



Universitat
de les Illes Balears

PGRP2 como posible diana para la inhibición de la
respuesta inflamatoria descontrolada ante la infección
por *Pseudomonas aeruginosa*

Marina Sarrió Cañellas

Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Máster Universitario en Microbiología Avanzada
(Especialidad/Itinerario Investigación en Microbiología Sanitaria)

de la
UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Curso Académico 2017-2018

Fecha

9 Julio 2018

Nombre Tutor del Trabajo

Carlos Juan Nicolau

ÍNDICE

Resumen	5
Palabras clave	5
1. Introducción	6
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : características generales	6
1.2. Relevancia clínica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.3. Relación patogenia-inflamación en las infecciones agudas nosocomiales	9
1.4. Implicación del peptidoglicano de las bacterias gramnegativas en la inflamación. Receptores humanos para el peptidoglicano	11
1.5. Función de la <i>Peptidoglycan Recognition Protein 2</i> (PGRP2) en la regulación de la inflamación	15
1.6. Hipótesis y objetivos del trabajo	17
2. Materiales y métodos	18
2.1. Estirpes bacterianas, cultivos celulares y oligonucleótidos	18
2.2. Preparación de los inóculos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
2.3. Cultivo celular	19
2.4. Protocolo de silenciamiento con <i>small interfering RNA</i> (siRNA)	20
2.5. Extracción de RNA	21
2.6. Cuantificación de silenciamiento: RT-PCR en tiempo real	22
2.7. Protocolo de infección	22
2.8. Ensayo de citotoxicidad	23
2.9. Ensayo de respuesta inflamatoria (ELISA IL-8)	23
2.10. Análisis estadístico	24
3. Resultados	24
3.1. Cultivo celular HepG2	24
3.1.1. Nivel de silenciamiento	24
3.1.2. Nivel de citotoxicidad celular tras el silenciamiento	25
3.1.3. Nivel de inflamación tras el silenciamiento	26
3.2. Cultivo celular A549	26
3.2.1. Nivel de citotoxicidad celular tras adicionar PGRP2	26
3.2.2. Nivel de inflamación celular tras adicionar PGRP2	27
4. Discusión	28
5. Conclusiones	32
Bibliografía	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de las estirpes bacterianas y líneas celulares utilizadas	18
Tabla 2. Lista de oligonucleótidos y siRNA utilizada en este trabajo	18
Tabla 3. Representación del porcentaje medio de expresión del gen silenciado	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen de microscopía electrónica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
Figura 2. Esquema de la estructura del peptidoglicano (PGN)	12
Figura 3. Esquema del papel de PGRP2 en la inducción de artritis	15
Figura 4. Representación gráfica del ensayo LDH para las células HepG2	25
Figura 5. Representación gráfica del ensayo de respuesta inflamatoria en las células HepG2	26
Figura 6. Representación gráfica del ensayo de LDH para el cultivo celular A549	27
Figura 7. Representación gráfica del ensayo de respuesta inflamatoria en las células A549	27

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Cálculo del umbral de ciclos de RT-PCR	21
Ecuación 2. Cálculo porcentaje de silenciamiento	22

Resumen

Dado el grave problema que supone la resistencia a los antibióticos en patógenos gramnegativos nosocomiales, es urgente hallar nuevas opciones de tratamiento. Estas nuevas opciones deben estar destinadas, si no a eliminar al patógeno directamente, al menos sí a reducir la patogenia de la infección. Pero para ello, primero es necesario identificar nuevas dianas susceptibles de ser usadas como terapéuticas. En este sentido, clásicamente se ha considerado el peptidoglicano (PGN) de bacterias gramnegativas como un agente poco influyente en la patogenia, al estar recubierto por otras estructuras como la membrana externa y el lipopolisacárido. Sin embargo, poco a poco han aparecido trabajos que lo relacionan con la patogenia autolesiva causada por la respuesta inflamatoria descontrolada que ocurre habitualmente en respuesta a infecciones agudas nosocomiales como la neumonía y más aún las sepsis y shock séptico. Dados los controvertidos indicios publicados acerca de la implicación del PGN gramnegativo y la *Peptidoglycan Recognition Protein 2* (PGRP2) en esta situación, decidimos realizar un estudio para desentrañar el potencial papel de esta proteína como regulador de la inflamación causada en respuesta a la detección del PGN de gramnegativos, tomando como modelo *Pseudomonas aeruginosa*. Así pues, realizaron estudios de infección con *Pseudomonas aeruginosa* sobre cultivos hepáticos HepG2 que presentaban la proteína PGRP2 silenciada. Los resultados obtenidos en este aspecto fueron poco concluyentes, remarcando la necesidad de un mejor protocolo de silenciamiento y de tiempo de infección para poder apreciar diferencias en la inflamación al comparar cultivos infectados vs no infectados. Por otro lado, también se realizaron estudios de expresión de IL-8 sobre células no hepáticas (A549) sobre las que se adicionó no solo el patógeno PAO1, sino también la proteína PGRP2 purificada (en concentración fisiológica y cuatro veces ésta). En esta línea de experimentos, los resultados fueron más alentadores, especialmente para la alta concentración de PGRP2. En esta línea, los resultados obtenidos parecen sugerir un papel pro-inflamatorio por parte de la proteína PGRP2, en respuesta a la presencia de *P. aeruginosa*, aunque también remarcan la necesidad de más ensayos. La confirmación de los resultados preliminares obtenidos en este trabajo podrían identificar a la proteína PGRP2 como potencial diana anti-inflamatoria para mejorar el pronóstico de infecciones causadas por *P. aeruginosa*.

Palabras clave: peptidoglicano, PGRP2, *Pseudomonas aeruginosa*, inflamación, IL-8, HepG2, A549, siRNA, LDH.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*: características generales

El género *Pseudomonas* está formado por más de cien especies descritas, formando un grupo muy heterogéneo tanto a nivel fenotípico como a nivel quimiotaxonómico. La gran mayoría de las especies de este género presentan un papel muy importante en la biosfera, actuando como fitopatógenos, patógenos humanos y en procesos de desnitrificación de suelos. Las bacterias que forman parte de este género son bacilos rectos o ligeramente curvados Gram negativos, móviles gracias a uno o varios flagelos polares, y aerobios, con un metabolismo respiratorio muy estricto donde el oxígeno, o en pocas ocasiones el nitrógeno, actúa como receptor final de la cadena de electrones. Gracias a su versatilidad metabólica, el género *Pseudomonas* es capaz de colonizar un gran número de hábitats tanto marinos, acuáticos como en el suelo, aunque los principales ambientes donde es encontrado serían los acuáticos (Verlag *et al.*, 1996; Stover *et al.*, 2000).

Dentro de este género, *Pseudomonas aeruginosa* se considera el principal patógeno (figura 1). Con un gran genoma, de más de 6 Mpb, no es de extrañar su elevada versatilidad metabólica y sus numerosos genes intrínsecos de resistencia a antibióticos. Así mismo, cabe destacar el elevado número de factores de virulencia codificados en su genoma, que van desde factores comunes como el

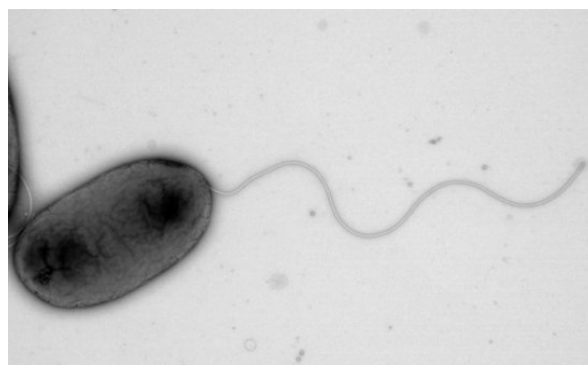


Figura 1. *Pseudomonas aeruginosa* en una imagen de microscopía electrónica, donde se aprecia su flagelo polar.

lipopolisacárido, flagelos y pilis hasta toxinas específicas. Entre las exotoxinas que libera *P. aeruginosa*, destacan la A y la S, capaces de alterar la organización del citoesqueleto celular y provocar necrosis tisular, así como de eliminar las inmunoglobulinas A y G, respectivamente. Otras toxinas (como las codificadas en los genes *exo*) son inyectadas directamente al citoplasma de las células diana mediante sistemas de secreción especializados (como el tipo III), generando un amplio abanico de consecuencias nocivas para ellas. Destacan también la producción de fosfolipasa y la secreción de un exopolisacárido mucoide (alginato), fundamental en el estilo de vida en biofilm, tan importante en infecciones crónicas como las que causa en pacientes con fibrosis quística. Su hiperproducción confiere a las colonias un aspecto mucoide (Robbins, *et al.*, 2015; Ben Haj Khalifa, *et al.*, 201; Delgado-Iribarren, *et al.*).

Una característica común en la mayoría de cepas de *P. aeruginosa* es la producción de pigmentos fluorescentes bajo la luz ultravioleta, como la pioverdina (tono amarillento). Algunas cepas pueden producir, además, pigmentos específicos como la piocinina (azulado), la piorubina (rojizo) o la piomelanina (marrón). Así mismo, también hay cepas que no son capaces de producir pigmentos. Destacar también su incapacidad de fermentar lactosa y su positividad frente a las reacciones de oxidasa y catalasa (Stead, 1992).

En cuanto a la morfología de las colonias, a pesar de su heterogeneidad, se puede decir que *P. aeruginosa* forma colonias grandes, aplanadas, con bordes serrados, con un olor característico durante su crecimiento y a menudo con brillo metálico. La temperatura óptima de crecimiento ronda 30-37°C, pero es capaz de crecer en un elevado rango de temperaturas (20-42°C). Algunas cepas son capaces de crecer incluso a 4°C.

P. aeruginosa puede infectar un gran número de organismos, desde plantas, nematodos, e incluso animales superiores y naturalmente, el hombre. Es una de las principales causas de infecciones oportunistas y/o nosocomiales en humanos, debido, entre otros factores, a su elevada capacidad de resistencia a antibióticos y a desinfectantes que sí son capaces de eliminar a otras bacterias de su nicho ecológico. De hecho, su capacidad de supervivencia sobre superficies inertes y en ambientes humanizados con cierto grado de humedad (grifos, desagües, lavabos, soluciones de limpieza, detergentes, las manos del personal sanitario, etc.) es una de las bases de que sea un microorganismo prácticamente imposible de erradicar en el ambiente hospitalario, lo cual lo convierte en el patógeno nosocomial por excelencia, como se verá en el siguiente apartado (Stover *et al.*, 2000).

1.2. Relevancia clínica de *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es el patógeno más importante dentro de su género, especialmente relevante en el campo de la infección oportunista, en pacientes hospitalizados, huéspedes inmunocomprometidos o individuos con fibrosis quística (FQ). Entre las infecciones causadas por este patógeno adquiridas a nivel extra-hospitalario se deben destacar algunas infecciones de la piel y tejidos blandos, como las foliculitis, la queratitis ulcerosa asociada al uso continuado de lentillas con soluciones de limpieza contaminadas con la bacteria, y la otitis externa. Normalmente son infecciones no muy graves, a excepción de la neumonía extrahospitalaria, que afectaría principalmente a pacientes fumadores expuestos a aerosoles contaminados por el patógeno, con elevados niveles de mortalidad (Maniatis *et al.*, 1995; Driscoll, Brody and Kollef, 2007).

Así mismo, *P. aeruginosa* es reconocido por ser el patógeno hospitalario más frecuentemente aislado, siendo por ello una de las principales causas de infecciones nosocomiales. Un 11-13% de la totalidad de las infecciones nosocomiales son causadas por este patógeno, aumentando su porcentaje en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). Las infecciones nosocomiales más comunes causadas por *P. aeruginosa* son: la neumonía asociada a la ventilación mecánica (VAP), infecciones del tracto urinario o ITUs (9% incidencia en UCI) – aumentando la incidencia en pacientes con sondas urinarias, que son un punto de posible crecimiento de biofilm -, infecciones del torrente sanguíneo o bacteriemias (derivadas de una infección por catéter o bien por la diseminación a partir de una infección localizada), infecciones en sitio quirúrgico, infecciones en la piel debido a quemaduras y finalmente, colonización crónica de los pulmones en pacientes que sufren FQ, tema abordado un poco más abajo. En pacientes con inmunodeficiencia primaria y secundaria, *P. aeruginosa* también juega un papel muy importante. En un estudio realizado por la Dra. B. Green et al., donde se analizaron 111 pacientes diagnosticados con HIV y hospitalizados por neumonía, se vio que *P. aeruginosa* era el patógeno más aislado en la mayoría de pacientes (Driscoll, Brody and Kollef, 2007).

Uno de los tipos de infección por los que *P. aeruginosa* es más conocida, y por ende la más estudiada, son las infecciones en el tracto respiratorio, que pueden ser, como se ha citado, agudas o crónicas. En el caso de la VAP, típico ejemplo de neumonía nosocomial aguda, el dispositivo de respiración artificial, que puede actuar como reservorio del microorganismo en forma de biofilm, es el medio de entrada de la bacteria al árbol respiratorio inferior del paciente, donde causa la infección. La formación del biofilm o biopelícula sobre los dispositivos de ventilación mecánica, pero también en sondas y catéteres, por sus características estructurales, es difícil de erradicar debido a su elevada resistencia a antibióticos y desinfectantes, siendo por tanto una de las claves de su capacidad patogénica.

En cuanto a las infecciones respiratorias crónicas, que derivan de una infección aguda que no ha podido ser eliminada, la FQ es la más estudiada. Los pacientes con FQ tienen una mutación en el regulador de membrana CFTR. Dicha mutación provoca una alteración en las secreciones celulares del paciente (jugos digestivos, sudor, moco, etc...), siendo más viscosas y salinas. Ello contribuye a un moco difícil de eliminar mecánicamente por parte del epitelio respiratorio, que actúa como medio de cultivo para diferentes especies de bacterias, entre las que destaca *P. aeruginosa*. Los patógenos inhalados colonizan esta vía respiratoria alterada, desencadenando una infección respiratoria aguda y una respuesta inflamatoria continua

incapaz de erradicar la infección, e intercalándose con exacerbaciones inflamatorias puntuales mediadas por sobrecrecimientos bacterianos que darán lugar a la infección crónica y a la disminución en la capacidad de la función pulmonar del paciente (Gellatly and Hancock, 2018). También en este contexto, y no sólo sobre superficies inertes como las citadas anteriormente, *P. aeruginosa* adquiere un estilo de vida en biofilm (sustentado en la hiperproducción de un polímero extracelular denominado alginato), que dificulta claramente la difusión de componentes del sistema inmune y de antibióticos, lo cual es otro factor que favorece su persistencia crónica en FQ.

El tratamiento para las infecciones de *P. aeruginosa*, ya sean nosocomiales o no, supone un gran desafío debido a la habilidad para desarrollar resistencia a agentes antimicrobianos, siendo esta capacidad probablemente la característica más llamativa de *P. aeruginosa*. La aparición de cepas resistentes durante la terapia tiene consecuencias obvias, como el incremento en el tiempo de hospitalización del paciente, lo cual tiene graves repercusiones económicas. Las consecuencias clínicas para el paciente son también obvias, al fracasar el tratamiento antibiótico y no erradicarse la infección. Los mecanismos a través de los cuales *P. aeruginosa* adquiere resistencia adicional pueden ser por transmisión horizontal de genes de resistencia (sobre todo genes de Beta-lactamasas) en elementos móviles como plásmidos, o bien por procesos de mutación en genes cromosómicos. Estas mutaciones suelen causar la pérdida de porinas (por las cuales el antibiótico ya no podrá entrar), y/o hiperexpresión de bombas de expulsión de antibióticos, y/o mutaciones en la diana del propio antibiótico, y/o finalmente, la hiperproducción de la Beta-lactamasa cromosómica de *P. aeruginosa*: AmpC. Así *P. aeruginosa* es capaz de adquirir resistencia a prácticamente todos los agentes antimicrobianos (Lister, Wolter and Hanson, 2009). Por todo ello las infecciones por *P. aeruginosa* no son sólo muy comunes, sino que además se han asociado a una elevada morbilidad y mortalidad, en contraste con otros patógenos (Driscoll, Brody and Kollef, 2007). Naturalmente, este panorama de incremento constante de resistencia en *P. aeruginosa* supone que nos estemos quedando sin antibióticos útiles contra esta especie, lo cual obliga a abrir nuevas opciones de tratamiento, como aquellas que pretenden bloquear la virulencia del patógeno (terapias anti-virulencia) así como las que pretenden reducir la inflamación causada por la infección como una de las bases de la patogenia (Nau, 2005; Dickey, Cheung and Otto, 2017).

1.3. Relación patogenicia-inflamación en las enfermedades agudas nosocomiales

La detección de patógenos que invaden nuestro organismo se lleva a cabo a través del sistema inmune (SI) innato, quien usualmente iniciará una cascada de transducción de señales por medio de mediadores químicos en respuesta. Los mediadores químicos más comunes son las citoquinas inflamatorias, entre las que se destacan: TNF- α , GMCSF, IL-1 β , IL-6, IL-8 y IL-18. De esta forma se responde a la presencia de patógenos con una respuesta inflamatoria y una activación inmunitaria controlada, cuyo objetivo es acabar con la infección mediante el reclutamiento de nuevos componentes del SI que irán llegando al foco de la infección. El SI es capaz de detectar patógenos a través de factores de virulencia intrínsecos como por ejemplo el peptidoglicano (PGN) y los ácidos lipoteicoicos de bacterias Gram positivas (BGP) y el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas (BGN) (Wang *et al.*, 2003; Dinarello, 2008). Estos factores son patrones moleculares altamente conservados entre los patógenos y por ello se denominan PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Los PAMPs pueden entrar fácilmente en contacto con las células del huésped al estar expuestos en las envolturas bacterianas, pero también podrían ser elementos menos expuestos, que son liberados al medio exterior durante el crecimiento o la lisis activa o pasiva de la bacteria. Así serán detectados a través de receptores específicos denominados PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), encargados de iniciar la mencionada respuesta del SI.

Al igual que hay variedad de PAMPs, existen diferentes tipos de PRRs (Mogensen, 2009). Los más notables son: los Toll-like receptors (TLR) 2 y 4, situados en la membrana y cuya función es reconocer el PGN y ácidos lipoteicoicos de BGP y el LPS de BGN; y los NOD-like receptors (NOD: *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*), situados en el citoplasma. Entre los NOD-like se debe destacar el papel de NOD1, capaz de reconocer el fragmento de PGN N-acetil glucosamina- N-acetil murámico-tripéptido-diaminopimelato (GM-TriDap) y algunos derivados más cortos, como el dipéptido D- γ -glutamil-meso-diaminopimelato (iEDAP), exclusivos de BGNs. Por otro lado, NOD2 y NLRP1 reconocen el muramil dipéptido (MDP) común a BGP y BGN (Mogensen, 2009; Takeuchi and Akira, 2010) (Ver apartado siguiente y figura 2, en los cuales se muestra la estructura del PGN y los ligandos de los NOD-like receptors). La unión de los PAMPs a estos receptores desencadena una cascada de señalización mediada por el factor nuclear NF- κ B y/o el regulador transcripcional AP-1, culminando en la expresión de citoquinas inflamatorias. El receptor NLRP1, además de la secreción de citoquinas, también es capaz de inducir muerte celular programada (Cigana *et al.*, 2011).

El nivel de la respuesta inflamatoria es muy importante para poder eliminar eficazmente la infección (Mogensen, 2009; Cigana *et al.*, 2011). Cuando los niveles de PAMPs están bajo cierto umbral y localizados, las respuestas inflamatorias se producen en un nivel adecuado. Por el contrario, si estos niveles superan ciertos límites y/o se encuentran diseminados por el organismo, la respuesta inflamatoria es desmesurada y puede resultar dañina para el huésped. Este hecho se debe a que, durante la inflamación, los macrófagos y otros leucocitos masivamente reclutados liberarán especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, metalo-proteasas y serín-proteasas de la matriz extracelular y otros compuestos antimicrobianos que, al hallarse en una concentración desmesurada, provocarán daño tisular y muerte celular en el huésped. Estos eventos autolesivos, lejos de controlarla, favorecerán la diseminación de la infección y de la respuesta inflamatoria. El conjunto de todo ello, si se extiende a nivel sistémico, provocará una hipotensión, una hipoperfusión y un fallo multiorgánico en el huésped, dando lugar a lo que se conoce como shock séptico (Hollenberg, 2005; Ikegami *et al.*, 2007; Bragonzi, 2010; Cigana *et al.*, 2011; Qiu and Wong, 2012; Coldewey *et al.*, 2013; Kruger *et al.*, 2015).

A pesar de toda la información que se dispone del proceso de inflamación, gran parte de los mecanismos moleculares (tanto del huésped como de los PAMPs que desencadenan la respuesta) que participan en los procesos de shock séptico en particular, y en la patogenia inflamatoria de la infección nosocomial en general, aún no se comprenden por completo. De ello podemos deducir que en estas bases moleculares deben existir multitud de dianas inexploradas susceptibles de ser usadas para el futuro diseño de opciones terapéuticas, que ataquen no tan solo a la bacteria como patógeno, sino también a las respuestas inflamatorias descontroladas que se dan en el huésped como consecuencia de la infección. Así, en el presente trabajo, se propone que una de los elementos que podría participar de forma activa es el PGN de los BGN, por medio de la activación de la respuesta inflamatoria en el huésped, una posibilidad que ha sido clásicamente poco considerada.

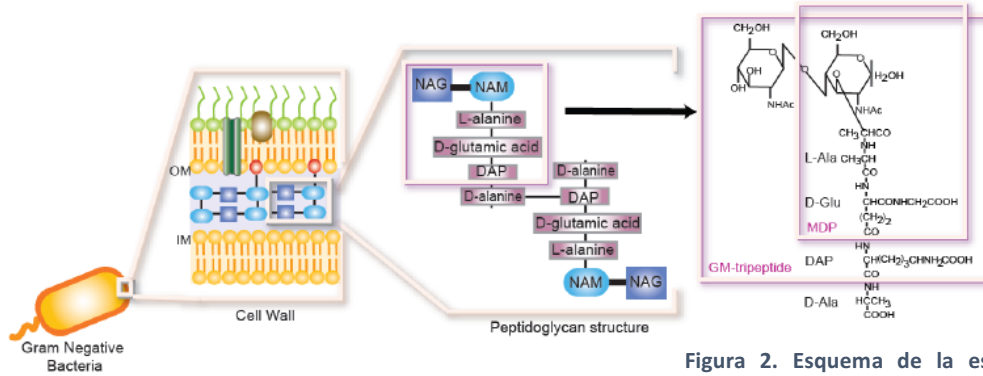
1.4. Implicación del peptidoglicano de las bacterias gramnegativas en la inflamación.

Receptores humanos para el peptidoglicano

El peptidoglicano (PGN) es un polímero formado por cadenas lineales de disacáridos (N-acetil glucosamina y N-acetilmurámico unidos mediante enlaces tipo beta), unidas entre sí (“transpeptidadas”) mediante cortas cadenas laterales peptídicas de L y D aminoácidos (ver figura 2). Este polímero, cuya función principal es dar forma y consistencia a la célula, siendo un soporte para aguantar la presión osmótica, es más grueso en las BGP constituyendo

prácticamente la mitad de su pared celular, y no estando protegido por membrana externa. En BGN, el PGN es más fino y se encuentra rodeado por el LPS y por la membrana externa. Al no encontrarse en las células eucariotas, dicho polímero supone una buena diana de reconocimiento de patógenos para el SI (Dziarski, 2004).

A



B

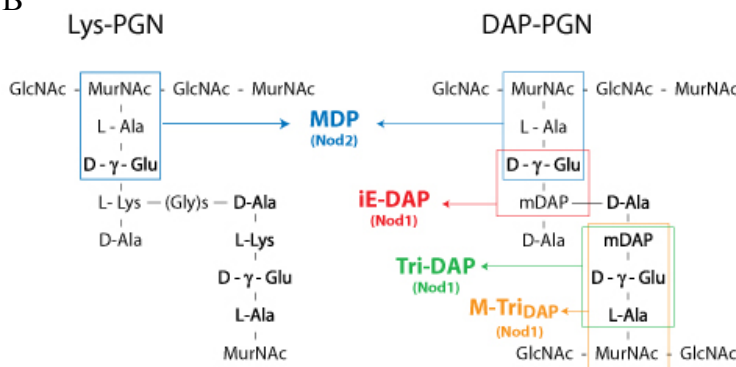


Figura 2. Esquema de la estructura del peptidoglicano (PGN) en Gram negativos.

A) Esquemización de la localización del PGN en la pared celular, por debajo de la membrana. Destacar también las cadenas de disacáridos y sus uniones entre sí que conformarán la estructura del PGN. B) Representación más detallada de los diferentes sustratos para los receptores NOD-like que hay en las cadenas de PGN (Lys-PGN se refiere al PGN de los Gram positivos, y DAP-PGN al de los Gram negativos).

El metabolismo de síntesis y reciclado del PGN de BGN es muy complejo, liberándose fragmentos durante la división y el crecimiento de la bacteria (y obviamente tras su lisis). Los fragmentos pueden ser liberados de forma libre o en forma de vesícula, rodeados de membrana externa (OMVs), siendo ambas formas detectables por el SI innato del huésped. Tradicionalmente se han considerado los fragmentos de PGN de BGN como poco importantes en cuanto al poder de activación de la respuesta inmune, lo cual es lógico, pues los BGN tienen otros PAMPs mucho más expuestos, como el LPS o bien otras proteínas de membrana externa que han centrado la atención en mayor medida. Pero en los últimos años esta visión ha ido cambiando a raíz de una serie de estudios en varios patógenos BGN, en los que se ha visto como el PGN no es meramente un soporte estructural para la célula, sino que también tiene importantes implicaciones para su virulencia (Boneca, 2005; Marc A. Boudreau, Jed. F. Fisher, 2012; Ferrand and Ferrero, 2013). Así, por ejemplo, se ha visto que en mutantes *knockout* del gen *AmpD*, imprescindible para el metabolismo de PGN de *Salmonella entérica*, se da una significativa pérdida de la virulencia. La inactivación de *AmpD*, además de reducir

la virulencia de las cepas, las hace más sensibles a la muerte post-fagocitosis al activar en mayor medida la ruta del NO₂ de los macrófagos (Folkesson *et al.*, 2005). En esta misma línea, el equipo de A. Oliver ha realizado un *knockout* de *P. aeruginosa* en AmpDh3 (homólogo de AmpD), dando también como resultado una disminución en la virulencia de las cepas (Moya *et al.*, 2008). Existen otros ejemplos que relacionan el PGN de BGN con la virulencia, esta vez más en el campo de la liberación de fragmentos presuntamente pro-inflamatorios. Así, por ejemplo en *Haemophilus influenzae* se ha comprobado que ciertas modificaciones en los fragmentos de PGN liberados inducen diferentes grados de edema cerebral en modelos animales de meningitis (Burroughs 1992, 1993). Otro ejemplo lo constituirían los fragmentos de PGN de *Helicobacter pylori*, que son enviados a las células del huésped, ya sea en forma de OMVs o a través del sistema de secreción tipo IV dependiente de *cag*, desencadenando la respuesta inmune y un exceso de inflamación dañina para los tejidos (Viala *et al.*, 2004; Noto and Jr, 2013). Existen otros trabajos en este mismo contexto, algunos de ellos conocidos desde hace décadas, como es el caso de la citotoxina traqueal (TCT) de *Bordetella pertussis*: muropéptido derivado del PGN que causa daño en los epitelios respiratorios a través de la respuesta inflamatoria mediada por la masiva secreción de interleuquinas por parte del huésped (Heiss *et al.*, 1993). Similares características han sido descritas para determinados fragmentos del PGN de *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis* (Cloud-hansen *et al.*, 2008; Woodhams *et al.*, 2013). Otros trabajos destacan el papel de enzimas modificantes del PGN para el correcto ensamblaje y funcionamiento de factores de virulencia tan importantes como los sistemas de secreción de toxinas y el flagelo, de lo que naturalmente se deducirían implicaciones para la inflamación / patogenia (Scheurwater, Reid and Clarke, 2008).

Por tanto, a pesar de que la información acerca del papel del PGN de los BGN en la virulencia no es excesivamente abundante, los ejemplos aportados soportan la idea de esta estructura como potencial mediadora de respuestas por parte del huésped, potencialmente lesivas por un exceso inflamatorio. En este sentido, los receptores o PRRs humanos para el PGN, como se ha comentado brevemente en los apartados anteriores, son: NOD1, NOD2 y NLRP1. Estos receptores detectan productos degradados del PGN, por lo que es necesaria una degradación previa para poder ser detectado (Boneca, 2005). El reconocimiento del PGN desencadenará una respuesta inflamatoria, activada a través de la caspasa-1, que permitirá la secreción de citoquinas inflamatorias como: IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α . Variaciones en la composición de los fragmentos de PGN mediarán los niveles de activación de los receptores tipo NOD, dando

por ello diferentes niveles de inflamación. Esto último se ha propuesto como una estrategia de evasión del SI por parte de *P. aeruginosa* durante su colonización del tracto respiratorio en pacientes con FQ. Este hecho permitiría a la bacteria pasar más inadvertida, pues sería menos detectada por el SI y por ello se favorecería su persistencia en el huésped (Travassos *et al.*, 2005; Bragonzi *et al.*, 2009; Lore *et al.*, 2009; Bianconi *et al.*, 2011, Cigana *et al.*, 2009). Para el receptor NLRP1 se tiene poca información. Aun sí, se debe destacar su capacidad de inducir la muerte celular programada (una variedad concreta denominada piroptosis, y mediada por una estructura supramolecular llamada inflamasoma) a parte de su capacidad para promover la expresión de citoquinas inflamatorias, todo ello presuntamente en respuesta a la unión con MDP (Reubold *et al.*, 2014).

Otros factores innatos de los que disponemos, y que pueden interaccionar con el PGN de los BGN, son las *Peptidoglycan Recognition Proteins* (PGRPs) y la lisozima. Estas proteínas reconocen al PGN pero no son receptores en sentido estricto, sino que son proteínas supuestamente bactericidas, a través de diferentes mecanismos. Así, la lisozima es bactericida gracias a su actividad enzimática que corta el PGN entre los residuos de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico. En el caso de las PGRPs, existen cuatro tipos en el cuerpo humano, con diferentes localizaciones cada una. La PGRP1 se encuentra en los gránulos de los neutrófilos; mientras que la 3 y la 4 se encuentran en las mucosas bucal, digestiva, en la piel y en los ojos. Estas últimas, pueden ver inducida su expresión por medio de determinados PAMPs (Dziarski, 2004). Las PGRP1, 3 y 4 se han descrito como bactericidas gracias a un complejo mecanismo de inducción de múltiples tipos estrés en la bacteria. Sin embargo, aunque *in vitro* estas proteínas son capaces de unirse al PGN, no parece que su mecanismo bactericida se base en una acción directa sobre el mismo, y aunque se conoce la inducción del citado estrés, no está clara la base molecular del mismo (Kashyap *et al.*, 2014).

La PGRP2 se produce en el hígado, desde donde es vertida en la sangre, llegando a concentraciones séricas de alrededor de 50 ng/mL en condiciones normales. También se ha descrito que su expresión es inducible en otros tejidos, como ocurre en keratinocitos o mucosa bucal (Li *et al.*, 2006; Scholz *et al.*, 2018). A diferencia de las demás, esta última PGRP no presenta una función bactericida unánimemente aceptada, sino una función enzimática amidasa (que rompería los enlaces entre el N-acetil murámico y el péptido lateral), con la supuesta finalidad de degradar los fragmentos de PGN libres para disminuir su capacidad de inflamación (Boneca, 2009; Saha *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2017). No obstante, hoy se tienen más datos, algunos de ellos contradictorios, que nos dan pistas acerca de una posible actividad

reguladora, por parte de PGRP2, sobre la inflamación en respuesta a la presencia de PGN de BGN, como se verá en el siguiente apartado.

1.5. Función de la *Peptidoglycan Recognition Protein 2 (PGRP2)* en la regulación de la inflamación

El papel de los receptores de NOD1, NOD2 y NLRP1 durante las infecciones es bastante conocido, y como se ha visto en los apartados anteriores, se podría resumir en la inducción de la producción de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a la presencia de PGN. En cambio, la función de PGRP2 en la respuesta del SI innato frente a la detección del PGN de BGN aún está poco definida. De hecho, existen pocos trabajos que hayan estudiado el papel de esta proteína, y además arrojan resultados contradictorios. Así, hay estudios que proponen a PGRP2 como protectora ante determinadas infecciones o modelos de inflamación, como por ejemplo en un modelo de colitis causada por *Salmonella entérica* serovar Typhimurium en ratón (Lee et al, 2012). En este estudio, se vio como ratones KO en PGRP2 mostraban un incremento en los niveles de inflamación causada por la infección, y una peor resolución de la misma, de manera independiente a NOD1/NOD2.

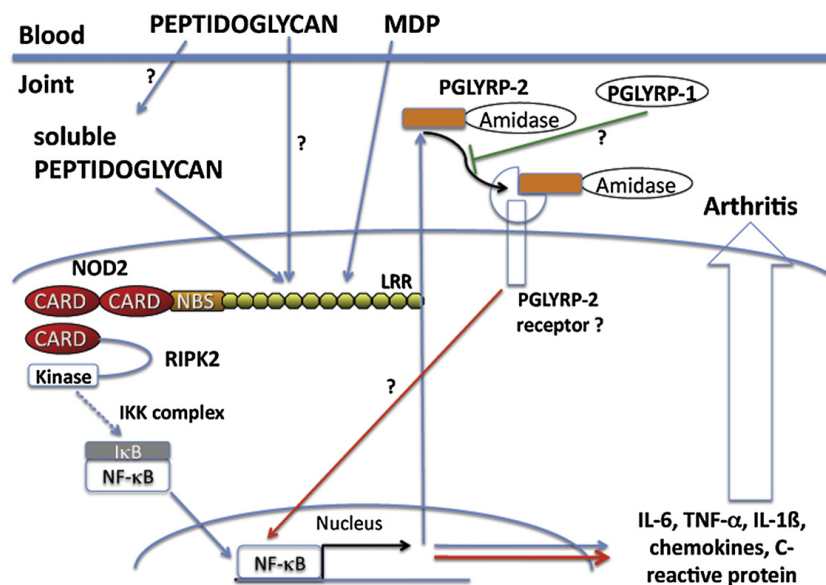


Figura 3. Esquema del papel de PGRP2 en la inducción de artritis. El PGN inyectado es capaz de inducir artritis gracias a la acción de NOD2 (flechas azules); La unión de NOD2 a su ligando, además de activar la expresión de citoquinas inflamatorias, a su vez parece activar la expresión de PGRP2, también imprescindible para la inducción de artritis. El papel de PGRP2 parece ser el de amplificar la respuesta inflamatoria, promoviendo aún más la secreción de citoquinas (flechas rojas). Se ha postulado que la propia PGRP2 podría tener un receptor específico (aún no identificado), y que la unión de PGRP2 con él (independientemente de la actividad amidasa de la proteína) a partir de ciertos umbrales de concentración, daría lugar a una cascada de señales que acabaría por amplificar la expresión de citoquinas pro inflamatorias. Por otro lado, se ha visto que para *Drosophila*, PGRP1 parece actuar como un inhibidor de PGRP2, pero aún no se conocen todos los detalles (Boneca, 2009).

En un sentido parecido, se ha visto que PGRP2 protege al ratón de una inflamación “psoriasis-like” cutánea inducida por determinados agentes químicos, pues la delección del gen incrementó la gravedad de la inflamación y el infiltrado de keratinocitos (Lee et al, 2011).

En sentido opuesto, en un modelo murino de queratitis causada por *P. aeruginosa* (Gowda et al, 2015), los resultados fueron contrarios, pues la delección del gen en los ratones, redujo los niveles de inflamación, lo cual se tradujo en una mejor resolución de la infección. En este mismo sentido, en el trabajo de Saha et al (2009), se demostró que la delección de PGRP2 imposibilitaba el desarrollo de inflamación y de artritis inducida por inoculación de PGN purificado en ratón, de lo cual se podría deducir algún tipo de actividad promotora de la inflamación por parte de PGRP2, en respuesta a la detección del PGN. En el análisis de estos resultados llevado a cabo por Boneca (2009), se apuesta por una potencial capacidad de PGRP2 de llevar a cabo una función “citokina-like”, independiente de su actividad amidasa, que acabaría por amplificar la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, sumándose a la propia inducción causada por la detección directa de PGN por parte de los receptores NOD. No obstante, las bases moleculares de este modelo, ilustrado en la figura 3, no han sido desentrañadas por el momento, si bien es cierto que se considera aceptado que el papel “citokina-like” de PGRP2 necesitaría de una estimulación previa de NOD2 para desencadenarse. Esta activación previa de NOD2 por medio de su ligando, a su vez, sería responsable de inducir la expresión de citoquinas inflamatorias, y de la propia PGRP2 (Saha 2009, Boneca 2009).

Como se ha mencionado anteriormente, en el pasado se había propuesto que PGRP2, gracias a su actividad amidasa, se encargaría de degradar fragmentos de PGN libres, para hacerlos menos inflamatorios. Pero hoy se sabe que la actividad amidasa de PGRP2 le permite actuar sobre las unidades de GM-TriDap como la estructura más sencilla que puede reconocer. Así pues, sería incapaz de actuar sobre el MDP por ejemplo (Boneca 2009). Ello implica que, a pesar de liberar tripéptidos rompiendo su enlace con el N-acetilmurámico (a partir del GM-TriDap o en fragmentos de PGN de superior tamaño), estos tripéptidos seguirían siendo potentes activadores de NOD-1 (y de la consiguiente respuesta inflamatoria), lo cual, unido a que el MDP seguiría intacto como ligando de NOD-2. Esto parece descartar la actividad amidasa de PGRP2 como reguladora de la inflamación, señalándola más bien como sólo bactericida (Girardin *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Boneca, 2009; Bobrovsky *et al.*, 2016). Así pues, la presunta actividad de PGRP2 como reguladora de la inflamación, parecería ser independiente de su actividad enzimática amidasa. Por último, aún en relación con el

controvertido papel de PGRP2, han aparecido algunos trabajos que la relacionan con enfermedades inflamatorias/no inflamatorias de carácter crónico y de origen presuntamente no infeccioso, lo cual añade más interés al estudio de esta proteína (Zulfiqar *et al.*, 2013; Goldman *et al.*, 2014).

De lo expuesto hasta ahora, podemos sacar en claro que existe poca información, y además contradictoria, acerca del papel de PGRP2, pero sí que se puede intuir un papel regulador de la inflamación ante la presencia del PGN. Parece plausible por tanto que, en un sentido u otro, la acción de PGRP2 pueda cambiar la respuesta inflamatoria (aumentándola o disminuyéndola), de lo cual podríamos sacar provecho para minimizar las consecuencias negativas (mediadas por el PGN en concreto, y por la inflamación auto-lesiva derivada de su detección) de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* (que en este trabajo tomaremos como modelo), y por otros gramnegativos de interés nosocomial.

1.6. Hipótesis y objetivos del trabajo

Como se ha expuesto a lo largo de la introducción, debido al problema que suponen las infecciones agudas nosocomiales por BGN y en especial por *P. aeruginosa*, (incluyendo por supuesto el shock séptico), y los escasos tratamientos actuales, hay una urgente necesidad de descubrir dianas para poder tratarlas, por ejemplo mediante el bloqueo de la respuesta inflamatoria incontrolada implicada en estas infecciones. El PGN de BGN ha sido clásicamente considerado poco importante en el proceso de interacción con los receptores del huésped, y por tanto en la inflamación y patogenia, pero la información de estos últimos años parece invalidar cada vez más esta visión. Por ello, se propone en este trabajo a PGRP2 como una posible diana para inhibir la respuesta inflamatoria derivada del PGN de BGN, más en concreto usando como microorganismo modelo a *P. aeruginosa*. Con este objetivo, se hipotetiza que la ausencia de dicha proteína debería resultar en una disminución de la inflamación mediada por la presencia de PGN y con ello, deberían mejorar las consecuencias clínicas en el huésped de la infección.

Para ello, se ha silenciado la expresión de la proteína PGRP2 en células hepáticas HepG2, para posteriormente infectarlas con *P. aeruginosa*. Este patógeno sería el responsable (en concreto mediante su PGN) de inducir una respuesta inflamatoria que se hipotetiza que sería menor en las células sin PGRP2. Para completar los resultados de este ensayo, se realizaron una serie de pruebas en células no hepáticas (A549) a las que se les adicionó la proteína PGRP2 y se las infectó con *P. aeruginosa*. Este último ensayo fue realizado para descartar la

posibilidad de que el silenciamiento de PGRP2 no fuera correcto y/o insuficiente para poder evaluar una potencial disminución en el nivel de inflamación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Estirpes bacterianas, cultivos celulares y oligonucleótidos

Las estirpes bacterianas y las líneas celulares utilizadas se resumen en la tabla 1, que se muestra a continuación:

Tabla 1. Lista de las estirpes bacterianas y líneas celulares utilizadas

Estirpes	Descripción	Fuente
Bacterias		
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Cepa tipo usada como referencia en multitud de trabajos	Holloway, 1955
Líneas celulares		
HepG2	Derivada de un carcinoma hepatocelular de un hombre caucásico de 15 años	Knowles, Chester and Aden, 1983
A549	Células epiteliales pulmonares procedentes de un hombre caucásico con adenocarcinoma alveolar	Giard DJ, 1973

La descripción de los oligonucleótidos utilizados en este proyecto se resume en la siguiente tabla (tabla 2):

Tabla 2. Lista de oligonucleótidos y siRNA utilizada en este trabajo. En el caso de los *small interference* RNA, se utilizó un pool de compuesto por cantidades equivalentes de los 4 oligos mostrados.

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Uso	Fuente
PGRP2 <i>forward</i>	TCCTACTCGGATTGCTACTGTG	RT-PCR comprobación silenciamiento	(Spandidos <i>et al.</i> , 2018)
PGRP2 <i>reverse</i>	AAGTGGTAGAGGCGATTGTGG		(Spandidos <i>et al.</i> , 2018)

PPIB (Cyclophilin B) <i>forward</i>	ACCTTCTGCGGCCGATGAG		(Wright <i>et al.</i> , 2018)
PPIB (Cyclophilin B) <i>reverse</i>	AGCCAAATCCTTTCTCTCCTG		(Wright <i>et al.</i> , 2018)
siRNA			
Human PGLYRP2	CCUCGACCUUUACGCUUU	Silenciamiento	General Electric-Dharmacon
	GGGCGCAGGGUCAUAAAUU		
	GGCCAUUGCUC CAGAUGUA		
	CCGACAUGACGUACGAGAA		
Human Cyclophilin B	ACAGCAAAUCCAUCGUGU		
	GAAAGAGCAUCUACGGUGA		
	GAAAGGAUUUGGCUACAAA		
	GGAAAGACUGUCCAAAA		

2.2. Preparación de los inóculos de *Pseudomonas aeruginosa*

Los cultivos de *P. aeruginosa* se llevaron a cabo en 5mL de medio LB líquido, en agitación (180 rpm) a 37°C, *overnight* (Sambrook, 1989). Para determinar el número teórico de bacterias por mL, se realizaron estimaciones mediante el espectofotómetro, usando la equivalencia teórica: Densidad Óptica a 600_{nm}=1 equivalente a 1E⁹ UFC/mL, lo cual se comprobó por plaques de diluciones seriadas y recuentos en LB agar. De esta forma se pudo ajustar el número de UFC con las que se infectó el cultivo celular, siendo deseable en este experimento una MOI (*Multiplicity Of Infection*) de aproximadamente 100 con respecto al número de células.

2.3. Cultivo celular

La línea celular HepG2 fue adquirida de *Sigma-Aldrich* y se usó entre los pases 3 y 30. Esta línea celular se cultivó rutinariamente en botellas de 175 cm², en un volumen de 40-45mL de medio D-MEM (Sigma-Aldrich), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 10 mM de HEPES y 10% de una solución antibiótico-antifúngico 1X (BioWest). El día previo a los experimentos, se sembró 1 mL de cultivo celular por pocillo, procedente de las citadas botellas (tras resuspensión mediante tripsina-EDTA 0.25%, lavados con PBS, y dilución final) en placas de 24 pocillos (depositando aproximadamente 1x10⁵ células por pocillo, salvo que se indique lo contrario), que se incubaron durante 24h a 37°C y 5% de CO₂.

La línea A549 fue adquirida de *Sigma-Aldrich* y también se usó entre los pases 3 y 30. Se repitió el mismo protocolo de pase-cultivo.

En todos los casos, además de las células invertidas en los pases a placas de 24 pocillos, siempre se reservó una proporción (entre una cuarta/octava parte de las células) para seguir el cultivo en las botellas de 175 cm². Los pases se fueron realizando cada varios días, cuando las células estaban cercanas a la confluencia. Hay que tener en cuenta que el tiempo de duplicación de las células HepG2 es de aproximadamente 48h, y 24h en el caso de las A549, lo cual obviamente marcó la frecuencia de los pases de cada línea.

2.4. Protocolo de silenciamiento con *small interfering RNA* (siRNA)

El silenciamiento de las células HepG2 (proceden de hígado, y por tanto son productoras constitutivas de PGRP2) se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante (General Electric-Dharmacon) para células en placas de 24 pocillos, tras probar diferentes condiciones para cada una de las variables [densidad de células por pocillo, concentración de siRNA, duración de la incubación con siRNA y concentración de reactivo *Dharmafect* (necesario para que el siRNA entre en las células)]. Tras incubar las células 24h en el medio DMEM antes mencionado, en las placas de 24 pocillos, se retiró dicho medio y se insertó la mezcla con siRNA, que se explica a continuación. Esta mezcla se basa en dos suspensiones: 1) Una suspensión con 2,5 µL/pocillo de mix de siRNA 5 µM con 47,5 µL/pocillo de medio RPMI (Biowest); 2) 2,5 µL/pocillo de *Dharmafect*, en suspensión con 47,5 µL/pocillo de RPMI. Para cada pocillo se añadieron 400 µL de RPMI y 50 µL de cada una de las dos mencionadas suspensiones (volumen total/pocillo 500 µL). Las concentraciones de células que se decidieron utilizar fueron aproximadamente de 1E⁵ y 3E⁴ células /pocillo. En todos los casos, la concentración final del siRNA fue de 25 nM, y el RPMI usado fue sin rojo-fenol, para evitar interferencias con ensayos posteriores.

Tras iniciar el silenciamiento se incubaron las células otras 24h a 37°C. Paralelamente a una condición con mix de siRNA de PGRP2, también se dispuso otra columna de pocillos con mix de siRNA de Ciclofilina B (pool de siRNA control positivo de silenciamiento, proporcionado por General Electric-Dharmacon), y por último otra columna de pocillos de control celular sin silenciamiento.

Es importante no utilizar un medio de suspensión (en el pase desde las botellas de 175 cm²) con ATB/ATF puesto que el *Dharmafect* permeabiliza la membrana y éstos componentes antibióticos, si entran en la célula, tienen efectos citotóxicos. Para comprobar la efectividad y

nivel de silenciamiento se realizó una RT-PCR en tiempo real con los oligonucleótidos descritos en la tabla 2.

2.5. Extracción de RNA

La cuantificación del silenciamiento se realizó a partir del RNA, para lo cual se extrajo utilizando el kit NucleoSpin RNA plus (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante, a partir de las monocapas de células (de las placas de 24 pocillos). Dicho kit posee la característica de eliminar directamente los restos de DNA, siendo por tanto innecesario el tratamiento con DNAsa. La concentración de RNA obtenida se calculó mediante el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 Spectrophometer (Thermo Scientific), ajustándose a 50 ng/μL para su uso en las RT-PCR en tiempo real.

2.6. Cuantificación de silenciamiento: RT-PCR en tiempo real

El RNA extraído se utilizó para realizar una RT-PCR en tiempo real (*Real time Reverse Transcription-PCR*), para la que se utilizaron los oligonucleótidos definidos en la tabla 2, y el kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR (Qiagen). La master mix de la PCR contendría, para cada muestra, 0,4 μL de cada oligonucleótido (de concentración 10 μM), 0,1 μL de la retrorntanscriptasa *Quantiteq RT mix*, 3,1 μL de agua sin RNAasas y 5 μL de 2X RT-PCR master mix. Se realizaron dos master mix, con dos pares de *primers* diferentes: una con la pareja del gen PGRP2 y otra con la del gen ciclofilina B. En la placa de RT-PCR se mezcló 1 μL de RNA de muestra con 9 μL de máster mix. El Eco Real-Time PCR System (*Illumina*) fue el equipo utilizado para realizar la RT-PCR. Rutinariamente se añadieron pocillos de control negativo, sin material genético para comprobar que los reactivos no presentan contaminación alguna; así como también un control con RNA, pero sin retrotranscriptasa, para comprobar que las muestras están libres de contaminación por DNA no deseado.

Los resultados obtenidos sirvieron para la cuantificación del silenciamiento atendiendo a la fórmula 1, descrita a continuación:

$$\Delta CT = \text{Media ciclos PCR pocillos sin siRNA gen interés} - \left[\text{Media ciclos PCR pocillos con siRNA gen interés} + \left(\text{Media ciclos PCR con gen control de pocillos sin siRNA gen interés} - \text{Media ciclos PCR gen control pocillos con siRNA gen interés} \right) \right] \quad (1)$$

CT = Cycle Threshold. Corresponde al umbral de ciclos a partir del cual el equipo de RT-PCR detecta fluorescencia del SYBR Green al ser incorporado a los amplicones.

El silenciamiento será calculado aplicando el resultado obtenido a la formula 2:

$$\% \text{ Silenciamiento} = 2^{\Delta CT} \quad (2)$$

Para facilitar los cálculos y el trabajo de laboratorio se consideró como gen *house keeping* el no silenciado en cada caso; es decir, para el cálculo del silenciamiento de PGRP2 el gen *house keeping* fue ciclofilina B, y viceversa.

De manera general, para cada muestra se repitió la real-time RT-PCR dos veces.

2.7. Protocolo de infección

Tras 24 h de incubación de los cultivos celulares se pasó a su infección con la cepa de *P. aeruginosa* PAO1. Para ello se deseaba una multiplicidad de infección (MOI) de 100 respecto a las células, teniendo en cuenta que aproximadamente en cada pocillo había 1×10^5 células (por tanto, se infectó con 1×10^7 UFC/pocillo).

En el caso de las células HepG2, se infectó tras 24h de silenciamiento, añadiendo 1×10^7 UFCs/pocillo (directamente al medio RPMI antes descrito para el silenciamiento) e incubando 3h a 37°C. Tras la infección se midió el silenciamiento, tal y como se ha explicado en el apartado anterior; es decir, se procedió a reservar los sobrenadantes de infección por un lado a -80°C para realizar posteriormente los ensayos de citotoxicidad y ELISA, mientras que la monocapa de células de cada pocillo fue utilizada para extraer el mRNA para posteriores RT-PCR en tiempo real.

Para A549, el día siguiente al pase de las células desde botella a la placa de 24 pocillos (1×10^5 células/pocillo), al ser no productoras de PGRP2 se diseñó un protocolo diferente con cuatro condiciones (como paso previo a la infección se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado con 1 mL de PBS/pocillo, que también fue retirado): a) una condición control con 0,5 mL de RPMI (sin suero fetal ni rojo fenol, para evitar interferencias con experimentos posteriores) por pocillo; b) una condición de adición de PGRP2, añadiendo 0,5 mL de una suspensión del citado RPMI con la proteína PGRP2 (AVIVA Systems Bio) en concentración fisiológica (50 ng/mL); c) una condición de control de infección, añadiendo 0,5 mL de una suspensión de RPMI con 1×10^7 UFCs de la cepa PAO1 aproximadamente; d) condición de estudio de la relación entre la infección y la proteína PGRP2, añadiendo 0,5 mL de una suspensión con RPMI, PAO1 y PGRP2 (en las mismas concentraciones recién indicadas). Se dejaron incubar las placas 3h a 37°C.

Tras la incubación, se recogieron los sobrenadantes y se congelaron (-80°C) hasta realizar los ensayos de citotoxicidad y liberación de IL-8. Es importante denotar que el medio RPMI fue

elegido porque otros, como el D-MEM, en ocasiones se han descrito como causantes de interferencias con los ensayos a realizar a posteriori.

Además, antes de iniciar cualquiera de los ensayos con el sobrenadante, se centrifugaron en tubos de 1,5 mL (13000 g durante 5 min) para que las bacterias y/o restos celulares que se podrían haber aspirado precipitasen y no interfiriesen con los ensayos posteriores.

De manera general para todos los experimentos, se infectaron al menos 3 pocillos por condición, en cada una de tres placas trabajadas en 3 días independientes.

2.8. Ensayo de citotoxicidad

Tras infectar las células con el patógeno, la cepa PAO1 de *P. aeruginosa*, se utilizó parte del sobrenadante para medir su efecto citotóxico. El objetivo de esta prueba era comprobar si los resultados en la expresión de la proteína PGRP2 (obtenidos por RT-PCR) y/o liberación de IL-8 eran a consecuencia del silenciamiento realmente, o debido a la muerte celular causada por la infección, o incluso por los efectos potencialmente nocivos del Dharmafect y/o de los siRNA. También se pretendió descartar, mediante este ensayo, que la PGRP2 adicionada al cultivo A549 pudiese ser nociva para las células.

Para medir la citotoxicidad del sobrenadante, se mide la liberación de la enzima LDH citosólica, como consecuencia de la lisis celular. La LDH liberada se cuantificó por medio del *Cytotoxicity Detection Kit PLUS* (Roche), basado en un ensayo colorimétrico y siguiendo las indicaciones del fabricante.

El nivel de citotoxicidad se determinó como porcentaje respecto de la referencia de lisis total: pocillos a los que se les había aplicado un tratamiento con 1 μ L de Tritón X-100 durante 10 minutos. Tomando este valor como 100%, se aplicó un regla de tres para conocer el nivel de lisis (citotoxicidad) en cada condición.

2.9. Ensayo de respuesta inflamatoria (ELISA IL-8)

La respuesta inflamatoria provocada por *P. aeruginosa* PAO1 sobre los cultivos celulares, tanto HepG2 como A549, se basó en la medición de la secreción de la interleuquina 8 (IL-8) como marcador. Tras infectar las células con el patógeno, y pasadas las 3 horas, se tomó el sobrenadante para medir la concentración de IL-8 utilizando el *Human IL-8/NAP-1 Instant ELISA kit* (eBioscience-Affymetrix), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el caso de las células HepG2 se realizó una dilución del sobrenadante 1:3, mientras que para las células A549 se diluyó a la mitad, para obtener resultados dentro del rango de concentraciones medible por el kit. Como control se utilizaron células sin infectar. Cabe decir que cada

muestra se cargó por duplicado en dos pocillos diferentes del ELISA, siguiendo la recomendación del fabricante, calculándose la media de los dos pocillos como valor final.

2.10. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico y la representación gráfica se utilizó el software *GraphPad Prism* 5. Los datos obtenidos en los ensayos descritos anteriormente se representaron en forma de media con su valor de desviación estándar (SD). Asumida la distribución normal de los resultados, se realizó un test T student para encontrar diferencias significativas. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Cultivo celular HepG2

3.1.1. Nivel de silenciamiento

Una vez realizado el silenciamiento, la extracción de RNA y las RT-PCRs con las dos parejas de oligonucleótidos se procedió al cálculo del porcentaje de silenciamiento, para lo cual se aplicaron conjuntamente las fórmulas 1 y 2. Cada experimento se realizó paralelamente con dos concentraciones de células ($1E^5$ y $3E^4$ células/pocillo) y se repitió tres veces. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3, representada a continuación:

Tabla 3. Representación del porcentaje medio de expresión del gen silenciado (siempre respecto de las muestras procedentes de pocillos con expresión wildtype, es decir, sin siRNA) para cada concentración de células y cada siRNA adicionado.

siRNA	% expresión gen silenciado	
	Alta concentración celular	Baja concentración celular
<i>PGRP2</i>	0,6	0,605
<i>Ciclofilina B</i>	0,61	0,413333333

Tanto el control celular sin silenciar, como el control de RT-PCR sin material genómico dieron resultados coherentes, dando por validos dichos resultados (datos no mostrados).

Como se puede observar en la tabla, los resultados obtenidos no son muy alentadores, pues se obtuvo mayor porcentaje de silenciamiento a alta concentración celular para el silenciamiento con siRNA de PGRP2. Sin embargo, para el silenciamiento con siRNA con ciclofilina B, se obtuvo mayor porcentaje de silenciamiento a baja concentración celular. Por ello, no se pudo concluir cuál de las dos concentraciones parece ser la más adecuada para el silenciamiento de este cultivo celular. Además, los valores de silenciamiento fueron bastante pobres, pues el fabricante recomendaba tomar como aceptables aquellos silenciamientos en los que el pool de

siRNA control positivo (Ciclofilina B) silenciase como mínimo el 80% de la expresión salvaje del gen, valor al que en ningún caso se llegó en nuestros ensayos.

3.1.2. Nivel de citotoxicidad celular tras el silenciamiento

Con el objetivo de asegurar la viabilidad de las células tras el silenciamiento, es decir, asegurar que el siRNA y/o el Dharmafect no eran tóxicos para las células, se realizaron ensayos de LDH. Tal y como se explica en apartados anteriores, las absorbancias obtenidas tras el ensayo se aplicaron tal y como se explica en el apartado 2.8. El ensayo se repitió tres veces. Recordar que tendríamos cuatro condiciones de resultados, atendiendo por una parte al tipo de siRNA que se les ha adicionado y a la presencia o ausencia de infección por parte de *P. aeruginosa* PAO1. La media de los resultados obtenidos se representa en el gráfico a continuación (figura 4).

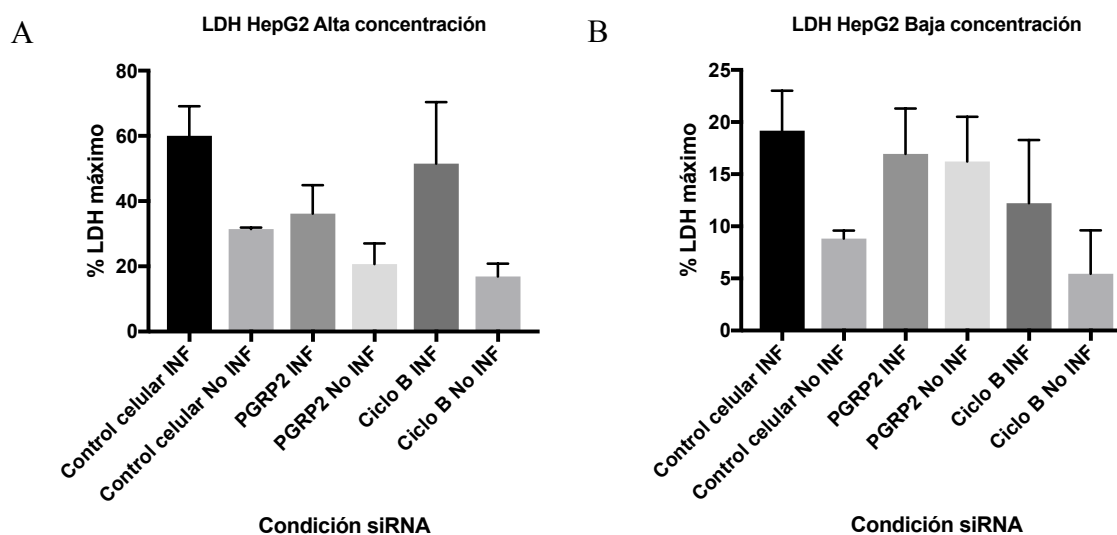


Figura 4. Representación gráfica del ensayo LDH para las células HepG2. Este experimento fue repetido tres veces independientes (con al menos tres pocillos en cada repetición) y los resultados que se muestran en el gráfico corresponden a la media y la desviación estándar del ensayo para cada condición. Estas condiciones se refieren a células silenciadas con siRNA de PGRP2 o con siRNA de Ciclofilina B, y en ambos casos hay dos grupos: infectadas con PAO1 o no. A) Alta concentración de células HepG2 y B) Baja concentración celular. Las células fueron incubadas 24h previas al silenciamiento, seguidas de 24h de silenciamiento y 3 h de infección con PAO1 con una MOI de 100. Tras la infección se retiraron los sobrenadantes y se congelaron a -80°C para su posterior uso en este y otros ensayos. La concentración final de siRNA utilizada fue de 25 nM.

Como es obvio y como se puede apreciar en la figura 4, los resultados indican que a mayor densidad de células, mayor liberación de LDH se produce, de manera genérica. Por otro lado, también de manera genérica y como era de esperar, las células infectadas presentaron un nivel de lisis mayor que las células no infectadas. Aunque aparecieron diferencias en cuanto a la citotoxicidad causada por un siRNA u otro sobre el cultivo celular, parecen ser causa de la propia variabilidad experimental.

3.1.3. Nivel de inflamación celular tras el silenciamiento

Tras el silenciamiento y la infección se realizó un ensayo ELISA, con el objetivo de determinar la respuesta inflamatoria tras silenciar la proteína PGRP2. De esta forma se quiso ver si la ausencia de dicha proteína permitiría disminuir la respuesta inflamatoria causada por PAO1, siendo ésta directamente proporcional a la expresión de IL-8.

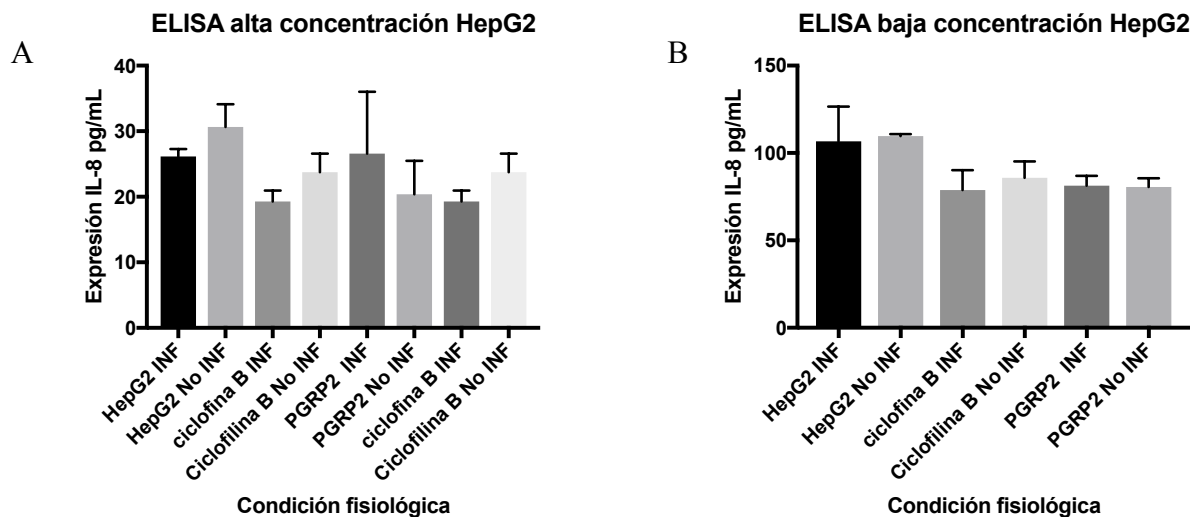


Figura 5. Representación gráfica del ensayo de respuesta inflamatoria en las células HepG2. Los resultados que se muestran corresponden a la media de los tres ensayos independientes realizados (con al menos tres pocillos por ensayo y condición), teniendo en cuenta que cada muestra se cargó y leyó por duplicado en el ELISA. A) Alta concentración celular y B) Baja concentración celular. La incubación inicial del cultivo duró 24h, tras las cuales se procedió a un silenciamiento de 24h con una concentración de siRNA de 25 nM. Tras el silenciamiento se infectaron las células con PAO1 con una MOI de 100. Tres horas después de la infección se extrajeron los sobrenadantes y se congelaron a -80°C . El ensayo de ELISA se realizó con una dilución 1/3 de los sobrenadantes guardados.

Como se puede observar en la figura 5, los resultados obtenidos no fueron los esperados. En el gráfico de baja densidad celular (B), no se observa gran diferencia entre las células infectadas y las no infectadas por PAO1. Lo único destacable en este gráfico sería la ligera disminución de la respuesta inflamatoria, tanto en ausencia de PGRP2 como de ciclofilina B. En el gráfico A, sí que se observa una coherencia entre adición o no de la cepa PAO1, correspondiendo sin embargo a lo contrario a lo esperable, pues las células no infectadas mostraron una mayor expresión de IL-8, quizás debida a un mayor número de células viables, en comparación con los pocillos infectados..

3.2. Cultivo celular A549

3.2.1. Nivel de citotoxicidad celular tras adicionar PGRP2

Al igual que el cultivo de HepG2, se realizó un ensayo LDH para determinar, en este caso, si la adición de la proteína PGRP2 era tóxica para el cultivo celular o no. Tras calcular el porcentaje de LDH como se describe en el apartado 2.8, se pudo generar un nuevo gráfico (figura 6).

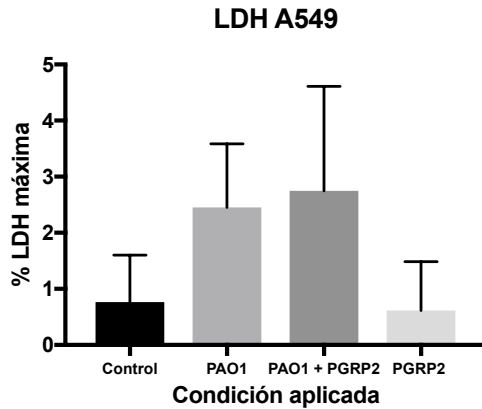


Figura 6. Representación gráfica del ensayo de LDH para el cultivo celular A549. Se puede apreciar que la adición de la proteína PGRP2 no es tóxica para el cultivo. Se utilizó una concentración de PGRP2 de 50 ng/mL. La incubación inicial duró 24h tras las cuales se aplicaron las diferentes condiciones. La infección fue realizada con PAO1 durante 3h con una MOI 100 ($1E^7$ células/pocillo).

Tal y como vemos en la figura 6, se puede deducir que la adición de la proteína PGRP2 no es tóxica para el cultivo de A549. Los resultados para las condiciones donde se añade la cepa patógena PAO1 son similares para la presencia o no de PGRP2, por lo que se sugiere que esta proteína no interferiría en la muerte celular causada por PAO1. Por otro lado, también es destacable el bajo nivel de muerte celular causado en general, al infectar A549 con PAO1; nótese que en ningún caso se llegó a un 5% de la LDH máxima, lo cual contrasta con los valores basales de liberación de LDH de las células hepáticas, mucho más elevados, sobre

todo después de la infección con PAO1 en HepG2 (ver apartados anteriores).

3.2.2. Nivel de inflamación celular tras adicionar PGRP2

El ensayo de citotoxicidad se complementó con un ensayo ELISA para medir la respuesta inflamatoria asociada a la adición de la proteína PGRP2. De esta forma se midió la expresión de IL-8 tras la adición de PGRP2, esperando que la ausencia de esta proteína favoreciera de alguna forma la disminución de la respuesta inflamatoria.

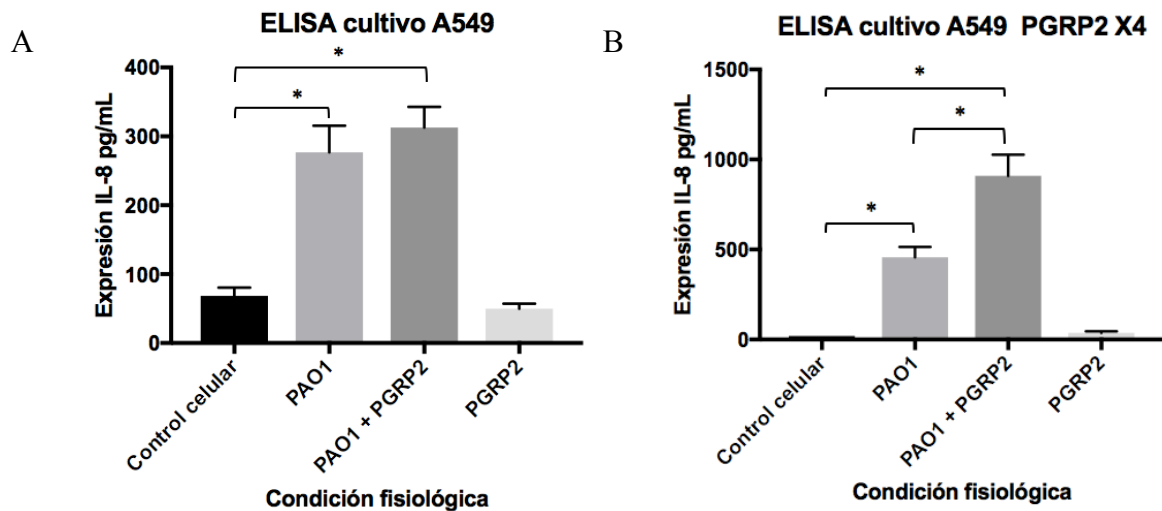


Figura 7. Representación gráfica del ensayo de respuesta inflamatoria en las células A549. Los resultados que se muestran corresponden a la media de tres ensayos realizados en días diferentes. Recordar que para cada muestra se realiza el ensayo duplicado y que en cada ensayo hay más de una muestra bajo la misma condición. A) Ensayo realizado con la concentración fisiológica de PGRP2 (25 nM) y B) Ensayo con cuatro veces la concentración fisiológica de PGRP2. La incubación duró 24h, tras las cuales se infectaron las células correspondientes y/o se adició la concentración de PGRP2 correspondiente. La infección duró 3h y se realizó con una MOI de 100 ($1E^7$ células/pocillo).

El resultado del ensayo de ELISA se muestra en la figura 7. Como se puede comprobar los resultados obtenidos no dan soporte a nuestra hipótesis sobre la función de PGRP2 en la regulación de la respuesta inflamatoria. Esto se debe a que apenas se aprecia diferencia entre la condición de PAO1 con o sin PGRP2 (figura 7.A).

Para complementar los ensayos realizados, se decidió repetir los experimentos pero cuadruplicando la concentración de PGRP2 adicionada (recordar que ésta era la concentración fisiológica en suero). Como se aprecia en la figura 7.B, los resultados parecen sugerir que con una concentración más alta de PGRP2 se duplica prácticamente la respuesta inflamatoria. Así, se sugiere que PGRP2 en concentración más alta a la que se halla normalmente en el suero sí que tiene un papel en el aumento de la respuesta inflamatoria. Se debe destacar que este último ensayo solo se repitió dos veces, por lo que antes de sacar conclusiones concluyentes se deberían realizar más repeticiones.

4. DISCUSIÓN

El proyecto actual presenta dos partes diferenciadas por el cultivo celular utilizado y el protocolo seguido, siguiendo a pesar de ello, el mismo objetivo: determinar el papel de PGRP2 en la respuesta inflamatoria. En la primera parte del proyecto se utilizaron células productoras de PGRP2 de forma constitutiva, las células hepáticas HepG2. A estas células se aplicó un protocolo de silenciamiento, seguido de una infección por *P. aeruginosa* PAO1. Por otra parte, también se realizaron experimentos sobre células no productoras de PGRP2, células A549, a las que se les adicionó la proteína purificada y/o infectó con PAO1. En ambos casos el fin fue medir el nivel de expresión de IL-8, directamente proporcional a los niveles de respuesta inflamatoria.

Cultivo celular HepG2

En primer lugar, destacar la baja inflamación obtenida tras la infección del cultivo HepG2 (ver figura 5) si comparamos los pocillos que han estado infectados y los que no. Este hecho puede deberse a un periodo de infección con PAO1 demasiado corto para este tipo de cultivo celular. Para dicho cultivo y análisis de liberación de IL-8 no se ha establecido ningún protocolo típico a seguir a la hora de infectar, sino que en la bibliografía se observa un amplio rango de tiempos de incubación atendiendo al patógeno utilizado. Por ejemplo, en la infección con patógenos víricos, algunos autores, como Medin o Delpino, aplicaron un tiempo mínimo de incubación de 2 horas, observándose la mayor diferencia de secreción de IL_8 entre cultivos infectados o no, a las 48 horas (Medin and Rothman, 2006; Delpino *et al.*, 2010). En

el caso de infecciones con agentes patogénicos de origen bacteriano el tiempo de incubación es muy disperso. Para las infecciones realizadas con LPS puro se han utilizado tiempos de incubación largos de 12 a 24h. Destacar también que los niveles de inflamación van a depender de la concentración de patógeno que se adiciona; como cabe esperar, a mayor concentración menor tiempo de incubación. En este último caso, Gómez-Quiroz redujo el tiempo de incubación del cultivo HepG2 con LPS diez veces concentrado a tan solo 4h. Cabe señalar que en este último experimento el objetivo era cuantificar el RNAm, pudiendo ser una de las razones por las que se redujo el tiempo de infección (Gómez-Quiroz *et al.*, 2003; Liu, Liang and Li, 2010; Xu *et al.*, 2015). Centrándonos en patógenos bacterianos más similares a PAO1, se deben destacar los trabajos realizados por McCord y Gupta, utilizando *Bordetella* y *E. coli*, respectivamente. En la infección de los cultivos celulares HepG2 con *Bordetella* el período de incubación aplicado fue de treinta minutos, más una hora de espera antes de realizar el ensayo de ELISA. En cambio, para la infección con *E. coli* se aplicó un periodo de incubación de 4h, obteniendo unos valores de infección más coherentes: las células infectadas cuadruplicaban los valores de IL-8 obtenidos en el control no infectado (McCord, Resto-ruiz and Anderson, 2006; Gupta *et al.*, 2016). A partir de esta bibliografía, y especialmente centrándonos en los protocolos ya descritos donde se utilizaba un patógeno similar a la PAO1, se decidió aplicar un tiempo de incubación de 3h. A pesar de que teníamos soporte bibliográfico para que esta incubación fuese fructífera, los resultados obtenidos sugieren que el tiempo de incubación debería haber sido mayor. La escasa diferencia entre los pocillos infectados de los que no lo estaban, no permite concluir ninguna hipótesis sobre el efecto del silenciamiento sobre la respuesta inflamatoria. Por todo, remarcar que en un futuro se deberían de repetir los ensayos realizados aumentando el tiempo de infección para poder obtener resultados más concluyentes.

Otro aspecto a discutir en esta línea experimental es el bajo nivel de silenciamiento obtenido, pues no se ha podido llegar ni a un 50% de silenciamiento. Los bajos niveles de silenciamiento se obtuvieron no solo para PGRP2, sino también para el control con Ciclofilina B, sugiriendo que el problema se debe al tipo de células utilizadas. El cultivo de las células HepG2 no es sencillo, puesto que son células que requieren un tratamiento muy delicado, formándose aglomeraciones con facilidad (<http://www.hepg2.com/hepg2-cell-transfection/>). Estas aglomeraciones celulares dificultan el crecimiento en monocapa, dificultando por ello la transfección y la entrada de siRNA. Las células aglomeradas podrían actuar como barrera

protectora para la porción de células que se encuentren en las capas más inferiores, siendo por ello otro factor desfavorable para la infección.

Por ello, los experimentos con HepG2 parecen francamente mejorables en el futuro, primero, en el aspecto del silenciamiento (habrían de conseguirse porcentajes de silenciamiento del 80% como mínimo, presumiblemente mejorando la técnica de manejo de estas células, intentando evitar al máximo la formación de aglomeraciones). Además, dado el relativamente elevado nivel de citotoxicidad basal en los cultivos HepG2, se puede presumir que su manejo no fue del todo correcto, lo cual también explicaría los malos rendimientos de silenciamiento. Así, el mejor manejo del cultivo de HepG2 debería mejorar el crecimiento en monocapa, viabilidad celular y nivel de silenciamiento. En segundo lugar, deberán mejorarse los protocolos en el aspecto del tiempo de estimulación con PAO1; en este último caso, se deberá hallar un tiempo de infección tal que permita diferenciar los pocillos infectados de los no infectados, claramente (cosa que sí se ha conseguido con las células A549), en cuanto a la liberación de IL-8.

Cultivo celular A549

Los resultados obtenidos para el cultivo celular A549 sí parecen ser más interesantes, aunque serían necesarias más réplicas para poder obtener conclusiones más firmes. Por ello se debe destacar que en un futuro se deberán realizar más réplicas experimentales con la finalidad de refutar o confirmar las conclusiones que sugieren estos resultados.

Los resultados obtenidos donde se aplicó la concentración fisiológica de PGRP2 no parecen ser muy concluyentes. Se debe señalar que la concentración fisiológica para dicha proteína fue obtenida a partir de la medición sanguínea de los niveles de PGRP2 en varios sujetos [utilizando el ELISA Kit for Peptidoglycan Recognition Protein 2 (PGLYRP2) (Wuhan USCN-Cloud-Clone Corp)]. La concentración media obtenida rondaba los 40-50ng/mL (datos no mostrados) por lo que se optó por utilizar una concentración de 50 ng/mL. Cabe decir que en la bibliografía no hemos hallado datos acerca de la concentración sérica habitual de esta proteína. A pesar de ello, y de que esta concentración asumida sí se podría dar por correcta, siempre correspondería a la concentración de PGRP2 en el suero sanguíneo. Es decir, la concentración aplicada no correspondería a la concentración real de las células hepáticas o de los tejidos, sino de la secreción constitutiva de dichas células al torrente sanguíneo. Además, la expresión de PGRP2 se ha demostrado que puede ser inducible (por la presencia del microbio) en determinados tejidos como en los queratinocitos, el epitelio de la córnea, el oral... Sugiriendo que en estos tejidos, una infección localizada podría resultar en un aumento

en la concentración de esta proteína a nivel local (Wang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Hua *et al.*, 2015; Scholz *et al.*, 2018).

Por todo ello, no deberíamos estancarnos en una concentración de PGRP2 de 50 ng/mL, sino pensar también que en los tejidos infectados parece ser que la concentración aumenta. Incluso podría ser que la concentración fuese no tan solo cuatro veces mayor (como es el caso de la segunda parte de los ensayos que hemos realizado), sino muchísimo más elevada. De hecho, en algunos trabajos se ha testado el incremento en el mRNA de PGRP2 en células epiteliales tras la exposición a ciertas bacterias, y ese aumento ha sido de cientos o incluso miles de veces respecto de los cultivos no estimulados (Wang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Hua *et al.*, 2015; Scholz *et al.*, 2018).

El problema de esta hipótesis es la falta de soporte bibliográfico, en cuanto al nivel de cuantificación de la concentración de PGRP2. Es decir, se han realizado cuantificaciones de la concentración de PGRP2 en el cultivo celular inducido por la presencia de ciertas bacterias o productos microbianos, por RT-PCR o por Northern Blot, como se acaba de mencionar, pero no a través de ELISA (que es como fue realizado en este proyecto). A pesar de ello, mencionar que estos artículos respaldan el aumento en la concentración de la proteína para los tejidos infectados, tal y como se propone en este trabajo.

Así pues, nuestros resultados con la concentración de PGRP2 X4 parecen sugerir que la proteína PGRP2 promueve la inflamación en presencia de *P. aeruginosa*, llegando a duplicarla con respecto a los controles. Si estos resultados se confirmasen, reafirmarían el papel pro-inflamatorio de PGRP2 en respuesta a la presencia del PGN. De esta forma se respaldaría el papel descrito por autores como Boneca y Saha, quienes describen una función promotora de la inflamación para la proteína (figura 3), esencialmente ante la presencia de PGN o fragmentos de éste (Boneca, 2009; Saha *et al.*, 2009). Aun así, hay autores que contradicen los resultados obtenidos, sugiriendo que PGRP2 actuaría como proteína protectora y anti-inflamatoria. Los estudios realizados por Joouen Lee en ratones infectados por *Salmonella entérica* serovar *Typhimurium*, parecen demostrar que PGRP2 no contribuye a la inflamación. Los resultados de este ensayo sugieren que PGRP2 actúa como anti-inflamatoria, protegiendo de la inflamación *in vivo*, en una ruta NO1-NOD2 dependiente. Así mismo, Shin Yon Park *et al.*, realizaron una serie de estudios, también en ratones, con el objetivo de analizar la protección innata de la piel. Dichos estudios, resultaron en una visión anti-inflamatoria de PGRP2, proteína capaz de limitar la acción de los linfocitos Th17.

Protegiendo de esta forma a la piel contra una inflamación excesiva (Lee *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2018).

Con los resultados obtenidos, se debe remarcar la falta de firmeza de las conclusiones extraídas, reivindicando la necesidad de realizar más réplicas experimentales. Se debería por una parte, obtener un mayor porcentaje de silenciamiento génico, así como tener un periodo de infección más largo, todo ello en la línea celular HepG2. En cuanto a la línea celular A459, se deberían realizar más repeticiones e incluso aumentar más la concentración de PGRP2 (x8, x16...), para poder determinar si hay una correlación entre la concentración de PGRP2 y la expresión de IL-8. Realizar experimentos de inducción y/o silenciamiento en cultivo celular de tejidos donde la expresión de PGRP2 es inducible (epitelio oral, córnea, etc), para poder determinar si hay variación en el nivel de inflamación, e incluso comprobar si PGRP2 es inducible en el epitelio pulmonar (línea A549 precisamente), cosa que nunca se ha hecho. Incluso se podría estudiar si la concentración sanguínea de PGRP2 aumenta durante una sepsis. Si estos resultados confirmasen la hipótesis propuesta en este trabajo, faltaría conocer las bases moleculares de la función pro-inflamatoria de PGRP2. Faltaría por último pasar los ensayos realizados a un modelo animal como serían los ratones *knock out* de PGRP2. En estos ratones se debería ver si la infección por PAO1 tendría unos resultados más favorables, refiriéndose a una inflamación más controlada y menos dañina, por ejemplo en un modelo de neumonía o de sepsis.

5. CONCLUSIONES

Este proyecto se ha centrado en determinar el papel de PGRP2 en la respuesta inflamatoria ocasionada por el PGN de BGN, en concreto usando *P. aeruginosa* PAO1 como modelo.

Se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. El silenciamiento de la proteína PGRP2 en el cultivo de HepG2 es poco satisfactorio, siendo posiblemente el principal causante de ello la falta de crecimiento en monocapa de estas células, es decir, en forma de aglomeraciones.
2. En las condiciones usadas, e independientemente del silenciamiento, no se han hallado diferencias en la inflamación de las células HepG2 entre pocillos infectados/no infectados. Por ello se deberían de aumentar las horas de infección para poder apreciar diferencias en la secreción de IL-8 entre las células infectadas versus las no infectadas.

3. La concentración fisiológica (sérica) de PGRP2 aplicada sobre las células A549 parece no tener efecto aparente en cuanto a la regulación de la respuesta inflamatoria en respuesta a *P. aeruginosa*.
4. Cuadruplicando la concentración de PGRP2 parece causar un incremento significativo (casi el doble) en cuanto a la expresión de IL-8 por parte de A549 infectadas. Estos resultados sugieren un papel pro-inflamatorio para PGRP2 en respuesta a la presencia del patógeno *P. aeruginosa* PAO1. A pesar de ello, las rutas por la que esta proteína presentaría esta función se desconocen.
5. La PGRP2 aplicada externamente sobre el cultivo de A549 no tiene efecto nocivo ni inflamatorio alguno *per se* (incluso a concentraciones fisiológicas 4X).
6. A falta de confirmar resultados, parece ser que la presencia de PGRP2 es pro-inflamatoria, por lo que se deduce que su silenciamiento sería anti-inflamatorio. Las repercusiones clínicas de este hallazgo aún se desconocen, puesto que no se sabe cómo el silenciamiento de esta proteína podría repercutir en el desarrollo de la infección. La confirmación de los resultados (silenciar de nuevo las células HepG2, probar con otros cultivos inducibles, concentraciones más elevadas de la proteína...) podrían identificar la proteína PGRP2 como potencial diana anti-inflamatoria para mejorar el pronóstico de infecciones causadas por *P. aeruginosa*.

6. **BIBLIOGRAFÍA**

- Ben Haj Khalifa A [et al.] Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation [Journal]. - [s.l.] : Annales de biologie clinique, 2011.
- Bianconi, I., Milani, A., Cigana, C., Paroni, M., Levesque, R. C. and Bragonzi, A. (2011) 'Positive Signature-Tagged Mutagenesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Tracking Patho-Adaptive Mutations Promoting Airways Chronic Infection', 7(2). doi: 10.1371/journal.ppat.1001270.
- Bobrovsky, P., Manuvera, V., Polina, N., Podgorny, O., Prusakov, K., Govorun, V. and Lazarev, V. (2016) 'Recombinant Human Peptidoglycan Recognition Proteins Reveal Antichlamydial Activity', 84(7), pp. 2124–2130. doi: 10.1128/IAI.01495-15.Editor.
- Boneca, I. G. (2005) 'The role of peptidoglycan in pathogenesis', pp. 46–53. doi: 10.1016/j.mib.2004.12.008.
- Boneca, I. G. (2009) 'Mammalian PGRPs in the Spotlight', *Cell Host and Microbe*. Elsevier Inc., 5(2), pp. 109–111. doi: 10.1016/j.chom.2009.01.007.
- Bragonzi, A. (2010) 'International Journal of Medical Microbiology Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibrosis pathogens', *International Journal of Medical Microbiology*. Elsevier GmbH., 300(8), pp. 584–593. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.08.012.
- Bragonzi, A., Paroni, M., Nonis, A., Cramer, N., Montanari, S., Rejman, J. and Tu, B. (2009) 'Pseudomonas aeruginosa Microevolution during Cystic Fibrosis Lung Infection Establishes Clones with Adapted Virulence', *ATS journal*, 180, pp. 138–145. doi: 10.1164/rccm.200812-1943OC.
- Burroughs M, Rozdzinski E, Geelen S, Tuomanen E. 1993. A structure-activity relationship for induction of meningeal inflammation by muramyl peptides. *J Clin Invest* 92:297-302.
- Burroughs MH, Cabellos C, Prasad S, Tuomanen E. 1992. Bacterial components and the pathophysiology of injury to the blood-brain barrier: does cell wall add to the effects of endotoxin in gram-negative meningitis? *J Infect Dis* 165:S82-5.
- Burroughs MH, Prasad S, Cabellos C, Mendelman P, Tuomanen E. 1993. The biological activities of peptidoglycan in experimental *Haemophilus influenzae* meningitis. *J Infect Dis* 167:464-8.
- Cigana, C., Lor, N. I., Bernardini, M. L. and Bragonzi, A. (2011) 'Dampening Host Sensing and Avoiding Recognition in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia', 2011. doi: 10.1155/2011/852513.
- Cloud-hansen, K. A., Hackett, K. T., Garcia, D. L. and Dillard, J. P. (2008) 'Neisseria

gonorrhoeae Uses Two Lytic Transglycosylases To Produce Cytotoxic Peptidoglycan Monomers □ †', 190(17), pp. 5989–5994. doi: 10.1128/JB.00506-08.

Coldewey, S. M., Rogazzo, M., Collino, M., Patel, N. S. A. and Thiemermann, C. (2013) 'Inhibition of IκB kinase reduces the multiple organ dysfunction caused by sepsis in the mouse', 1042, pp. 1031–1042. doi: 10.1242/dmm.012435.

Delgado-Iribarren Alberto [et al.] Laboratorio Clínico Microbiología [Book]. - Madrid : McGRAW-HILL, 1994.

Delpino, M. V., Barrionuevo, P., Scian, R., Fossati, C. A. and Baldi, P. C. (2010) 'Brucella - infected hepatocytes mediate potentially tissue-damaging immune responses', *Journal of Hepatology*. European Association for the Study of the Liver, 53(1), pp. 145–154. doi: 10.1016/j.jhep.2010.02.028.

Dickey, S. W., Cheung, G. Y. C. and Otto, M. (2017) 'Different drugs for bad bugs : of antibiotic resistance', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 16(7), pp. 457–471. doi: 10.1038/nrd.2017.23.

Dinarello, C. A. (2008) 'Infection , fever , and exogenous and endogenous pyrogens : some concepts have changed', 10(4). doi: 10.1179/096805104225006129.

Driscoll, J. A., Brody, S. L. and Kollef, M. H. (2007) 'The Epidemiology , Pathogenesis and Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections', 67(3), pp. 351–368.

Dziarski, R. (2004) 'Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs)', 40, pp. 877–886. doi: 10.1016/j.molimm.2003.10.011.

Ferrand, J. and Ferrero, R. L. (2013) 'Recognition of extracellular bacteria by NLRs and its role in the development of adaptive immunity', 4(October), pp. 1–12. doi: 10.3389/fimmu.2013.00344.

Folkesson, A., Eriksson, S., Andersson, M., Park, J. T. and Normark, S. (2005) 'Components of the peptidoglycan-recycling pathway modulate invasion and intracellular survival of Salmonella enterica serovar Typhimurium', 7, pp. 147–155. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00443.x.

Gellatly, S. L. and Hancock, R. E. W. (2018) 'Pseudomonas aeruginosa : new insights into pathogenesis and host defenses', (June), pp. 159–173. doi: 10.1111/2049-632X.12033.

Giard DJ, et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. J. Natl. Cancer Inst. 51: 1417-1423, 1973. PubMed: [4357758](#)

Girardin, S. E., Travassos, L. H., Herve, M., Blanot, D., Boneca, I. G., Philpott, D. J., Sansonetti, P. J. and Mengin-lecreulx, D. (2003) 'Peptidoglycan Molecular Requirements

Allowing Detection by Nod1 and Nod2 *', 278(43), pp. 41702–41708. doi: 10.1074/jbc.M307198200.

Goldman, S. M., Kamel, F., Ross, G. W., Sarah, A., Marras, C., Hoppin, J. A., Umbach, D. M., Bhudhikanok, G. S., Meng, C., Korell, M., Hauser, R. A., Jankovic, J., Factor, S. A., Bressman, S., Lyons, K. E., Sandler, D. P., William, J. and Tanner, C. M. (2014) 'Peptidoglycan Recognition Protein Genes and Risk of Parkinson's Disease', *Official Journal of the Movement Disorder Society*, 29(9), pp. 1171–1180. doi: 10.1002/mds.25895.Peptidoglycan.

Gómez-Quiroz, L., Bucio, L., Souza, V., Escobar, C., Farfán, B., Hernández, E., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Vargas-Vorackova, F., Kershenobich, D. and Konigsberg, M. (2003) 'Interleukin 8 response and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde or lipopolysaccharide', *Elsevier*, 26, pp. 134–141. doi: 10.1016/S1386-6346(03)00010-X.

Gupta, S., Tang, C., Tran, M. and Kadouri, D. E. (2016) 'Effect of Predatory Bacteria on Human Cell', pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0161242.

Heiss, L. N., Moser, S. A., Unanue, E. R. and Goldman, W. E. (1993) 'Interleukin-1 Is Linked to the Respiratory Epithelial Cytopathology of Pertussis', 61(8), pp. 3123–3128.

HepG2 (liver hepatocellular carcinoma): cell culture and transfection protocol. Disponible en: <http://www.hepg2.com/hepg2-cell-transfection/>

Hollenberg, S. M. (2005) 'MOUSE MODELS OF RESUSCITATED SHOCK', 24(10), pp. 58–63. doi: 10.1097/01.shk.0000191415.02085.48.

Holloway, B. Y. B. W. (1955) 'Genetic Recombination in *Pseudomonas aeruginosa*', *J. gen Microbiol*, (13), pp. 572–581.

Hua, X., Yuan, X., Li, Z., Coursey, T. G. and Pflugfelder, S. C. (2015) 'A Novel Innate Response of Human Corneal Epithelium to Heat-killed *Candida albicans* by Producing Peptidoglycan Recognition Proteins', pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0128039.

Ikegami, M., Scoville, E. A., Grant, S., Korfhagen, T., Brondyk, W., Scheule, R. K. and Whitsett, J. A. (2007) 'Surfactant Protein-D and Surfactant Inhibit Endotoxin-Induced Pulmonary Inflammation', *CHEST*. Elsevier, 132(5), pp. 1447–1454. doi: 10.1378/chest.07-0864.

Kashyap, D. R., Rompca, A., Gaballa, A., Helmann, J. D., Chan, J., Chang, C. J., Hozo, I., Gupta, D. and Dziarski, R. (2014) 'Peptidoglycan Recognition Proteins Kill Bacteria by Inducing Oxidative, Thiol, and Metal Stress', 10(7). doi: 10.1371/journal.ppat.1004280.

Knowles, B., Chester, W. and Aden, D. P. (1983) 'Human hepatoma derived cell line, process

for preparation thereof, and uses therefor', (19).

Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A. N. R., Rieber, N., Radsak, M., Bernuth, H. Von, Benarafa, C., Roos, D. and Skokowa, J. (2015) 'Neutrophils : Between Host Defence , Immune Modulation , and Tissue Injury', (i), pp. 1–23. doi: 10.1371/journal.ppat.1004651.

Lee, I., Kim, Y. O., Park, S. and Chun, J. (2017) 'OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity', (2016), pp. 1100–1103. doi: 10.1099/ijsem.0.000760.

Lee, J., Geddes, K., Streutker, C., Philpott, D. J. and Girardin, S. E. (2012) 'Role of Mouse Peptidoglycan Recognition Protein PGLYRP2 in the Innate Immune Response to Salmonella enterica Serovar', 80(8), pp. 2645–2654. doi: 10.1128/IAI.00168-12.

Li, X., Wang, S., Wang, H. and Gupta, D. (2006) 'Differential Expression of Peptidoglycan Recognition Protein 2 in the Skin and Liver Requires Different Transcription Factors *', 281(30), pp. 20738–20748. doi: 10.1074/jbc.M601017200.

Lister, P. D., Wolter, D. J. and Hanson, N. D. (2009) 'Antibacterial-Resistant Pseudomonas aeruginosa : Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms', 22(4), pp. 582–610. doi: 10.1128/CMR.00040-09.

Liu, X., Liang, J. and Li, G. (2010) 'Lipopolysaccharide promotes adhesion and invasion of hepatoma', pp. 2235–2239. doi: 10.1007/s11033-009-9710-4.

Lore, N. I., Leone, M. R., Ierano, T., Cigana, C., Curcuru, L., Silipo, A., Cozzolino, F., Lanzetta, R., Molinaro, A., Bernardini, M. L. and Bragonzi, A. (2009) 'Pseudomonas aeruginosa Exploits Lipid A and Muropeptides Modification as a Strategy to Lower Innate Immunity during Cystic Fibrosis Lung Infection', 4(12). doi: 10.1371/journal.pone.0008439.

Maniatis, A. N., Karkavitsas, C., Maniatis, N. A., Tsiftsakis, E., Genimata, V. and Legakis, N. J. (1995) 'Pseudomonas aeruginosa Folliculitis Due to Non-O : 11 Serogroups : Acquisition Through Use of Contaminated Synthetic Sponges', (September 1994), pp. 1994–1996.

Marc A. Boudreau, Jed. F. Fisher, and S. M. (2012) 'Messenger Functions of the Bacterial Cell Wall-derived Muropeptides', 51(14), pp. 2974–2990. doi: 10.1021/bi300174x.Messenger.

Mccord, A. M., Resto-ruiz, S. I. and Anderson, B. E. (2006) 'Autocrine Role for Interleukin-8 in Bartonella henselae -Induced Angiogenesis', 74(9), pp. 5185–5190. doi: 10.1128/IAI.00622-06.

Medin, C. L. and Rothman, A. L. (2006) 'Cell Type – Specific Mechanisms of Interleukin-8 Induction by Dengue Virus and Differential Response to Drug Treatment', *Journal of*

Infectious Diseases, 193(July), pp. 1070–1077.

Mogensen, T. H. (2009) ‘Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses’, 22(2), pp. 240–273. doi: 10.1128/CMR.00046-08.

Moya, B., Juan, C., Pérez, J. L. and Oliver, A. (2008) ‘Benefit of Having Multiple ampD Genes for Acquiring β -Lactam Resistance without Losing Fitness and Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*’, 52(10), pp. 3694–3700. doi: 10.1128/AAC.00172-08.

Nau, R. (2005) ‘Minimizing the release of proinflammatory and toxic bacterial products within the host : A promising approach to improve outcome in life-threatening infections’, 44, pp. 1–16. doi: 10.1016/j.femsim.2005.01.001.

Noto, J. M. and Jr, R. M. P. (2013) ‘NIH Public Access’, (22), pp. 41–50. doi: 10.1007/978-1-62703-005-2.

Park, S. Y., Gupta, D., Hurwich, R., Chang, H. and Dziarski, R. (2018) ‘Peptidoglycan Recognition Protein Pglyrp2 Protects Mice from Psoriasis-like Skin Inflammation by Promoting Regulatory T Cells and Limiting Th17 Responses’. doi: 10.4049/jimmunol.1101068.

Qiu, H. N. and Wong, C. K. (2012) ‘Muramyl dipeptide mediated activation of human bronchial epithelial cells interacting with basophils : a novel mechanism of airway inflammation’, pp. 81–94. doi: 10.1111/cei.12031.

Reubold, T. F., Hahne, G., Wohlgenuth, S. and Eschenburg, S. (2014) ‘Crystal structure of the leucine-rich repeat domain of the NOD-like receptor NLRP1 : Implications for binding of muramyl dipeptide’, *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 588(18), pp. 3327–3332. doi: 10.1016/j.febslet.2014.07.017.

Robbins and Cortan Patología Estructural y Funcional, 9a edición [Book]. - Madrid : Elsevier España, 2015

Saha, S., Qi, J., Wang, S., Wang, M., Li, X., Kim, Y., Gupta, D. and Dziarski, R. (2010) ‘NIH Public Access’, 5(2), pp. 137–150. doi: 10.1016/j.chom.2008.12.010.PGLYRP-2.

Saha, S., Qui, J., Wang, S., Wang, M., Li, X., Kim, Y.-G., Nuñez, G., Gupta, D. and Dziarski, R. (2009) ‘PGLYRP-2 and Nod2 Are Both Required for Peptidoglycan-Induced Arthritis and Local Inflammation’, *Cell Host and Microbe*, 5, pp. 137–150. doi: 10.1016/j.chom.2008.12.010.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Ed.2

Scheurwater, E., Reid, C. W. and Clarke, A. J. (2008) ‘Lytic transglycosylases : Bacterial

space-making autolysins', 40, pp. 586–591. doi: 10.1016/j.biocel.2007.03.018.

Scholz, G. M., Heath, J. E., Aw, J. and Reynolds, E. C. (2018) 'Regulation of the peptidoglycan amidase PGLYRP2 in epithelial cells by IL-36 γ ', (June). doi: 10.1128/IAI.00384-18.

Spandidos, A., Wang, X., Wang, H. and Seed, B. (2018) 'PrimerBank : a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification', 38(June), pp. 792–799. doi: 10.1093/nar/gkp1005.

Stead, D. E. (1992) 'Grouping of Plant-Pathogenic and Some Other Pseudomonas spp . by Using Cellular Fatty Acid Profiles', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(2), pp. 281–295.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S., Olson, M. V, Corporation, P. and West, E. A. (2000) 'Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1 , an opportunistic pathogen', 406(August), pp. 959–964.

Takeuchi, O. and Akira, S. (2010) 'Review Pattern Recognition Receptors and Inflammation', *Cell*. Elsevier Inc., 140(6), pp. 805–820. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.

Travassos, L. H., Carneiro, L. A. M., Girardin, S. E., Boneca, I. G., Lemos, R., Bozza, M. T., Domingues, R. C. P., Coyle, A. J., Bertin, J., Philpott, D. J. and Plotkowski, M. C. (2005) 'Nod1 Participates in the Innate Immune Response to Pseudomonas aeruginosa *', 280(44), pp. 36714–36718. doi: 10.1074/jbc.M501649200.

Verlag, G. F., Kersterst, K., Ludwig, W., Vancanneytt, M., De, P., Gillis, M. and Schleifer, K. (1996) 'Recent Changes in the Classification of the Pseudomonads : an Overview', pp. 465–477. doi: 10.1016/S0723-2020(96)80020-8.

Viala, J., Chaput, C., Boneca, I. G., Cardona, A., Girardin, S. E., Moran, A. P., Athman, R., Mémet, S., Huerre, M. R., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Sansonetti, P. J., Labigne, A., Bertin, J., Philpott, D. J. and Ferrero, R. L. (2004) 'Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island', *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 5, p. 1166. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ni1131>.

Wang, H., Gupta, D., Li, X. and Dziarski, R. (2005) 'Peptidoglycan Recognition Protein 2 (N -Acetylmuramoyl- L -Ala Amidase) Is Induced in Keratinocytes by Bacteria through the p38

Kinase Pathway’, 73(11), pp. 7216–7225. doi: 10.1128/IAI.73.11.7216.

Wang, J. E., Dahle, M. K., McDonald, M., Foster, S. J., Aasen, A. O. and Thiemermann, C. (2003) ‘Review Article BACTERIAL SEPSIS: RECEPTORS, SIGNAL TRANSDUCTION, BIOLOGICAL EFFECTS, AND SYNERGISM’, 20(5), pp. 402–414.

Woodhams, K. L., Chan, J. M., Lenz, J. D., Hackett, K. T. and Dillard, J. P. (2013) ‘Peptidoglycan Fragment Release from *Neisseria meningitidis*’, 81(9), pp. 3490–3498. doi: 10.1128/IAI.00279-13.

Wright, A., Mahaut-smith, M., Symon, F., Ran, S., Bafadhel, M., Muessel, M., Bradding, P., Wardlaw, A., Vial, C., Immunol, J., Wright, A., Mahaut-smith, M., Symon, F., Sylvius, N., Ran, S., Bafadhel, M., Muessel, M., Bradding, P. and Wardlaw, A. (2018) ‘Impaired P2X1 Receptor–Mediated Adhesion in Eosinophils from Asthmatic Patients Adam’, *The Journal of Immunology*. doi: 10.4049/jimmunol.1501585.

Xu, J. I. N., Li, Y., Yang, X., Liu, Y., Chen, Y. and Chen, M. I. N. (2015) ‘Bilobol inhibits the lipopolysaccharide-induced expression and distribution of RhoA in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells’, 1(9), pp. 962–966. doi: 10.3892/ol.2015.3276.

Zulfiqar, F., Hozo, I., Rangarajan, S., Mariuzza, R. A., Dziarski, R. and Gupta, D. (2013) ‘Genetic Association of Peptidoglycan Recognition Protein Variants with Inflammatory Bowel Disease’, 8(6). doi: 10.1371/journal.pone.0067393.