiting T-Cell Recruitment in a Mouse Model of Psoriasis. *J Invest Dermatol*.
130. **Wann, E. R., B. Dassy, J. M. Fournier, and T. J. Foster.** 1999. Genetic analysis of the cap5 locus of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **170**:97-103.
131. **Watts, A., D. Ke, Q. Wang, A. Pillay, A. Nicholson-Weller, and J. C. Lee.** 2005. *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. *Infect Immun* **73**:3502-3511.
132. **Weichhart, T., M. Horky, J. Sollner, S. Gangl, T. Henics, E. Nagy, A. Meinke, A. von Gabain, C. M. Fraser, S. R. Gill, M. Hafner, and U. von Ahsen.** 2003. Functional selection of vaccine candidate peptides from *Staphylococcus aureus* whole-genome expression libraries in vitro. *Infect Immun* **71**:4633-4641.
133. **Wesson, C. A., L. E. Liou, K. M. Todd, G. A. Bohach, W. R. Trumble, and K. W. Bayles.** 1998. *Staphylococcus aureus* Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. *Infect Immun* **66**:5238-5243.

134. **Wu, K. K.** 2000. Aspirin and salicylate: An old remedy with a new twist. *Circulation* **102**:2022-2023.

135. **Xie, C., P. Alcaide, B. V. Geisbrecht, D. Schneider, M. Herrmann, K. T. Preissner, F. W. Luscinskas, and T. Chavakis.** 2006. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med* **203**:985-994.

136. **Zund, G., A. L. Dzus, R. Pretre, U. Niederhauser, P. Vogt, and M. Turina.** 1998. Endothelial cell injury in cardiac surgery: salicylate may be protective by reducing expression of endothelial adhesion molecules. *Eur J Cardiothorac Surg* **13**:293-297.