



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO FIN DE GRADO

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS CORTICOIDES INHALADOS SOBRE LA INFECCIÓN BRONQUIAL CRÓNICA POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC)

Noemi Cerón Pisa

Grado de Biología

Facultad de Ciencias

Año Académico 2020-21

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS CORTICOIDES INHALADOS SOBRE LA INFECCIÓN BRONQUIAL CRÓNICA POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC)

Noemi Cerón Pisa

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Ciencias

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2020-21

Palabras clave del trabajo:

EPOC, corticosteroides, *Pseudomonas*, TLR, c-Jun

Noemi Cerón Pisa

Tutora externa: Amanda Iglesias Coma

Ponente: Cristòfol Vives Bauzà

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ÍNDICE

Abreviaturas.....	6
Resumen.....	7
Introducción.....	8
Metodología.....	11
<i>Diseño experimental.....</i>	<i>11</i>
<i>Cultivo celular.....</i>	<i>11</i>
<i>Extracción RNA.....</i>	<i>13</i>
<i>Cuantificación RNA total.....</i>	<i>13</i>
<i>Síntesis cDNA.....</i>	<i>14</i>
<i>RT-qPCR con duplicado.....</i>	<i>14</i>
<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>15</i>
Resultados.....	15
Discusión.....	24
Conclusión.....	27
Bibliografía.....	28

Abreviaturas

AEC	Células epiteliales respiratorias
ANOVA	Analysis Of Variance / Análisis de la varianza
AP1	Proteína activadora 1
B	Budesonida
BAL	Lavado broncoalveolar
BP	Budesonida PA
C	Control
cDNA	DNA complementario
CP	Control PA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
F	Fluticasona
FABP5	Fatty Acid Binding Protein 5
FCS	Suero fetal bovino
FEV1	Volumen Espiratorio forzado en el primer segundo
FP	Fluticasona PA
FVC	Capacidad Vital Forzada
GR	Receptor glucocorticoide
ICS	Corticosteroides inhalados
LABA	β 2-agonistas de acción prolongada
LAMA	Antagonistas muscarínicos de acción prolongada
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
mRNA	RNA mensajero
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline / Tampón fosfato salino
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Retrotranscripción
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transcription PCR
SD	Desviación estándar
TLR2 / 4	Toll Like Receptor 2 / 4
Tm	Melting temperature / Temperatura de fusión
β 2m	Microglobulina β 2

Resumen

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una de las mayores causas de muerte a nivel mundial. Esta enfermedad se caracteriza por síntomas respiratorios persistentes y una limitación del flujo de aire debido a anomalías respiratorias. Los pacientes con EPOC pueden ser tratados con diferentes fármacos para reducir los síntomas y la frecuencia de las exacerbaciones, uno de ellos son los corticosteroides inhalados (ICS). Varios estudios han descrito que los ICS se asocian con un mayor riesgo de neumonía en pacientes con EPOC. Los *Toll-Like receptors* (TLR) son los receptores encargados de reconocer los patógenos, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* (PA) que es reconocida por TLR2, 4 y 5 en macrófagos alveolares. La unión del ligando a TLR activa diferentes vías de señalización, una de las cuales acaba activando el factor de transcripción de la proteína activadora 1 (AP1) mediante c-Jun, que también puede ser activado por FABP5. Por tanto, se quiso estudiar si los ICS en macrófagos aislados de pacientes con EPOC, infectados con PA y tratados con budesonida y fluticasona, modificaban TLR2 y TLR4, así como la de los factores de transcripción c-Jun y FABP5. Los pacientes (n = 37) fueron divididos según si presentaban la enfermedad y según el uso de ICS. Los macrófagos se obtuvieron a partir de un lavado broncoalveolar (BAL), los cuales fueron cultivados e incubados con PA con los corticosteroides. El estudio de las expresiones relativas de TLR2, TLR4, c-Jun y FABP5 se realizó mediante una RT-qPCR a partir de la extracción de RNA, cuyos resultados fueron analizados por un ANOVA de una vía. Los resultados obtenidos demostraron que no es el uso de los ICS lo que provoca un factor de riesgo de infección por PA, sino que es la dosis la que podría afectar de manera crítica a la respuesta frente patógeno por parte de los macrófagos.

Introducción

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una de las mayores causas de muerte a nivel global (Lozano et al., 2012). Ya en el 2019 llegó a ser la tercera mayor causa de muerte en el mundo, según la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2020).

La EPOC es una enfermedad común, prevenible y tratable caracterizada por síntomas respiratorios persistentes y una limitación del flujo de aire debido a anomalías respiratorias y/o alveolares causada normalmente por una exposición significativa a partículas nocivas (GOLD committee, 2021). Esta enfermedad consiste en una inflamación crónica del pulmón, que se diferencia por una obstrucción progresiva y persistente al flujo aéreo (Itoh et al., 2013) y por la destrucción del parénquima pulmonar (Salvi & Barnes, 2009). Los síntomas más comunes son disnea o dificultad para respirar, tos crónica y producción de esputo crónica (GOLD committee, 2021). Para diagnosticar esta enfermedad se utiliza una espirometría, en la que se relaciona el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV_1) entre la capacidad vital forzada (FVC). Un valor menor de 0.70 en el resultado post-broncodilatador de FEV_1/FVC confirma el diagnóstico de la EPOC (GOLD committee, 2021).

Además de los factores de riesgo genéticos, el tabaco es uno de los factores más importantes y conocidos, pero solo se le atribuye la mitad de los casos de EPOC (Salvi & Barnes, 2009). La exposición al humo de biomasa (de combustible o de carbón), la exposición ocupacional al polvo y los vapores, los antecedentes de tuberculosis pulmonar, los de asma crónica, la contaminación del aire exterior y el nivel socioeconómico deficiente, son otros factores de riesgo importantes para sufrir EPOC (Salvi & Barnes, 2009).

Además de los síntomas respiratorios diarios, los pacientes con EPOC presentan episodios a lo largo de la enfermedad donde los síntomas se ven incrementados, los cuales reciben el nombre de exacerbaciones. Estos episodios provocan un aumento de la morbilidad y la mortalidad, por lo que a mayor frecuencia peor estado de salud tienen los pacientes (Perera et al., 2007). Para reducir los síntomas, la frecuencia y la severidad de las exacerbaciones existen diferentes tratamientos (Vogelmeier et al., 2020). El tratamiento elegido depende de las respuestas del paciente ante los mismos. Algunas de las terapias más comunes son β_2 -agonistas de acción prolongada (LABA), antagonistas muscarínicos de acción prolongada (LAMA) y corticosteroides inhalados (ICS) (Vogelmeier et al., 2020).

A pesar de los efectos beneficiosos de los ICS, hay estudios que demuestran que la administración de ICS se asocia con un mayor riesgo de neumonía en pacientes con EPOC, aunque en pacientes con asma no se ha descrito (Festic et al., 2016; Suissa et al., 2013). Aun así, existe un debate sobre si el riesgo es el mismo entre los diferentes tipos de ICS utilizados, budesonida o fluticasona. Los ICS producen su efecto mediante la unión al receptor glucocorticoide (GR), interfiriendo directa o indirectamente en procesos genómicos y no genómicos (Wagner et al., 2015). Su principal efecto es antiinflamatorio, incluyendo la supresión de la producción de citoquinas y quimiocinas y moléculas de adhesión en las células epiteliales respiratorias (AEC, del inglés - airway epithelial cells) (Wagner et al., 2015).

Los *Toll-Like receptors* (TLR) forman parte del sistema inmune innato los cuales reconocen selectivamente moléculas asociadas a patógenos, como lipopolisacáridos, flagelina o ácidos nucleicos de virus o bacterias (Crespo-Lessmann et al., 2010). Hasta el momento sólo se han descrito 11 TLR en humanos, los cuales se clasifican en grupos según el tipo de molécula que reconocen (Kawai & Akira, 2007). TLR1, 2, 4 y 6 reconocen lípidos, TLR 5 y 11 ligandos proteicos y TLR3, 7, 8 y 9 detectan ácidos nucleicos provenientes de virus y bacterias (Akira et al., 2006). TLR10 es de los menos comprendidos y todavía se siguen estudiando los ligandos que se unen a este receptor (Su et al., 2021). Además, los TLR1, 2, 4, 5 y 6 han sido encontrados en la membrana plasmática, mientras que los TLR3, 7, 8, 9, 10 y 11 fueron encontrados exclusivamente en compartimentos endosomales (Kawai & Akira, 2010). *Pseudomonas aeruginosa* (PA) es una bacteria gram-negativa y un patógeno oportunista, el cual puede causar neumonía (Faure et al., 2018), y puede ser reconocido por TLR2, 4, 5 y 9 de las células del sistema inmune (Mclsaac et al., 2012). En el caso de los macrófagos alveolares, una de las células pulmonares involucradas en la primera línea de defensa, se ven sobreexpresados los TLR2, 4 y 5 frente a una infección por PA (Raoust et al., 2009). La unión del ligando al TLR activa diferentes vías de señalización intracelular. Entre estas vías se encuentran las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK: p38) y c-Jun, un miembro de la familia de la proteína activadora 1 (AP1), las cuales también se pueden activar mediante proteínas de unión a ácidos grasos (FABP), regulando así la producción de mediadores inflamatorios (Figura 1) (Fitzgerald & Kagan, 2020; Furuhashi & Hotamisligil, 2008; Vidya et al., 2018).

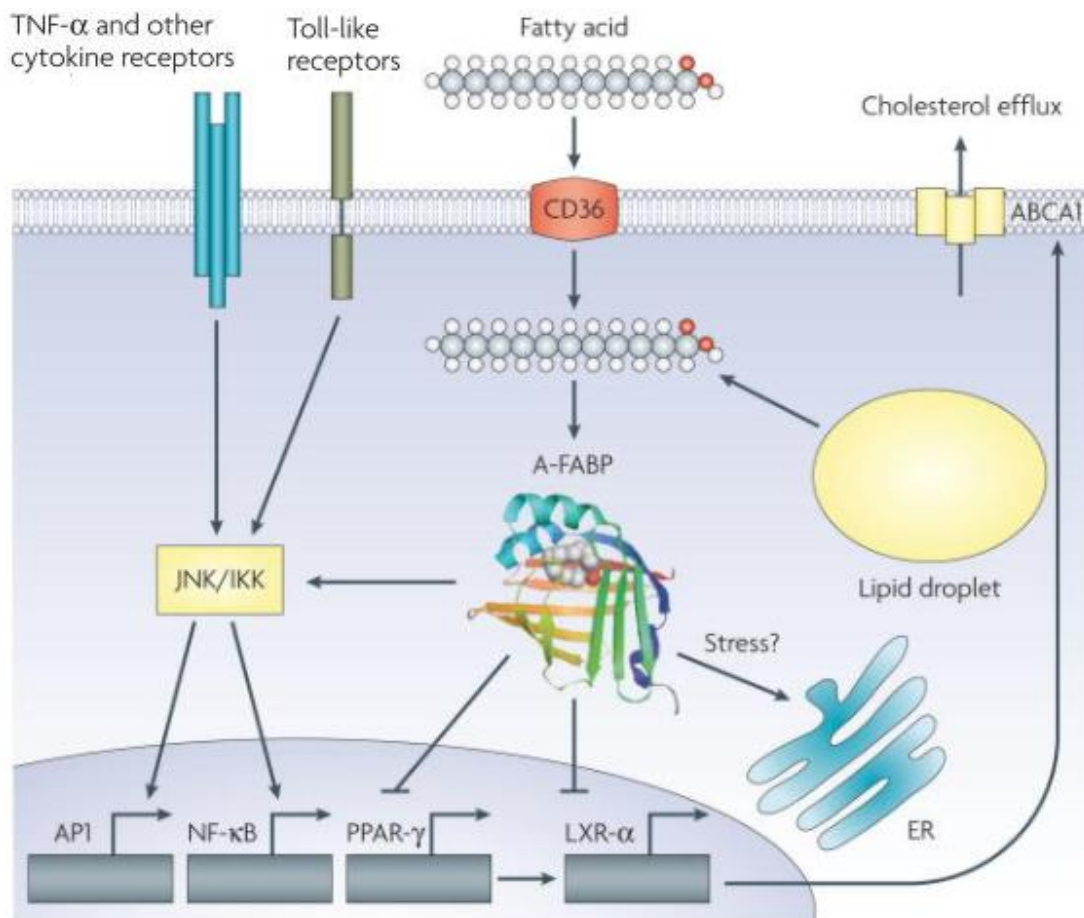


Figura 1. Vía de señalización de TLR y FABP en macrófagos (Furuhashi & Hotamisligil, 2008).

Entonces, los macrófagos y neutrófilos son fundamentales para una correcta respuesta del sistema inmunológico, ya que poseen múltiples mecanismos para el reconocimiento y posterior eliminación de patógenos. En pacientes con EPOC el número de estas células se ve aumentado, pero, a pesar de ello, las infecciones respiratorias son comunes, lo que sugiere que la función del sistema inmunológico se ve afectada (Bhat et al., 2015). Los efectos de los ICS sobre los macrófagos son complejos, en el anterior estudio en el que participó mi tutora, Dra. Amanda Iglesias, se demostró que la infección por *Haemophilus influenzae* provocaba una disminución de las propiedades antiinflamatorias de los corticosteroides a través de una disminución de la actividad de histona deacetilasa (Cosío et al., 2015).

El objetivo de este estudio fue investigar si el uso de ICS en macrófagos aislados de pacientes con EPOC, infectados con *Pseudomonas aeruginosa* (PA) y tratados con budesonida o fluticasona, modificaban la expresión de TLR2 y TLR4, así como la de los factores de transcripción FABP5 y c-Jun.

Metodología

Diseño experimental

El estudio se ha realizado con una cohorte de 37 pacientes, de los cuales 11 tenían EPOC tratados con ICS, 16 tenían EPOC sin ICS y 10 no tenían EPOC y eran no fumadores. Los pacientes fueron a realizarse una broncoscopia por práctica clínica habitual, donde se les hizo un lavado broncoalveolar (BAL) para un posterior cultivo de macrófagos. Por tanto, las muestras fueron proporcionadas por el neumólogo. El BAL es una técnica de muestreo broncoscópica que se basa en la instilación de 250 cc de suero fisiológico en la llingula o el lóbulo medio del pulmón, de la cual se obtienen un número de células pulmonares representativo de cada paciente. A partir del BAL se aislaron los macrófagos alveolares y se realizó un cultivo celular con 6 tratamientos diferentes: control (C) control con PA (CP), budesonida (B), budesonida con PA (BP), fluticasona (F) y fluticasona con PA (FP); con el objetivo de analizar la expresión de los mRNA FABP5, TLR2, TLR4, c-Jun y microglobulina β 2 mediante PCR a tiempo real (RT-qPCR).

Cultivo celular

El BAL se centrifugó en un tubo corning de 50 mL a 1800 rpm durante 8 min. Por un lado, el sobrenadante se alicuotó y se guardó a -80 °C para determinaciones futuras. El pellet resultante de la centrifugación se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 (10% suero fetal bovino (FCS), 1% HEPES Buffer, 1% antibiótico (estreptomocina y penicilina)), se pasó a un frasco de cultivo y se incubó 2 h a 37 °C, 5% CO₂ y 95% de humedad. Tras la incubación se descartó el sobrenadante y se añadieron otros 5 mL del mismo medio. Se rasparon con una espátula de cultivo celular los macrófagos adheridos en el fondo del frasco de cultivo, se recogió todo el medio y se puso en un tubo corning de 15 mL. Se centrifugó a 1800 rpm 6 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 1 mL de medio de cultivo RPMI (0.5% FCS, 1% HEPES Buffer). Después, se contaron el número de células introduciendo 10 μ L en la cámara de Neubauer, para saber qué concentración había en el mL. Los cálculos son los siguientes:

- Concentración total

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ células}}{\text{n}^\circ \text{ cuadrantes contados}} \cdot 10000 \text{ (factor de la cámara)} = \text{células/mL (Ci)}$$

- Concentración de células por pocillo (Cf)

C_i (cálculo anterior) $\cdot V_i = C_f \cdot V_f$ (siendo $V_i = 1$ mL y $V_f = 6$ mL por el total de 6 pocillos)

Según el número obtenido de células se determinó el número de pocillos a utilizar, dicho número oscilaba entre 1 y 6 pocillos. La placa que se usó era de 24 pocillos, ya que el área y la cantidad de medio a utilizar encajaba con el número de células.

Si la cantidad de células era suficiente (mínimo 50000 por pocillo), se enrasaba hasta 6 mL con el mismo medio en el tubo corning, se resuspendían y se ponía 1ml en cada pocillo. El cultivo se incubó *overnight* a 37 °C con 5% de CO₂ y 95% de humedad. Al día siguiente se retiró el medio de cada pocillo con una pipeta y se prepararon los medios de cultivo RPMI (0.5% FCS, 1% HEPES Buffer) con budesonida y fluticasona a una concentración final de 1 μM.

En la figura 2 se detalla los tratamientos realizados si el número de células es suficiente para los 6 pocillos.

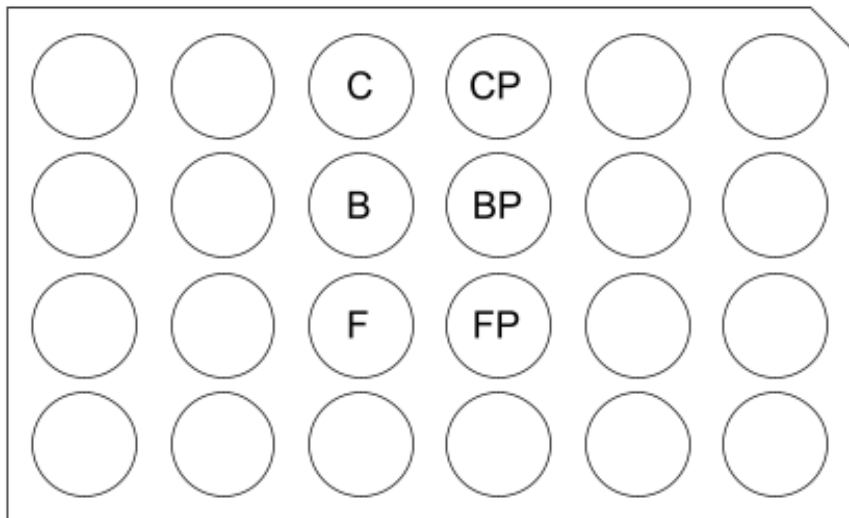


Figura 2. Modelo placa de cultivo muestra BAL. C: control; CP: control con PA; B: budesonida 1 μM; BP: budesonida 1 μM con PA; F: fluticasona 1 μM; FP: fluticasona 1 μM con PA.

Para la solución de PA se usó la cepa PA01 refrescada la noche anterior con medio de cultivo LB (Luria Bertani) líquido a 37 °C en agitación 180 rpm. Con el objetivo de obtener una concentración final de 10⁹ bacterias a partir de la solución inicial, se utilizó un espectrofotómetro a 600 nm. Entonces, se fue diluyendo la solución inicial con PBS hasta llegar a una lectura de 1.000, lo cual significaba

que se encontraba en la concentración deseada. El volumen de PA necesario según el número de células de cada pocillo se calculó con la siguiente fórmula:

- Volumen de PA para cada pocillo

$$\frac{\text{Cf (cálculo anterior)} \cdot 100 \text{ (MOI)}}{10^9} \cdot 1000 = \mu\text{L PA}$$

Tras añadir PA en los pocillos correspondientes, el cultivo se incubó durante 3 h a 37 °C con 5% de CO₂ y 95% de humedad.

Pasado el tiempo de incubación, por una parte, se retiró el medio de cada pocillo y se guardó a -80 °C. Por otra parte, se limpiaron los pocillos con PBS sin despegar las células del fondo, se aspiró y se añadió 125 µL de TRIzol Reagent para lisar los macrófagos y proceder a la extracción del RNA.

Extracción RNA

Se siguió el protocolo TRIzol Reagent (User guide, ThermoFisher scientific, Waltham, MA, USA) con modificaciones. Por tanto, a la muestra anterior se le añadió 100 µL de cloroformo, se vorteoó 15 s y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Después, se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min a 4 °C, lo cual separó la muestra en tres fases diferentes: orgánica (proteínas), interfase (DNA) y acuosa (RNA). Se transfirió 62.6 µL de la fase acuosa a otro tubo eppendorf y se le añadió el mismo volumen de isopropanol (proporción 1:2 de TRIzol). Se vorteoó 5-10 s y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13000 rpm 8 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 125 µL de etanol al 75% (proporción 1:1 de TRIzol). Se centrifugó a 8100 rpm 5 min a 4 °C, se eliminó el etanol y se dejó secar el pellet de RNA al aire 3 min aproximadamente. Finalmente, se añadieron 12 µL de agua libre de nucleasas, se vorteoó, se puso en hielo y se cuantificó.

Cuantificación RNA total

La concentración de RNA total (µg/µL) de cada muestra se cuantificó con un espectrofotómetro *Nanovue plus* a una absorbancia de 260 nm. Se pusieron 2 µL de agua libre de nucleasas para su calibrado y se procedió a cuantificar las muestras con el mismo volumen.

Síntesis cDNA

A partir de la concentración de RNA total se realizaron los cálculos necesarios para tener todas las muestras con 1 µg de RNA, con un volumen final de 20 µL para la síntesis de cDNA.

$$\frac{1}{\mu\text{g}/\mu\text{L (resultado cuantificación)}} = \mu\text{L de muestra con 1 } \mu\text{g de RNA}$$

Para la retrotranscripción (RT) a cDNA se usó SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Bioline, London, UK). Por tanto, se cogió un volumen específico de cada muestra para tener 1 µg de RNA, se añadieron 4 µL de *5x TransAmp Buffer*, 1 µL de *Reverse Transcriptase* y agua libre de nucleasas hasta llegar al volumen final de 20 µL. Tras la preparación de las muestras, se pusieron en un termociclador con el siguiente programa: 25 °C 10 min (*primer annealing*), 42 °C 15 min (*RT*), 85 °C 5 min (*inactivation*). Al acabar se guardaron a -80 °C para una posterior RT-qPCR.

RT-qPCR con duplicado

Por una parte, se diluyeron 1:10 las muestras de cDNA añadiendo 180 µL de agua libre de nucleasas. Por otra parte, se hicieron las mezclas para cada *primer* de los mRNA de interés (Tabla 1) teniendo en cuenta el análisis con un duplicado. Para cada muestra se pusieron 5 µL de KAPA SYBR FAST Universal Kit (Sigma Aldrich, Billerica, MA, USA), 0.2 µL del *primer forward*, 0.2 µL del *primer reverse*, 2.6 µL de agua libre de nucleasas. Entonces, en cada pocillo se añadieron 8 µL de la mezcla anterior y 2 µL de la muestra. Se tapó la placa, se centrifugó a 2000 rpm 2 min y se realizó la RT-qPCR con el programa correspondiente al mRNA que se analizó en la placa. En el caso de las fases de la PCR de TLR2, FABP5 y β2m fueron: 95 °C 5 min, 95 °C 30 min, 60 °C 30 min, 72 °C 30 min, 65 °C 5 min. Y en el caso de TLR4 y c-Jun fueron: 95 °C 3 min, 95 °C 30 min, 61.7 °C 30 min, 72 °C 30 min, 65 °C 5 min. Los resultados se normalizaron con los de β2m. Además, se realizó la eficiencia de los *primers* mediante el uso de una recta patrón a una concentración conocida.

Tabla 1. Secuencias de cada primer de los mRNA de interés. F: Forward; R: Reverse

Oligonucleótido		Secuencia (5' → 3')
TLR2	F	GGACTTCTCCCATTTCGGTCT
	R	CTCCAGGTAGGTCTTGGTGTTT
TLR4	F	GATTTATCCAGGTGTGAAATCC
	R	TATTAAGGTAGAGAGGTGGC
c-Jun	F	AAAGGATAGTGCGATGTTTC
	R	TAAAATCTGCCACCAATTCC
FABP5	F	TGGCCAAGCCAGATTGTATCA
	R	CTGATGCTGAACCAATGCACC
β2m	F	ACCCCCACTGAAAAAGATGAG
	R	ATCTTCAAACCTCCATGATGC

Análisis estadístico

Los valores se expresaron como media ± desviación estándar (SD) de al menos 3 experimentos diferentes por duplicado. La comparación entre los grupos experimentales se realizó mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA). Se consideró que un valor de $p < 0.05$ representaba una diferencia estadísticamente significativa. Todo el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando GraphPad InStat versión 6.00 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, EE. UU.).

Resultados

Análisis RT-qPCR

Las eficiencias de cada *primer* a partir de la recta patrón fueron todas alrededor del 100% (Figuras 3-5).

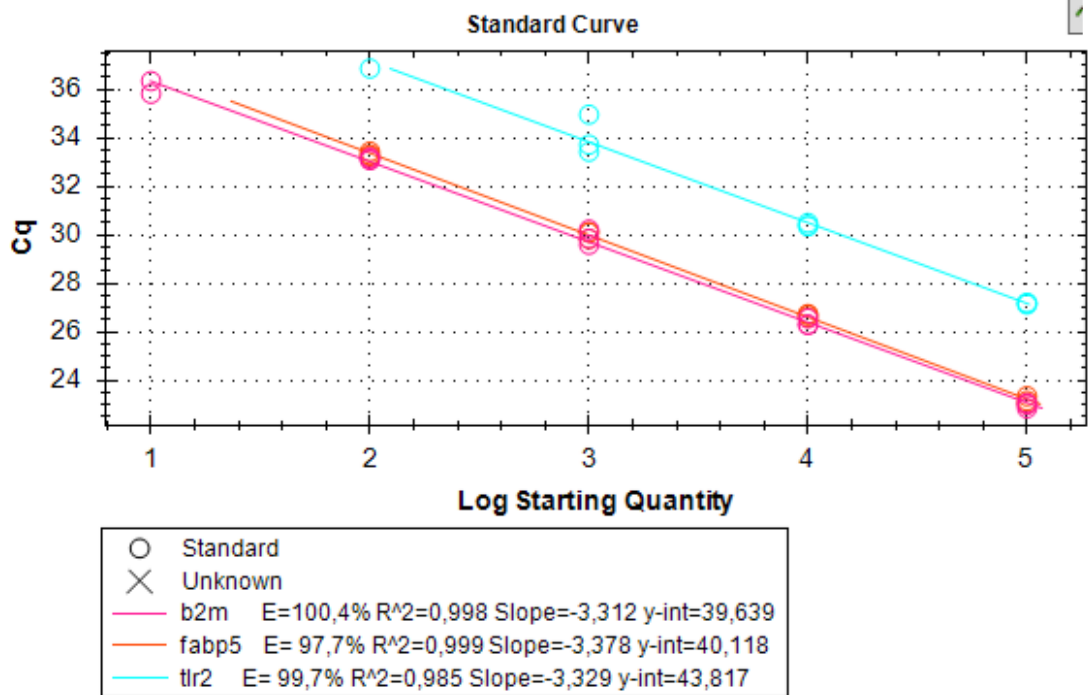


Figura 3. Representación recta patrón de los genes $\beta 2m$, FABP5 y TLR2, junto con las eficiencias correspondientes (E).

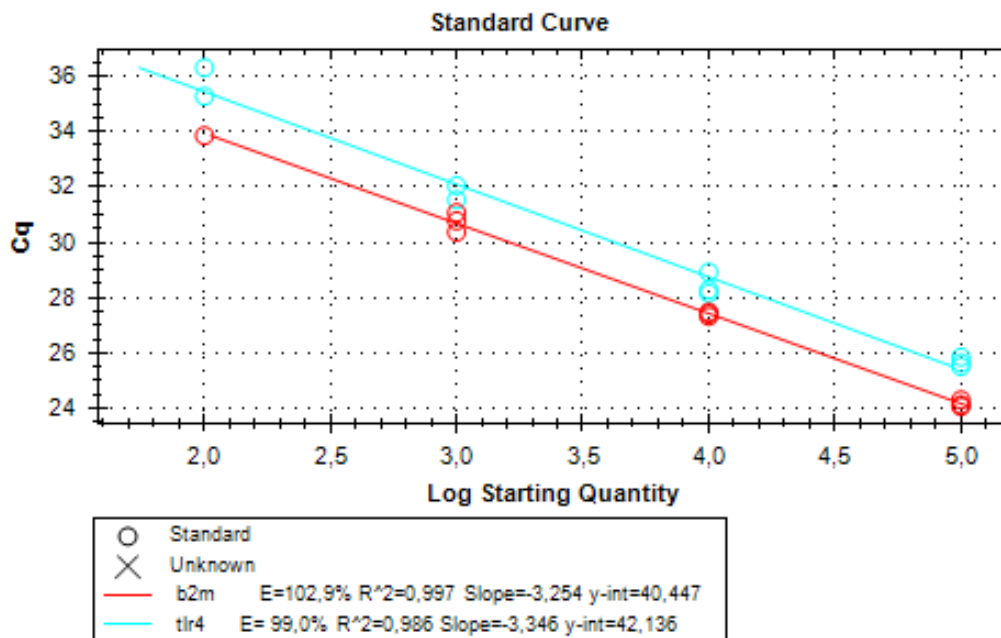


Figura 4. Representación recta patrón de los genes $\beta 2m$ y TLR4, junto con las eficiencias correspondientes (E).

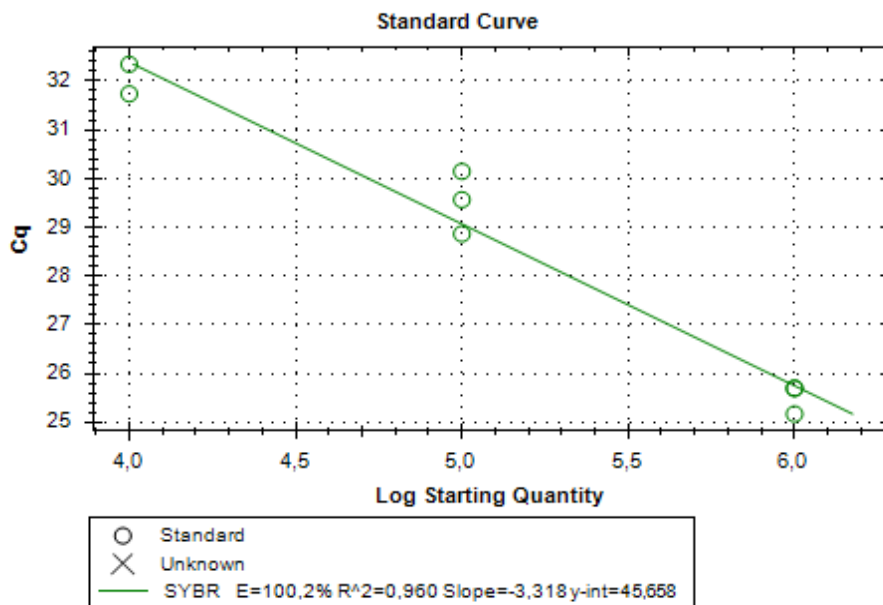


Figura 5. Representación recta patrón del gen *c-Jun* (color verde), junto con la eficiencia correspondiente (E).

Siguiendo el protocolo explicado anteriormente, se realizó el análisis de los mRNA de interés. Entonces, se observó que la temperatura de fusión (melting temperature o T_m) no era la esperada y, además, en algunas muestras se observó que había dímeros de oligonucleótidos por la cantidad insuficiente de mRNA. (Figuras 6-10).

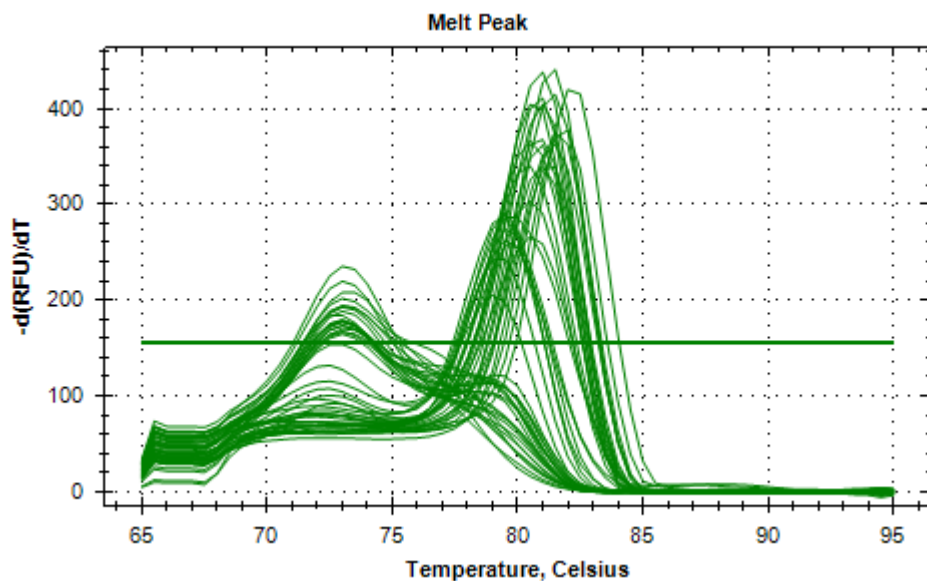


Figura 6. Representación de la temperatura de fusión del oligonucleótido $\beta 2m$.

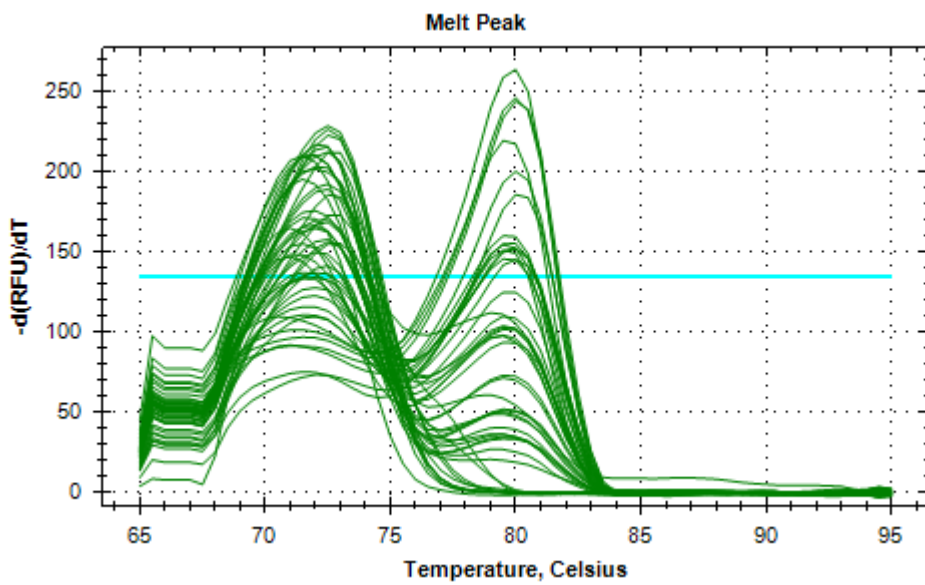


Figura 7. Representación de la temperatura de fusión del oligonucleótido c-Jun.

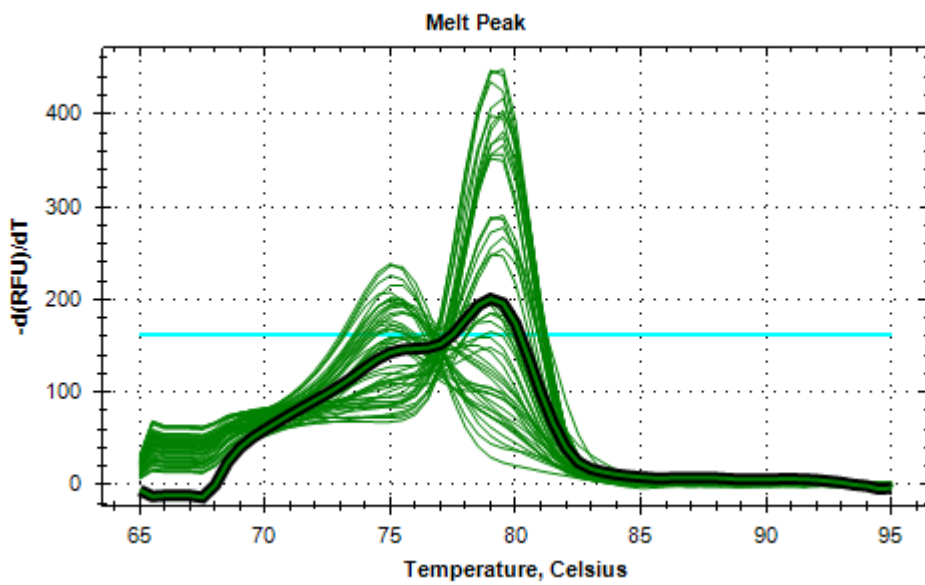


Figura 8. Representación de la temperatura de fusión del oligonucleótido FABP5.

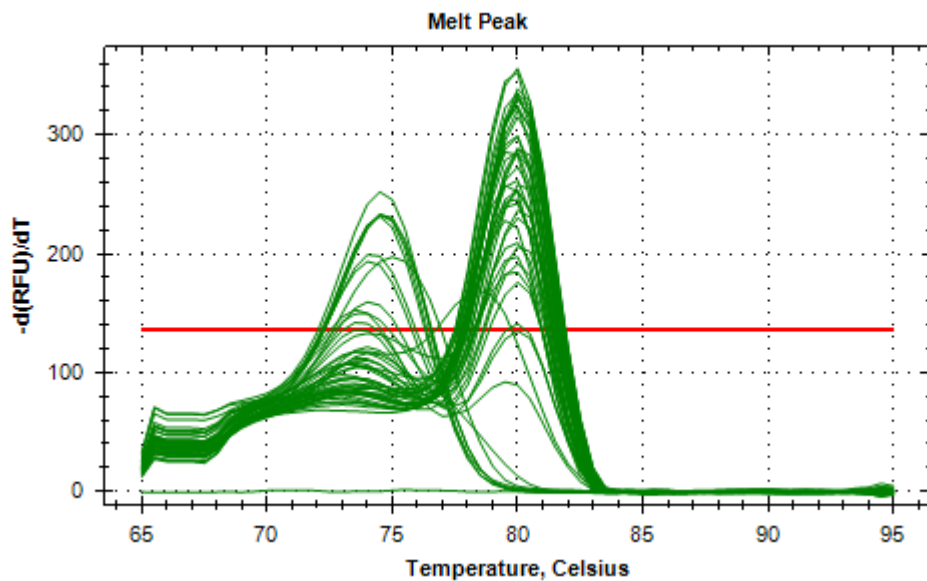


Figura 9. Representación de la temperatura de fusión del oligonucleótido TLR2.

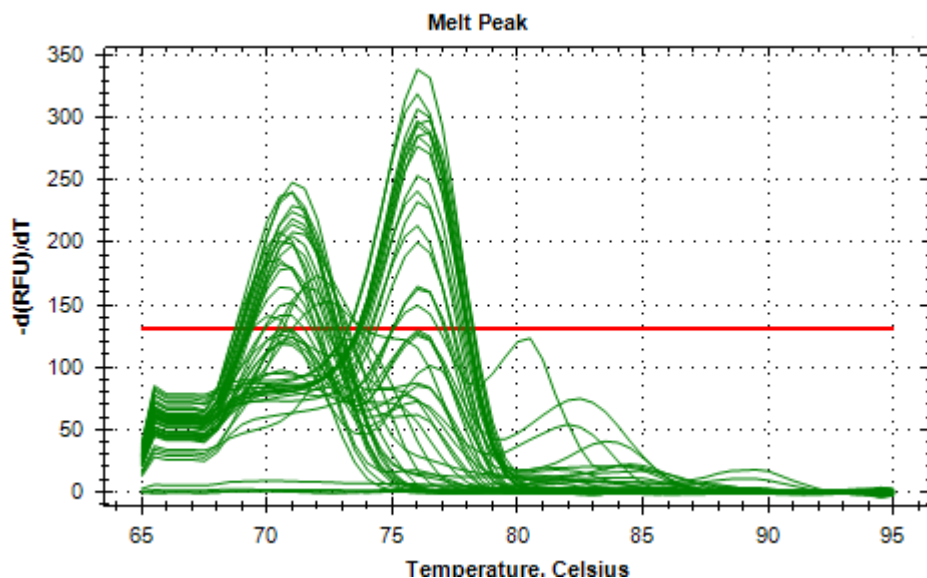


Figura 10. Representación de la temperatura de fusión del oligonucleótido TLR4.

Dados estos primeros resultados se pensó que podía ser provocado por una baja cantidad de muestra, por lo que se modificó el protocolo de la preparación de la RT-qPCR. Aunque en el caso de TLR4 y FABP5 no se repitió la RT-qPCR, ya que los ciclos salieron demasiado tardíos, es decir, no hubo una sobreexpresión, sobre todo en TLR4. Entonces, se hicieron las mezclas de los *primers* TLR2, c-Jun y β 2m sin añadir los 2.6 μ L de agua y en cada pocillo se pusieron únicamente

5.4 μL de la mezcla del primer correspondiente y 4.6 μL de la muestra, con el objetivo de diluir menos la muestra. De esta manera, al volver a realizar la RT-qPCR la T_m era la esperada y no hubo dímeros de oligonucleótidos (Figuras 11-13).

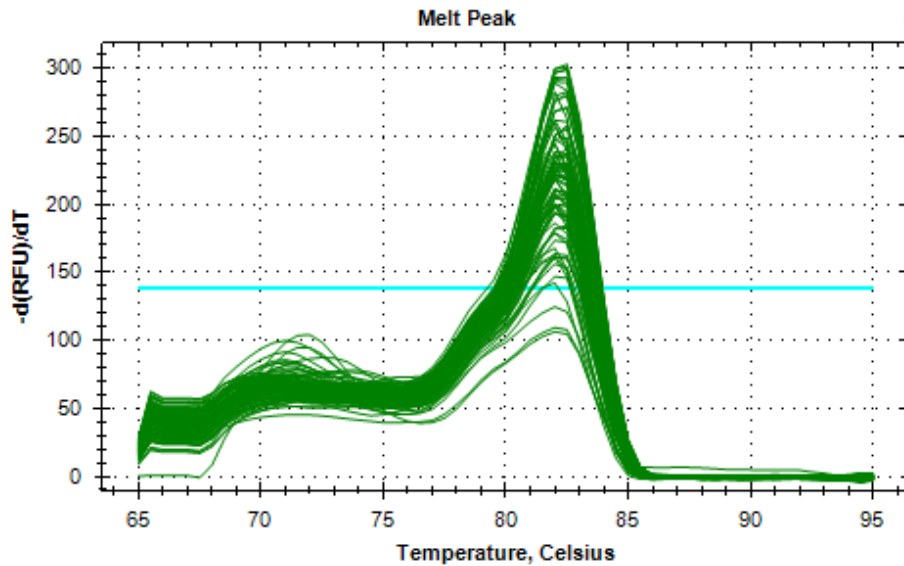


Figura 11. Representación de la temperatura de fusión del oligonucleótido *c-Jun*. Muestras procesadas con el protocolo cambiado.

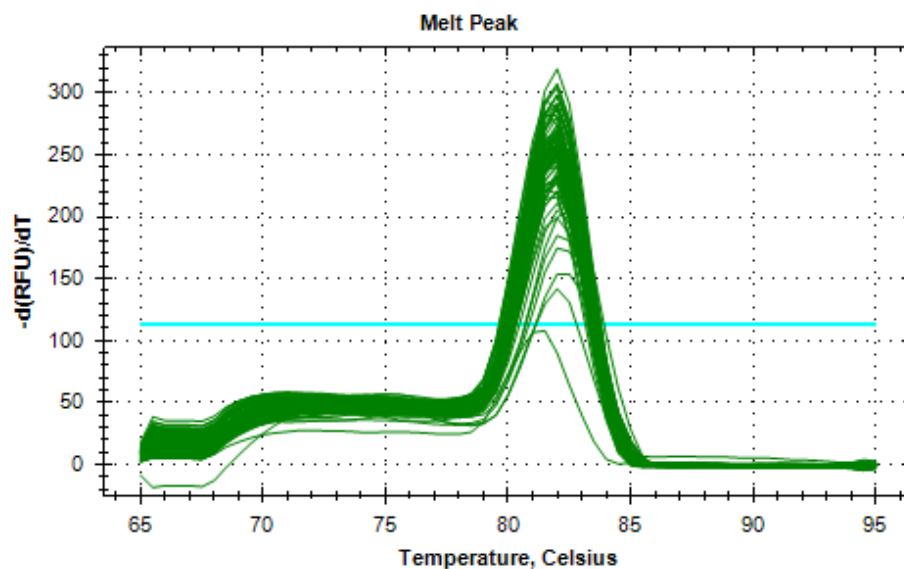


Figura 12. Representación de la temperatura de fusión del oligonucleótido *TLR2*. Muestras procesadas con el protocolo cambiado.

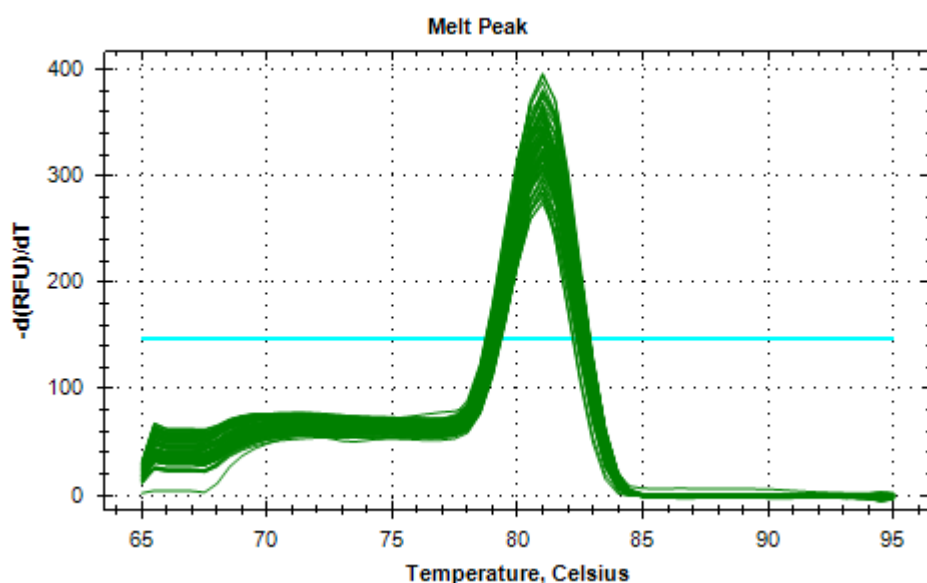


Figura 13. Representación de la temperatura de fusión del oligonucleótido $\beta 2m$. Muestras procesadas con el protocolo cambiado.

Análisis estadístico

Tras la RT-qPCR se analizaron con ANOVA las expresiones relativas de TLR2 y c-Jun en cada grupo. En las tablas 2 y 3 se muestran las medias y SD de las expresiones de TLR2 y c-Jun, respectivamente, obtenidas en cada grupo y de cada tratamiento.

Tabla 2. Medias y desviaciones estándar (SD) de la expresión relativa de TLR2 de cada tratamiento en los grupos no fumadores, EPOC sin ICS y EPOC con ICS. C: control; CP: control con PA; BP: budesonida 1 μM con PA; FP: fluticasona 1 μM con PA.

	No fumadores		EPOC sin ICS		EPOC con ICS	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
C	0.7017	0.4271	0.5682	0.2945	3.041	3.518
CP	1.926	0.9200	0.4791	0.2887	3.741	3.134
BP	2.012	0.6574	1.418	0.9927	2.492	1.918
FP	1.990	0.8011	1.216	0.7345	2.587	2.127

Tabla 3. Medias y desviaciones estándar (SD) de la expresión relativa de c-Jun de cada tratamiento en los grupos no fumadores, EPOC sin ICS y EPOC con ICS. C: control; CP: control con PA; BP: budesonida 1 μ M con PA; FP: fluticasona 1 μ M con PA.

	No fumadores		EPOC sin ICS		EPOC con ICS	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
C	0.8943	0.5651	0.555	0.4384	1.032	0.4594
CP	3.072	2.768	0.7217	0.6783	1.732	1.511
BP	0.4257	0.2190	1.218	1.218	1.512	1.461
FP	0.3786	0.2669	0.7783	0.5672	2.070	2.431

En el caso del grupo no fumadores, por una parte, TLR2 se observó que estaba sobreexpresado de manera significativa en CP en comparación con C (Figura 14A, Tabla 4). Por otra parte, c-Jun también se encontró más expresado significativamente en CP frente a C y, además, la expresión en BP y FP fue menor de manera significativa comparado con CP (Figura 14B, Tabla 4).

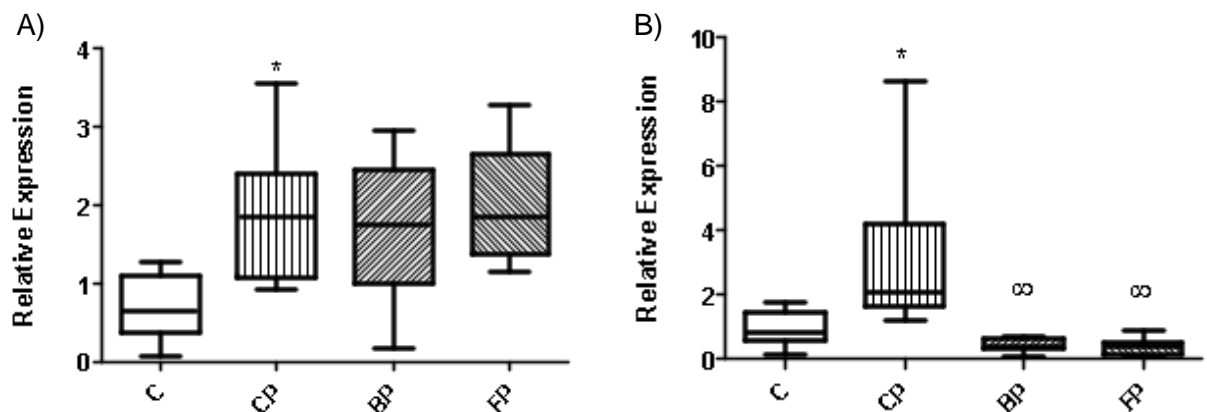


Figura 14. Representación de la expresión relativa de los genes TLR2 (A) y c-Jun (B) en el grupo de no fumadores. C: control; CP: control con PA; BP: budesonida 1 μ M con PA; FP: fluticasona 1 μ M con PA. * $p < 0.05$, $\infty p < 0.05$.

Tabla 4. Nivel de significancia (p-valor) de las expresiones relativas de TLR2 y c-Jun en el grupo no fumadores. Obtenidos por un ANOVA de una vía, test de Bonferroni. C: control; CP: control con PA; BP: budesonida 1 μ M con PA; FP: fluticasona 1 μ M con PA.

	TLR2	c-Jun
C vs. CP	0.0226	0.0373
CP vs. BP	>0.9999	0.0082
CP vs. FP	>0.9999	0.0070

En el caso del grupo EPOC sin ICS se observó una sobreexpresión significativa de TLR2 en BP y FP frente a C y CP (Figura 15A, Tabla 5). En cambio, en la expresión de c-Jun no hubo diferencias significativas entre ningún tratamiento (Figura 15B, Tabla 5).

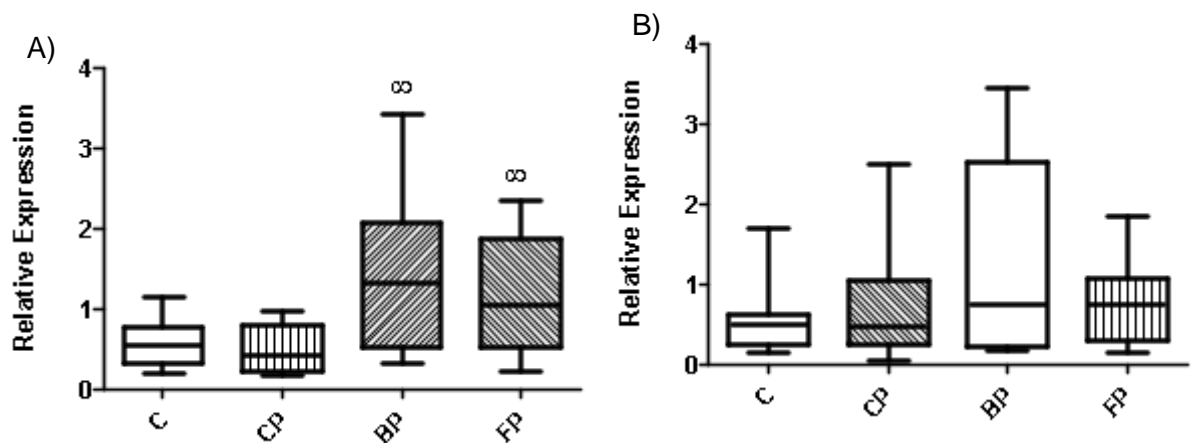


Figura 15. Representación de la expresión relativa de los genes TLR2 (A) y c-Jun (B) en el grupo de EPOC sin ICS. C: control; CP: control con PA; BP: budesonida 1 μ M con PA; FP: fluticasona 1 μ M con PA. ∞ $p < 0.05$.

Tabla 5. Nivel de significancia (p-valor) de las expresiones relativas de TLR2 y c-Jun en el grupo EPOC sin ICS. Obtenidos por un ANOVA de una vía, test de Bonferroni. C: control; CP: control con PA; BP: budesonida 1 μ M con PA; FP: fluticasona 1 μ M con PA.

	TLR2	c-Jun
C vs. CP	>0.9999	>0.9999
CP vs. BP	0.0043	0.4045
CP vs. FP	0.0319	>0.9999

Por último, en el grupo EPOC con ICS no se han obtenido en ningún tratamiento diferencias significativas tanto para TLR2 (Figura 16A) ni c-Jun (Figura 16B) (Tabla 6).

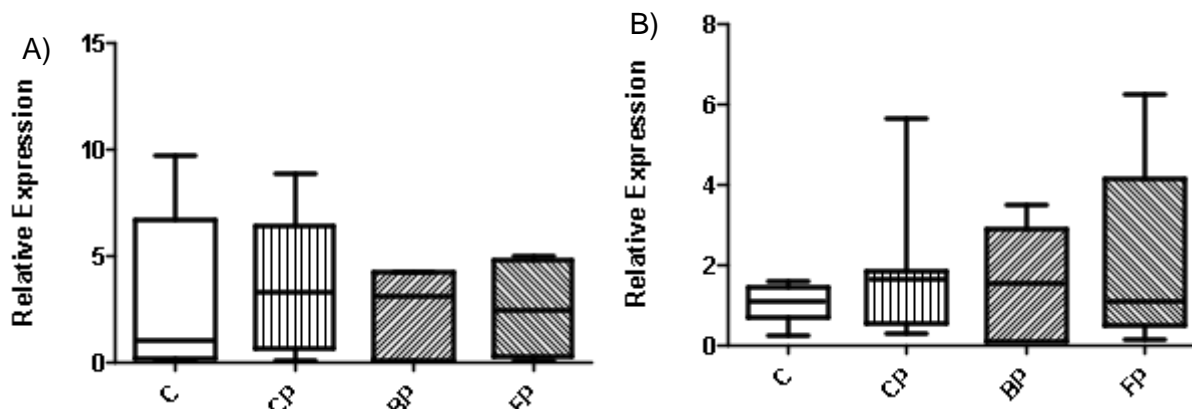


Figura 16. Representación de la expresión relativa de los genes TLR2 (A) y c-Jun (B) en el grupo de EPOC con ICS. C: control; CP: control con PA; BP: budesonida 1 µM con PA; FP: fluticasona 1 µM con PA.

Tabla 6. Nivel de significancia (p-valor) de las expresiones relativas de TLR2 y c-Jun en el grupo EPOC con ICS. Obtenidos por un ANOVA de una vía, test de Bonferroni. C: control; CP: control con PA; BP: budesonida 1 µM con PA; FP: fluticasona 1 µM con PA.

	TLR2	c-Jun
C vs. CP	>0.9999	0.9053
CP vs. BP	>0.9999	>0.9999
CP vs. FP	>0.9999	>0.9999

Discusión

Los macrófagos, neutrófilos y linfocitos son las células más importantes en la patogénesis de la EPOC (Barnes, 2016). Específicamente, los macrófagos son esenciales para la defensa a través de su habilidad para detectar patógenos que puedan atacar a las vías respiratorias y para regular la inmunidad innata y adaptativa (Vlahos & Bozinovski, 2014). Durante las exacerbaciones de la EPOC, a pesar de los efectos beneficiosos de los ICS, se ha visto que están asociados a un mayor riesgo de neumonía, especialmente fluticasona (Festic et al., 2016; Suissa et al., 2013). Se usaron macrófagos aislados de pacientes con EPOC y de no fumadores sin EPOC para investigar el efecto de los corticosteroides sobre las expresiones de los genes TLR2 y c-Jun. Los macrófagos alveolares en

pacientes con EPOC tienen características únicas y son muy diferentes a los macrófagos derivados de otras fuentes, como los de las líneas celulares o los monocitos derivados de la sangre (Lea et al., 2018).

El rol de TLR2 en la patogénesis de la EPOC es controvertido con datos contradictorios en la literatura (Freeman et al., 2013; Pons et al., 2006; Simpson et al., 2013; Von Scheele et al., 2010). Estos datos contradictorios pueden ser debido a diferencias entre las células estudiadas (monocitos de sangre periférica vs. macrófagos), diferentes cohortes de pacientes, potencial especificidad tisular de la expresión de TLR y los modelos experimentales utilizados (exposición aguda vs. exposición crónica) (Higham et al., 2018). Hay dos vías de señalización de TLR según la proteína adaptadora que reclute, MyD88 y TRIF. Ambas proteínas pueden transmitir la señal a través de ubiquitinas ligasas hasta fosforilar p38 MAPK y activarla. Por tanto, esta quinasa activada, a su vez, activa el factor de transcripción AP1 (c-Jun), lo cual conduce a una serie de respuestas celulares relacionadas con la supervivencia celular, la proliferación y la inflamación (Tartey & Takeuchi, 2017).

Por un lado, en el grupo de no fumadores se observó una sobreexpresión de TLR2 tras la infección con PA (CP), por lo que los macrófagos alveolares sanos reconocieron la bacteria, resultado parecido a los obtenidos por Hoppstädter et al. (2019) y Maris et al. (2006). En cambio, las células tratadas con budesonida (BP) y fluticasona (FP) no presentaron diferencias significativas en comparación con CP. Del mismo modo, Ji et al. (2016) vio que en macrófagos alveolares de pacientes sanos incubados con lipopolisacáridos no hubo diferencia significativa entre el control y las células tratadas con budesonida. Además, al igual que TLR2, c-Jun estaba sobreexpresado tras la infección (CP), indicando posiblemente una respuesta de inflamación ante el patógeno. Por el contrario, las células tratadas con los corticosteroides (BP y FP) no expresaron de manera significativa c-Jun, comparándolas con CP, lo cual demuestra la capacidad antiinflamatoria de los corticosteroides al ser inhibidores de AP1 (Rossios et al., 2011). De hecho, estos resultados son similares a los obtenidos anteriormente por el grupo de investigación de la Dra. Amanda Iglesias, cuyo estudio se realizó con una línea de monocitos tratados con budesonida y fluticasona e infectados con la misma cepa de PA (datos no publicados).

Por otro lado, el grupo EPOC sin ICS no presentó diferencias significativas en la expresión de TLR2 entre el control (C) y el control con PA (CP), probablemente debido a una tolerancia a TLR causado por una repetitiva estimulación por ligandos, tal y como describe Lea et al. (2018). Ocurrió todo lo contrario con los macrófagos tratados con los corticosteroides (BP y FP), en los que TLR2 se

observó sobreexpresado en comparación con CP. Ji et al. (2016) obtuvo los mismos resultados tras la estimulación con lipopolisacáridos y budesonida en pacientes con EPOC, lo que sugiere que el sistema inmune respondió ante el patógeno. Asimismo, no se detectaron diferencias significativas en la expresión de c-Jun entre ninguno de los tratamientos. Este resultado indica que estos macrófagos presentaban un problema inflamatorio de base, provocado por la propia EPOC y por la infección por PA, donde los corticosteroides no fueron capaces de disminuir esa inflamación inhibiendo el factor de transcripción AP1, tal y como describió Rossios et al. (2011). Aunque cabe destacar que Wu et al. (2005) demostró que la estimulación repetitiva por PA provocaba una tolerancia a la propia bacteria, habiendo una disminución de AP1, entre otros intermediarios de la vía de señalización.

Finalmente, en el grupo EPOC con ICS no hubo diferencias significativas entre los macrófagos control (C) y los infectados con PA (CP) que, al igual que el anterior grupo, posiblemente causado por una tolerancia a TLR por una repetitiva estimulación (Lea et al., 2018). Además, al contrario que los pacientes sin ICS, en las células de este grupo tratadas con los corticosteroides (BP y FP) no se observaron diferencias significativas en comparación con CP. Teniendo en cuenta que estos macrófagos ya estaban tratados con corticosteroides al realizar el BAL a los pacientes, es posible que hayan creado una tolerancia al uso de este tratamiento. Igualmente, al incubar las células con budesonida y fluticasona aumentó la dosis inicial propia de los pacientes, pudiendo afectar negativamente al reconocimiento del patógeno, cuyo mecanismo se desconoce. De hecho, el grupo de investigación de la Dra. Amanda Iglesias realizó un estudio longitudinal cuyo objetivo fue investigar la relación entre el uso de ICS e infección por PA en pacientes con EPOC con frecuentes exacerbaciones, como neumonía, concluyendo que el factor de riesgo para tener infección por PA no era el uso de ICS sino la dosis de este (datos no publicados). De la misma manera que TLR2, no se observó diferente expresión en c-Jun entre los distintos tratamientos, por lo que al igual en el anterior grupo la budesonida y la fluticasona no redujeron la inflamación y posiblemente los macrófagos presentaban una tolerancia a PA, tal y como describe Wu et al. (2005).

Aunque los resultados obtenidos son interesantes, este estudio presenta diferentes limitaciones que hay que tener en cuenta. Algunos de los resultados obtenidos presentaron una desviación estándar alta, indicando una mayor dispersión de las expresiones de TLR2 y c-Jun en los macrófagos. Esto puede haber sido causado por un tamaño de muestreo pequeño ($n = 37$), por la poca cantidad de macrófagos obtenidos a partir del BAL y por la heterogeneidad propia

de la EPOC, donde cada paciente puede responder de manera diferente a los tratamientos. Además, no se estudió la actividad proteica de c-Jun ni las citoquinas inflamatorias marcadoras de la EPOC para confirmar los resultados obtenidos. Actualmente, este estudio se sigue investigando, por lo que se siguen reclutando pacientes para el análisis de la actividad proteica mediante la técnica de Western Blot, asimismo, las citoquinas se analizaron en el mes de septiembre mediante la técnica ELISA multiplex. Aun así, los resultados demuestran que a pesar del efecto antiinflamatorio que presentan los corticosteroides en pacientes sanos (grupo no fumadores), en pacientes con EPOC no se puede apreciar e incluso los resultados sugieren que la dosis podría afectar de manera crítica a la respuesta de los pacientes con EPOC ante una infección por PA. Aunque para confirmar esta conclusión es necesario realizar futuros estudios en los que se incluyan un mayor número de pacientes y experimentos con diferentes dosis y observar cómo afecta a TLR2 y c-Jun.

Conclusión

Los ICS en pacientes con EPOC tienen beneficios, en los que se reducen las exacerbaciones propias de la enfermedad. A pesar de ello, paralelamente también puede ser un factor de riesgo para padecer infección por PA. Aunque no es el uso de los ICS en sí mismo lo que causa ese factor de riesgo, sino la dosis que se le administra a estos pacientes. De esta manera, cuanto mayor sea la dosis de ICS, mayor será el riesgo de padecer neumonía.

Bibliografía

- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Barnes, P. J. (2016). Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(1), 16-27. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.011>
- Bhat, T. A., Panzica, L., Kalathil, S. G., & Thanavala, Y. (2015). Immune dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Annals of the American Thoracic Society*, 12, S169-S175. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201503-126AW>
- Cosío, B. G., Jahn, A., Iglesias, A., Shafiek, H., Busquets, X., & Agustí, A. (2015). Haemophilus influenzae induces steroid-resistant inflammatory responses in COPD. *BMC Pulmonary Medicine*, 15(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12890-015-0155-3>
- Crespo-Lessmann, A., Juárez-Rubio, C., & Plaza-Moral, V. (2010). Role of Toll-Like Receptors in Respiratory Diseases. En *Archivos de Bronconeumología* (Vol. 46, Número 3, pp. 135-142). [https://doi.org/10.1016/S1579-2129\(10\)70034-3](https://doi.org/10.1016/S1579-2129(10)70034-3)
- Faure, E., Kwong, K., & Nguyen, D. (2018). Pseudomonas aeruginosa in Chronic Lung Infections: How to Adapt Within the Host? *Frontiers in Immunology*, 9(OCT), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02416>
- Festic, E., Bansal, V., Gupta, E., & Scanlon, P. D. (2016). Association of Inhaled Corticosteroids with Incident Pneumonia and Mortality in COPD Patients; Systematic Review and Meta-Analysis. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 13(3), 312-326. <https://doi.org/10.3109/15412555.2015.1081162>
- Fitzgerald, K. A., & Kagan, J. C. (2020). Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*, 180(6), 1044-1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041>
- Freeman, C. M., Martinez, F. J., Han, M. L. K., Washko, G. R., McCubbrey, A. L., Chensue, S. W., Arenberg, D. A., Meldrum, C. A., McCloskey, L., & Curtis, J. L. (2013). Lung CD8+ T cells in COPD have increased expression of bacterial TLRs. *Respiratory Research*, 14(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-14-13>

- Furuhashi, M., & Hotamisligil, G. S. (2008). Fatty acid-binding proteins: Role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(6), 489-503. <https://doi.org/10.1038/nrd2589>
- GOLD committee. (2021). *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. 2021 report.* https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2020/11/GOLD-REPORT-2021-v1.1-25Nov20_WMV.pdf
- Higham, A., Karur, P., Jackson, N., Cunoosamy, D. M., Jansson, P., & Singh, D. (2018). Differential anti-inflammatory effects of budesonide and a p38 MAPK inhibitor AZD7624 on COPD pulmonary cells. *International Journal of COPD*, 13, 1279-1288. <https://doi.org/10.2147/COPD.S159936>
- Hoppstädter, J., Dembek, A., Linnenberger, R., Dahlem, C., Barghash, A., Fecher-Trost, C., Fuhrmann, G., Koch, M., Kraegeloh, A., Huwer, H., & Kiemer, A. K. (2019). Toll-Like Receptor 2 Release by Macrophages: An Anti-inflammatory Program Induced by Glucocorticoids and Lipopolysaccharide. *Frontiers in immunology*, 10(July), 1634. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01634>
- Itoh, M., Tsuji, T., Nemoto, K., Nakamura, H., & Aoshiba, K. (2013). Undernutrition in patients with COPD and its treatment. *Nutrients*, 5(4), 1316-1335. <https://doi.org/10.3390/nu5041316>
- Ji, J., von Schéele, I., Billing, B., Dahlén, B., Lantz, A. S., Larsson, K., & Palmberg, L. (2016). Effects of budesonide on toll-like receptor expression in alveolar macrophages from smokers with and without COPD. *International Journal of COPD*, 11(1), 1035-1043. <https://doi.org/10.2147/COPD.S102668>
- Kawai, T., & Akira, S. (2007). TLR signaling. *Seminars in Immunology*, 19(1), 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.12.004>
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5), 373-384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>
- Lea, S. R., Reynolds, S. L., Kaur, M., Simpson, K. D., Hall, S. R., Hessel, E. M., & Singh, D. (2018). The effects of repeated Toll-like receptors 2 and 4 stimulation in COPD alveolar macrophages. *International Journal of COPD*, 13, 771-780. <https://doi.org/10.2147/COPD.S97071>

- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S. Y., AlMazroa, M. A., Alvarado, M., Anderson, H. R., Anderson, L. M., Andrews, K. G., Atkinson, C., Baddour, L. M., Barker-Collo, S., Bartels, D. H., ... Murray, C. J. L. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380(9859), 2095-2128. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0)
- Maris, N. A., Dessing, M. C., de Vos, A. F., Bresser, P., van der Zee, J. S., Jansen, H. M., Spek, C. A., & van der Poll, T. (2006). Toll-like receptor mRNA levels in alveolar macrophages after inhalation of endotoxin. *European Respiratory Journal*, 28(3), 622-626. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00010806>
- Mclsaac, S. M., Stadnyk, A. W., & Lin, T.-J. (2012). Toll-like receptors in the host defense against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection and cystic fibrosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 92(5), 977-985. <https://doi.org/10.1189/jlb.0811410>
- Perera, W. R., Hurst, J. R., Wilkinson, T. M. A., Sapsford, R. J., Müllerova, H., Donaldson, G. C., & Wedzicha, J. A. (2007). Inflammatory changes, recovery and recurrence at COPD exacerbation. *European Respiratory Journal*, 29(3), 527-534. <https://doi.org/10.1183/09031936.00092506>
- Pons, J., Sauleda, J., Regueiro, V., Santos, C., López, M., Ferrer, J., Agustí, A. G. N., & Bengoechea, J. A. (2006). Expression of Toll-like receptor 2 is up-regulated in monocytes from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research*, 7, 1-9. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-7-64>
- Raoust, E., Balloy, V., Garcia-Verdugo, I., Touqui, L., Ramphal, R., & Chignard, M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. *PLoS ONE*, 4(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007259>
- Rossios, C., To, Y., To, M., Ito, M., Barnes, P. J., Adcock, I. M., Johnson, M., & Ito, K. (2011). Long-acting fluticasone furoate has a superior pharmacological profile to fluticasone propionate in human respiratory cells. *European Journal of Pharmacology*, 670(1), 244-251. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.08.022>

- Salvi, S. S., & Barnes, P. J. (2009). Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *The Lancet*, 374(9691), 733-743. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61303-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61303-9)
- Simpson, J. L., McDonald, V. M., Baines, K. J., Oreo, K. M., Wang, F., Hansbro, P. M., & Gibson, P. G. (2013). Influence of age, past smoking, and disease severity on tlr2, neutrophilic inflammation, and MMP-9 Levels in COPD. *Mediators of Inflammation*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/462934>
- Strategy, G., Obstructive, C., & Disease, P. (2017). GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) 2017. En *Pneumologie* (Vol. 71, Número 01). <https://doi.org/10.1055/s-0042-121903>
- Su, S. B., Tao, L., Deng, Z. P., Chen, W., Qin, S. Y., & Jiang, H. X. (2021). TLR10: Insights, controversies and potential utility as a therapeutic target. *Scandinavian Journal of Immunology*, 93(4), 1-15. <https://doi.org/10.1111/sji.12988>
- Suissa, S., Patenaude, V., Lapi, F., & Ernst, P. (2013). Inhaled corticosteroids in COPD and the risk of serious pneumonia. *Thorax*, 68(11), 1029-1036. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-202872>
- Tartey, S., & Takeuchi, O. (2017). Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. *International Reviews of Immunology*, 36(2), 57-73. <https://doi.org/10.1080/08830185.2016.1261318>
- Vidya, M. K., Kumar, V. G., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., & Bhatta, R. (2018). Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *International Reviews of Immunology*, 37(1), 20-36. <https://doi.org/10.1080/08830185.2017.1380200>
- Vlahos, R., & Bozinovski, S. (2014). Role of alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *Frontiers in Immunology*, 5(SEP), 1-7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00435>
- Vogelmeier, C. F., Román-Rodríguez, M., Singh, D., Han, M. L. K., Rodríguez-Roisin, R., & Ferguson, G. T. (2020). Goals of COPD treatment: Focus on symptoms and exacerbations. *Respiratory Medicine*, 166(February). <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.105938>
- Von Scheele, I., Larsson, K., & Palmberg, L. (2010). Budesonide enhances Toll-like receptor 2 expression in activated bronchial epithelial cells. *Inhalation*

Toxicology, 22(6), 493-499. <https://doi.org/10.3109/08958370903521216>

Wagner, C., Goldmann, T., Rohmann, K., Rupp, J., Marwitz, S., Rotta Detto Loria, J., Limmer, S., Zabel, P., Dalhoff, K., & Drömann, D. (2015). Budesonide Inhibits Intracellular Infection with Non-Typeable *Haemophilus influenzae* despite Its Anti-Inflammatory Effects in Respiratory Cells and Human Lung Tissue: A Role for p38 MAP Kinase. *Respiration*, 90(5), 416-425. <https://doi.org/10.1159/000439226>

World Health Organization. (2020, 9 diciembre). *The top 10 causes of death*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

Wu, Q., Lu, Z., Verghese, M. W., & Randell, S. H. (2005). Airway epithelial cell tolerance to *Pseudomonas aeruginosa*. *Respiratory Research*, 6, 1-16. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-26>