



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Determinación de la respuesta de IL-6 en células
epiteliales infectadas por secuenciales crónicos de
Pseudomonas aeruginosa.**

Alicia Marqués Prieto

Grado en Biología

Año académico 2014-2015

DNI de l'alumne: 43204505V

Treball tutelat per Sebastián Alberti Serrano
Departament de Biologia

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:
Pseudomona aeruginosa, Fibrosis quística (FQ), IL-6, infecció crònica

Índice

1. Abstract/Resumen	4
2. Introducción	5
2.1 Características generales de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
2.2 Importancia clínica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
2.3 Infecciones respiratorias crónicas causadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
2.4 Fibrosis quística	
2.5 Principales factores de virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
2.6 Adaptaciones de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> al desarrollo de infecciones crónicas	
3. Objetivo	14
4. Materiales y métodos	14
4.1 Obtención cepas bacterianas	
4.2 Cultivo celular	
4.3 Preparación de <i>P.aeruginosa</i>	
4.4 Determinación de la producción de IL-6 en células epiteliales IB3-1	
5. Resultados y discusión.....	18
6. Conclusiones	24
7. Referencias	25

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is the principal cause of respiratory chronic infections in humans. During the development of chronic infection the bacteria tends to lose virulence factors, to acquire mucoid morphology and resistance to antibiotics. All of that is needed in order to get a better adaptation to the lung's conditions. IB3-1 cultured cells with cystic fibrosis (CF) were infected with isolates of *P.aeruginosa* from others 9 patients with cystic fibrosis. An initial isolated and a late isolated from each patient were used. About 45% of late isolates of *P.aeruginosa* reduced the liberation of IL-6 by IB3-1 cells in comparison with initial isolates. These results suggest that for *P.aeruginosa* strains it is common to accumulate different mutations, such as the loss of virulence factors, and that allow them to adapt better in lungs with CF. These mutations cause a decrease of the bacteria's immunostimulatory capacity, thus *P.aeruginosa* achieves to remain unrecognised and not being attacked by the immune system.

Resumen

Pseudomonas aeruginosa es la principal causa de las infecciones crónicas respiratorias en humanos. Durante el desarrollo de la infección crónica la bacteria suele perder sus factores de virulencia, adquirir una morfología mucoide y una resistencia a antibióticos, consiguiendo una mejor adaptación a las condiciones del pulmón. Se cultivaron células IB3-1 procedentes de personas con fibrosis quística (FQ), dichas células fueron infectadas con aislados de *P.aeruginosa* obtenidos de otros 9 pacientes con FQ. Para cada paciente se utilizó un aislado inicial y uno tardío. Aproximadamente, un 45% de los aislados tardíos de *P.aeruginosa* redujeron la liberación de IL-6 por parte de las células IB3-1, en comparación con los aislados iniciales. Estos resultados sugieren que es habitual que las cepas de *P.aeruginosa* acumulen diferentes mutaciones, como la pérdida de factores de virulencia, que les permiten adaptarse mejor al pulmón con FQ. Estas mutaciones provocan una disminución de la capacidad inmunoestimuladora de la bacteria, de forma que *P.aeruginosa* consigue pasar desapercibida y no ser atacada por el sistema inmune.

2. Introducción

2.1 Características generales de *Pseudomona aeruginosa*

El género *Pseudomonas*, pertenece a la familia *Pseudomonaceae* y se sitúa dentro del orden *Pseudomonadales* (Kerstens et al. 1996).

Muchas especies del género *Pseudomonas* son patógenas, tanto de plantas como de animales. El representante más importante es *P.aeruginosa*, frecuentemente asociada a infecciones del tracto respiratorio en humanos. Sin embargo, no es un parásito estricto, sino un oportunista, iniciando la infección cuando el individuo se encuentra inmunodeprimido (Sadikot et al. 2005).

Pseudomona aeruginosa es un bacilo recto o curvado, Gram negativo, su tamaño varía entre 1.5-4 μm de longitud y entre 0.5-1 μm de diámetro. Es una especie con gran movilidad ya que suele presentar un flagelo polar, aunque algunas veces se han encontrado casos en los que la bacteria posee más de un flagelo polar. Además, es una bacteria que no forma esporas y no presenta vaina (Madigan et al. 2003).

Las colonias de *P.aeruginosa* suelen ser extensas y aplanadas, con los bordes serrados. Estas morfologías coloniales pueden variar en el caso de que sean aislados de enfermedades crónicas, como veremos más adelante (Kirisits et al. 2005).

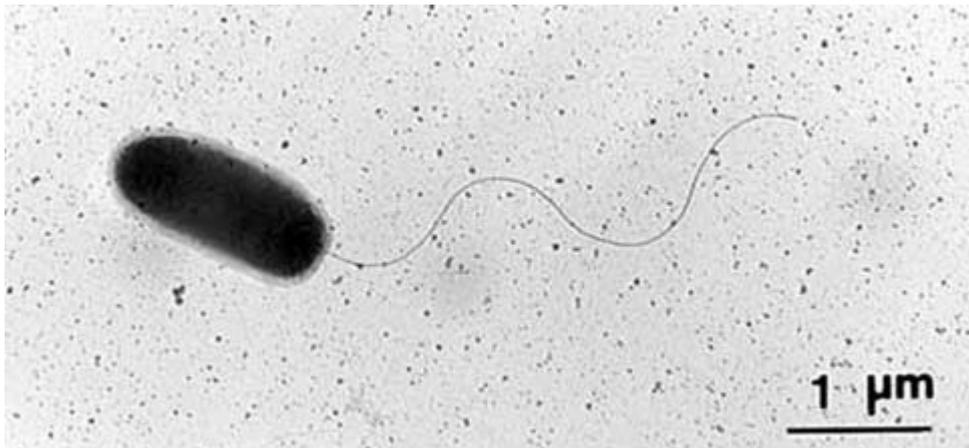


Figura 1: *Pseudomona aeruginosa* observada con un microscopio electrónico, donde se puede observar el flagelo polar.

P.aeruginosa es una bacteria aeróbica estricta, es decir, que utiliza el oxígeno como aceptor final de electrones, aunque también puede utilizar otras moléculas cuando el oxígeno es limitante, como por ejemplo nitratos. También se ha observado un crecimiento anaeróbico que implica la formación de biofilms (Van Alst et al. 2007), que será comentado en apartados posteriores. *Pseudomona aeruginosa* es una bacteria catalasa y oxidasa positiva y, no fermentadora de la lactosa (Madigan et al. 2003).

Diversas especies del género *Pseudomonas* presentan una característica muy importante: la presencia de pigmentos fluorescentes. Junto a *P.aeruginosa* hay otras especies que presentan estos pigmentos, como *P. chlororaphis*, *P.fluorescens*, *P.putida* o *P.syringae*. La mayoría de especies de *Pseudomonas* tienen un pigmento llamado pioverdina, que confiere una coloración amarillenta bajo luz ultra violeta (Meyer. 2000). *P.aeruginosa* además de pioverdina, tiene otros pigmentos fluorescentes como la piocianina, que se combina con la pioverdina y da una coloración verde brillante; otro pigmento es la piourubina que tiene una coloración rojiza, o también la piomelanina que presenta un color marrón.

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria con requerimientos nutritivos muy simples y crece quimioorganotróficamente a pH neutro en un rango mesofílico de temperaturas. La temperatura óptima para el crecimiento es de 37°C, aunque se ha observado que puede crecer a 42°C pero nunca por debajo de los 4°C (Madigan et al. 2003).

P.aeruginosa presenta unos requerimientos para su crecimiento muy simples y, además, tiene un amplio rango de temperatura en el cual puede crecer. Por esta razón, encontramos cepas de *P.aeruginosa* en gran cantidad de ambientes distintos, como pueden ser acuáticos o terrestres, o también, en tejidos de animales y plantas (Romling et al. 1994).

Esta bacteria tiene la capacidad de sobrevivir en ambientes acuosos, por esta razón es muy importante controlar las infecciones intrahospitalarias o también llamadas infecciones nosocomiales. Supone un gran problema ya que se han encontrado aislados de *Pseudomonas aeruginosa* en desinfectantes, colirios, diálisis y varios aparatos hospitalarios como, por ejemplo catéteres; la mayoría de cepas aisladas de infecciones nosocomiales son resistentes a antibióticos lo que agrava el tratamiento de la infección en los hospitales (Levin et al. 1999).

Como se ha comentado anteriormente *Pseudomonas aeruginosa* se encuentra en tejidos animales y vegetales; en humanos se encuentra en zonas húmedas como pueden ser fosas nasales, orofaringe y otras estructuras del aparato respiratorio. También se pueden encontrar cepas en el oído, axilas y perineo (Trinidad et al. 2007; Freud et al. 1999).

En personas sanas también se pueden encontrar cepas de *P. aeruginosa* pero solo causan enfermedades severas en el caso de que la persona tenga el sistema inmunológico deprimido, como es el caso de pacientes con SIDA o personas que han pasado una larga estancia en un hospital o que hayan sido sometidas a quimioterapia (Sadikot et al. 2005).

2.2 Importancia clínica de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria que coloniza muchos medios, incluyendo tejidos, por ello, tiene una gran importancia en el campo de la medicina ya que causa multitud de patologías. Las infecciones originadas por esta bacteria causan una alta mortalidad, ya que éstas presentan resistencia a la mayoría de antibióticos que se utilizan hoy en día.

Como se ha mencionado en el apartado anterior, la bacteria puede alojarse en el pabellón auditivo de animales y humanos causando la inflamación de éste. A su vez, si la infección se prolonga durante varios años el paciente puede desarrollar una otitis crónica (Trinidad et al. 2007).

La bacteria coloniza hábitats acuosos como pueden ser tejidos oculares, donde causa inflamaciones. Esta infección puede surgir por la utilización de lentes de contacto o colirios. Se ha comprobado que este tipo de infecciones oculares afecta de manera más severa a personas de la tercera edad o a recién nacidos que a personas más jóvenes (Hazlett et al. 1977).

La infección es uno de los mayores problemas en pacientes con quemaduras o heridas graves, la infección por *Pseudomona aeruginosa* causa entre el 40-50% de las muertes de estos pacientes (Estahbanati et al. 2002).

Una de las infecciones nosocomiales más frecuentes es la bacteriuria: la presencia de bacterias en la orina. Esta infección puede ser producida por la utilización de catéteres o stents (endoprótesis vascular) en los hospitales (Niveditha et al. 2012).

La bacteriemia, presencia de bacterias en la sangre, es otra de las infecciones nosocomiales más importantes y preocupantes, ya que muchas de las infecciones desarrollan neumonía o sepsis. En los casos de bacteriuria y bacteriemia es muy difícil distinguir qué bacteria Gram negativa está causando la infección y encontrar el tratamiento adecuado (Kang et al. 2002).

En este trabajo se van a tratar las infecciones del aparato respiratorio causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Se pueden encontrar casos de neumonía adquirida en hospitales por el uso ventilación mecánica, ya que actúa como medio para la entrada del patógeno en el aparato respiratorio del paciente (Lynch. 2001), aparte de múltiples infecciones crónicas que serán explicadas en el próximo apartado.

2.3 Infecciones respiratorias crónicas causadas por *Pseudomona aeruginosa*

P. aeruginosa es una de las principales causas de las infecciones respiratorias crónicas, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquiectasis y fibrosis quística (FQ). En estas enfermedades la bacteria se aloja en los conductos alveolares, causando una infección severa en la mayoría de casos (Murphy et al. 2008).

En pacientes afectados por FQ, *P.aeruginosa* coloniza la parte inferior del árbol respiratorio, lugar ideal para la supervivencia y el crecimiento de la bacteria. De esta manera, la infección se vuelve más severa y es muy difícil eliminar la bacteria (Gómez et al. 2007).

2.4 Fibrosis quística (FQ)

La fibrosis quística es una de las enfermedades que más afecta a la población Caucásica, se estima que en el mundo afecta a una de cada 3000 personas. En el caso de España afecta a 1/2500 de personas.

La FQ es una enfermedad autosómica recesiva que resulta de las mutaciones del gen que codifica la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis (CFTR). La mutación de dicho gen provoca que las células epiteliales secreten una mucosidad más densa y viscosa. Por tanto, esto conlleva una inflamación de las vías respiratorias y una dificultad respiratoria (Hart et al. 2002).

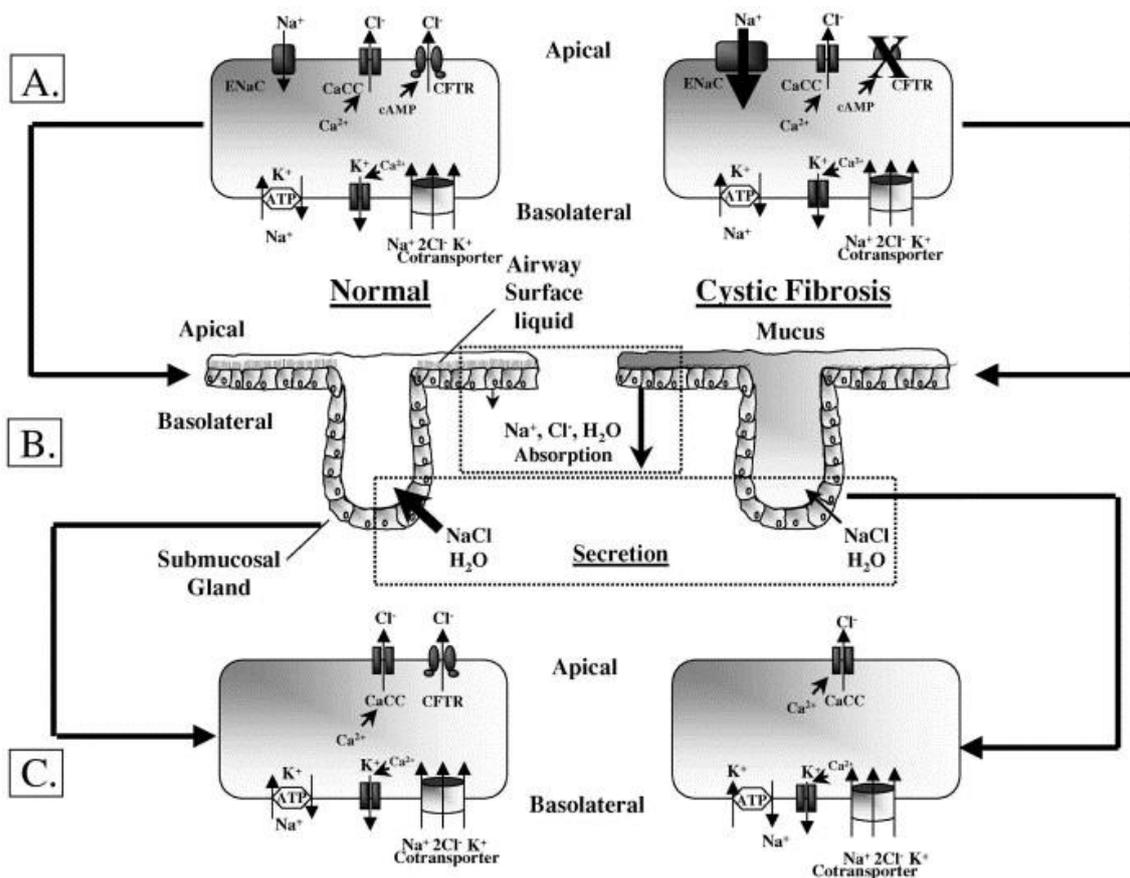


Figura 2: Representación esquemática comparando la producción de moco en un individuo sano (izquierda) y otro con FQ (derecha). El modelo representa el transporte de iones de las células epiteliales del pulmón. Los pacientes con FQ tienen una mutación en el gen CFTR que produce un aumento de la absorción de sodio y cloro provocando una disminución de la cantidad de agua en la superficie respiratoria y una mucosidad más espesa. Esta capa de moco más densa y espesa proporciona una ambiente ideal para el crecimiento de *P.aeruginosa* (Hasset et al. 2002).

La función principal del gen CFTR es el transporte de Cl^- , Na^+ y agua en las células epiteliales, cuando existe una mutación en dicho gen se produce una reabsorción de Na^+ y Cl^- que conlleva la deshidratación de las células epiteliales de la zona afectada, y por tanto el moco se vuelve muy espeso y se convierte en un lugar idóneo para la colonización microbiana, donde se pueden encontrar entre otras bacterias *Pseudomonas aeruginosa*. Al ser un lugar idóneo para las bacterias, el paciente puede llegar a padecer una infección crónica. Los síntomas de la enfermedad se agravan, ya que las bacterias, una vez han colonizado la zona secretan diversas sustancias que modifican el moco producido por las células epiteliales, haciéndolo aún más denso y viscoso (Hasset et al. 2002).

La función principal del moco en un epitelio normal es formar una barrera antimicrobiana, este moco está formado por mucopolisacáridos y compuestos serosos en una cantidad característica, por ello, cuando la composición se ve afectada, como es en el caso de pacientes con FQ, se convierte un medio ideal para la colonización microbiana.

2.5 Principales factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*

P.aeruginosa posee una gran cantidad de factores de virulencia y otros sistemas que le permiten realizar las infecciones descritas en los apartados anteriores. En la figura 3, se presenta un resumen de los diferentes factores de virulencia de *P.aeruginosa* entre los que destacan:

Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*

Factores de virulencia de superficie

Lipopolisacárido (LPS), flagelo, pili.

Alginato

Sistemas de excreción proteínica

Tipo I

Tipo II exotoxina A

Tipo III Exo T, Exo S, Exo Y

Sistema *quorum sensing*

Otros factores de virulencia

Captadores de hierro, catalasa, proteasas, piocinanina

Figura 3: Tabla resumen de los principales factores de virulencia de P.aeruginosa

1. Factores de virulencia de superficie: la bacteria posee 3 tipos de adhesinas (flagelos, pili y LPS). Por su importancia, el papel del alginato se explicará posteriormente de manera más específica. El flagelo y el pili son estructuras indispensables para que se produzca la infección, ya que, gracias a ellos la bacteria se adhiere al organismo y le permite introducirse y moverse dentro del cuerpo. Estas dos estructuras contienen elastasa, proteína cuya función es la de degradar otras proteínas de la barrera defensiva del hospedador (Lyczak et al. 2000). También cabe destacar la función del lipopolisacárido (LPS) como factor de virulencia, ya que estimula la producción de diversas proteínas por parte de las células epiteliales de las vías respiratorias aumentando la producción de moco (Li et al. 1997).
2. Sistemas de excreción proteica: *P.aeruginosa* posee 3 sistemas de excreción de proteínas (Tipo I, II y III), siendo el más virulento el sistema tipo III. Éste secreta las toxinas Exo T, Exo S y Exo Y, que están implicadas en la activación de las respuestas del sistema inmune del hospedador (Hornef, MW et al. 2000). Otra toxina importante de *P.aeruginosa* es la exotoxina A producida por el sistema tipo II (Roy-Burman et al. 2001).
3. Sistema quorum sensing (QS): este sistema permite la comunicación celular, regulando la expresión génica de la comunidad bacteriana. El QS permite activar otros factores de virulencia cuando el sistema inmunológico del hospedador ataca a la comunidad bacteriana. Se ha comprobado que *P.aeruginosa* posee dos QS en casos de FQ, LasR-Las-I y RhIR-RhII (Hentzer et al. 2003).

Dentro de los factores de virulencia de *P.aeruginosa* cabe destacar la producción de alginato en determinadas ocasiones. El alginato es un polímero lineal formado por ácido manurónico y gulurónico; es un líquido de aspecto viscoso que cuando la bacteria lo secreta forma una película protectora alrededor de ella.

El alginato tiene una función muy importante en el proceso de infección por parte de *P.aeruginosa*, ya que protege a la bacteria frente a las diferentes respuestas del sistema inmune del hospedador, como puede ser la fagocitosis por parte de los neutrófilos. Se ha comprobado que la producción de alginato influye de forma positiva en la formación de biofilms.

En el caso de FQ, las cepas bacterianas obtienen una morfología mucosa, que les permite adherirse a una superficie sólida, en este caso el epitelio pulmonar y, de esta manera, formar el biofilm. Este cambio de morfología se produce gracias a la comunicación celular que confiere el biofilm, es decir, el quorum-sensing. Se transmite información y las cepas expresan genes que aumentan la producción de alginato (Hentzer et al. 2001; Boyd et al. 1994).

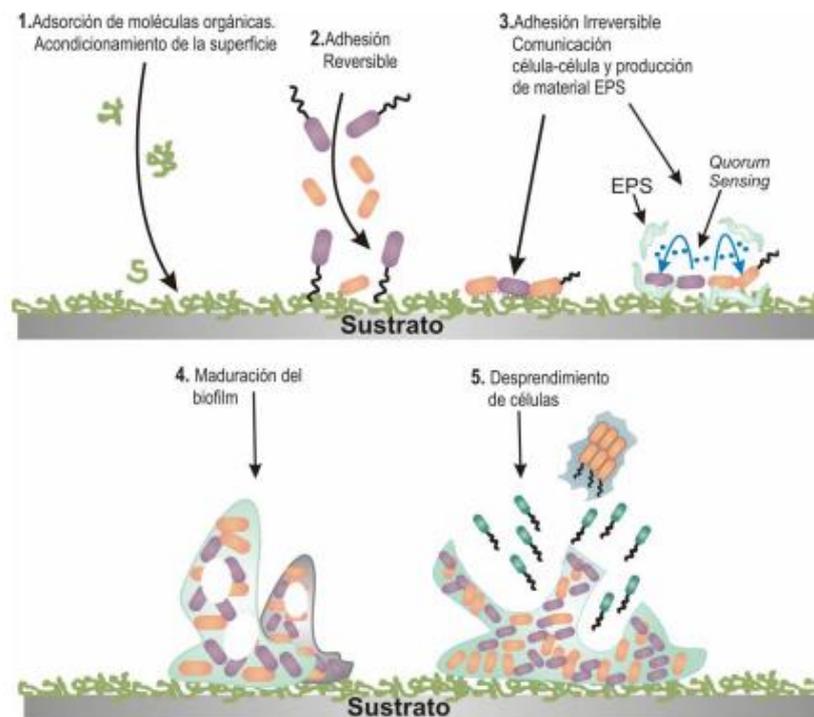


Figura 4: Representación de los pasos de la formación de biofilms por *P.aeruginosa* sobre un epitelio. (1) Acondicionamiento del sustrato, (2) Adhesión de las bacterias planctónicas, es decir con natación, (3) Fijación de las bacterias gracias a los flagelos y pili; pérdida del flagelo y producción de exopolisacáridos (EPS); inicio de la comunicación QS, (4) Maduración del biofilm, (5) Algún tipo de perturbación permite a una bacteria que sintetice un nuevo flagelo y migre a un nuevo ambiente para colonizar.

En resumen, la formación de biofilms es un factor clave para la infección y colonización de las vías respiratorias por *P.aeruginosa*. En la figura 4 se observa como todos los factores de virulencia mencionados en este apartado se relacionan con la finalidad de que la bacteria pueda colonizar el medio y sobrevivir, intentando evadir la respuesta inmune del hospedador.

Las ventajas de formar un biofilm son múltiples: facilidad para la interacción metabólica entre las células, proximidad física, incremento de la transferencia de genes y protección frente otras bacterias y sustancias antimicrobianas (Kirisits et al. 2005).

2.6 Adaptaciones de *Pseudomonas aeruginosa* al desarrollo de infecciones crónicas

P.aeruginosa entra en las vías respiratorias de una persona y coloniza el medio, estas infecciones suelen ser puntuales y llevan consigo molestos síntomas. Si estas infecciones puntuales se prolongan durante un largo tiempo la infección se vuelve crónica y es prácticamente imposible erradicar la bacteria. Durante este proceso *P.aeruginosa* sufre cambios genéticos y fisiológicos que le permiten sobrevivir durante años en las vías respiratorias (Sousa et al.2014). Algunos de estos cambios se observan en la Figura 5. A continuación se destacarán los cambios más importantes:

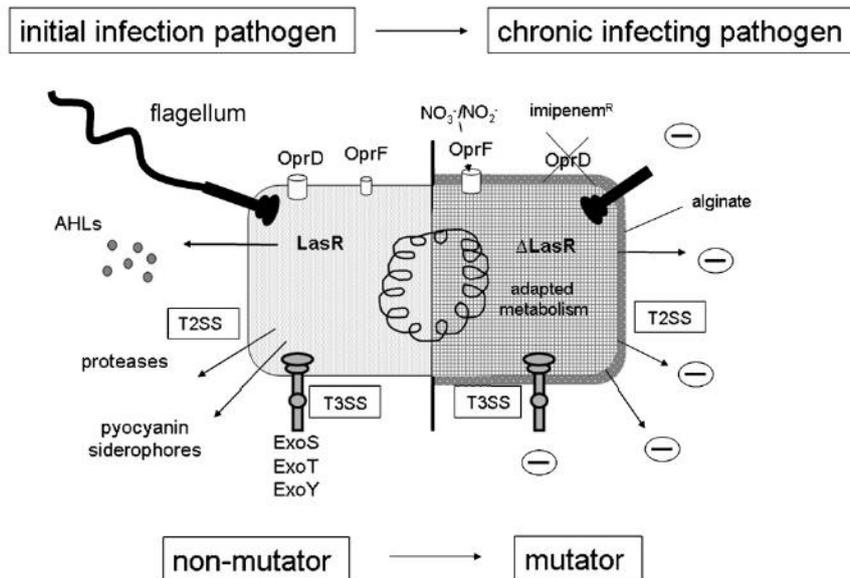


Figura 5: Representación de las diferentes adaptaciones de *P.aeruginosa* durante el desarrollo de una infección crónica. En la etapa inicial, *P.aeruginosa* presenta todos los factores de virulencia necesarios para la infección (flagelo, pili, sistemas de secreción, etc.). En el momento en que la infección es crónica *P.aeruginosa* sufre una serie de cambios genotípicos y fisiológicos, entre ellos podemos encontrar una pérdida de factores de virulencia, un aumento de la producción de alginato, resistencia a antibióticos con la finalidad de adaptarse a las condiciones del pulmón del individuo (Hogardt et al. 2010).

Una de las adaptaciones más importantes de *P.aeruginosa* es la formación de biofilms, las bacterias pasan de vivir suspendidas en un medio acuoso a formar una comunidad microbiana sobre un sustrato. En una infección crónica, la bacteria debe competir con otros microorganismos de su misma especie o de distinta especie para poder sobrevivir, por ello, sólo sobreviven las bacterias mejor adaptadas; los biofilms tienen la función de reservorio de los genotipos mejor adaptados (Sousa et al.2014).

Por tanto, durante la infección crónica se observa una adaptación genética, es decir, la aparición de mutaciones que hacen que *P.aeruginosa* pueda pasar desapercibida frente al sistema inmune del hospedador y pueda adaptarse al medio, en este caso al pulmón del paciente. Dentro de estas mutaciones se pueden encontrar:

- **Cambios en la morfología de la bacteria colonial:** la inactivación del gen muc A hace que la bacteria produzca una gran cantidad de alginato, dando un aspecto mucoso a su morfología (Hogardt et al. 2010).
- **Cambios en la morfología colonial:** las colonias bacterianas se vuelven más pequeñas y puntiformes, llamadas SCV (small colony variants). Estas colonias tienen un crecimiento más lento que las demás cepas, ya que se encuentran formando biofilms. Esta característica hace que sean menos sensibles a los antibióticos (Kirisits et al. 2005).

- Pérdida de factores de virulencia: en el caso de los flagelos y pili no se expresan y respecto a LPS, se pierde la cadena O. De esa manera se evita que el sistema inmune del hospedador reconozca la bacteria y active mecanismos para su eliminación. Al igual que los sistemas de excreción de proteínas, también pierden su función (Hogardt et al. 2010).
- Resistencia a antibióticos: esta resistencia viene dada por mutaciones en la expresión de genes, como la hiperproducción de la β -lactamasa o el aumento de la expresión de las bombas de expulsión de antibióticos o disminución de la permeabilidad (Stewart et al. 2001).

En resumen, todas las adaptaciones que sufre *P.aeruginosa* durante el desarrollo de una infección crónica se producen con la finalidad de que el sistema inmune del hospedador no detecte la presencia de la bacteria y, por tanto, que no se activen mecanismos de defensa contra ella. Por esta razón es habitual una pérdida de la función de factores proinflamatorios (factores que estimulan las respuestas inmunológicas del paciente) cuya producción será determinada en este estudio.

3. Objetivo

Determinar la producción de IL-6, correspondiente a la respuesta inflamatoria, por células IB3-1 infectadas con aislados iniciales y tardíos de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quística.

4. Materiales y métodos

4.1 Obtención de las cepas bacterianas

En este estudio se han utilizado aislados de *P.aeruginosa* de 9 pacientes con fibrosis quística. Estos aislados se obtuvieron en el Hospital Universitario Son Espases, Islas Baleares. Para cada uno de estos pacientes se realizó un aislado inicial y uno tardío.

Para poder describir las diferentes cepas de *P.aeruginosa* de los pacientes se utilizaron dos métodos.

Por una parte, una eletroforesis de campo pulsado (PFGE) para poder identificar los clones. El resultado de este análisis fue la presencia de 9 clones distintos. Podemos observar que el clon FQSE-A se encontró en 3 de los 9 pacientes estudiados; los demás pacientes presentaron clones distintos y exclusivos. En los pacientes FQSE12 y FQSE21, se aislaron dos clones distintos de *Pseudomona aeruginosa* para cada uno de ellos.

Por otra, se utilizó la técnica de secuenciación de alelos múltiples (MLST), con la que se pueden caracterizar cepas bacterianas. Esta técnica mide la secuencia de 7 genes de mantenimiento o también conocidos como housekeeping genes.

El análisis mediante la técnica MLST reveló que hay 10 tipos de secuencias distintos. Estas secuencias no coincidieron con los resultados de PFGE, es decir con la identificación de los clones. Observamos que el clon FQSE-A presentó dos tipos de secuencias diferentes (274 y 1089), la diferencia entre estas dos secuencias es la mutación de dos genes, *acsA* y *guaA*. (Lopez-Causape et al. 2013). En la tabla 1 se observan las diferentes cepas de *Pseudomona aeruginosa* descritas gracias a las dos técnicas mencionadas.

Aislamientos de P.aeruginosa	Fecha del aislamiento	Tipo de secuencia	Clones
FQSE10-0503	05-2003	274	FQSE-A
FQSE10-0111	01-2011	274	FQSE-A
FQSE15-0803	08-2003	274	FQSE-A
FQSE15-1110	11-2010	1089	FQSE-A
FQSE24-0304	03-2004	1089	FQSE-A
FQSE24-1010	10-2010	1089	FQSE-A
FQSE12-0603	06-2003	299	FQSE-C
FQSE12-1206	12-2006	299	FQSE-C
FQSE12-1007	10-2007	146	FQSE-B
FQSE12-1110	11-2010	146	FQSE-B
FQSE05-0403	04-2003	1108	FQSE-E
FQSE05-0111	04-2011	1108	FQSE-E
FQSE21-1003	10-2003	1088	FQSE-H
FQSE21-0410	04-2010	1088	FQSE-H
FQSE21-0505	05-2005	1109	FQSE-I
FQSE21-1110	11-2010	1109	FQSE-I
FQSE28-1006	10-2006	1071	FQSE-J
FQSE28-1110	11-2010	1071	FQSE-J
FQSE11-0603	06-2003	701	FQSE-K
FQSE11-1010	11-2010	701	FQSE-K
FQSE16-0803	08-2003	1073	FQSE-M
FQSE16-0910	09-2010	1073	FQSE-M

Tabla 1: Tabla resumen de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas en el estudio. En la tabla se identifica a cada paciente con el código FQSE y su número correspondiente, cada color representa un mismo paciente con su aislado inicial y el tardío. En la tercera columna se obtienen los resultados de MLST, es decir el tipo de secuencia de cada aislado. Y por último en la cuarta columna se encuentran los diferentes clones identificados por la técnica PFGE.

4.2 Cultivo celular

Toda la experimentación realizada con cultivos celulares se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar para evitar la contaminación de las muestras.

En este estudio se han utilizado células de la línea IB3-1, que se obtuvieron de una línea celular americana (Manassas. VA). Son células procedentes del epitelio bronquial de pacientes con fibrosis quística. Estas células presentan dos mutaciones, una en el gen CFTR, donde se encuentra la mutación $\Delta F508$, la más común en pacientes con FQ, y una mutación sin sentido en otro alelo, W1282X. (Clauzure et al. 2014).

Las células de la línea IB3-1 se mantuvieron en el medio de cultivo LHC-8, que se obtuvo de la casa LifeTechnologies. Estas células se cultivaron en una placa con 24 pocillos que contenían colagenasa; esta enzima es muy importante para que las células IB3-1 se adhieran a la placa.

Las células IB3-1 se cultivaron a 37°C y con un 5% de CO₂. Aproximadamente cada 4 días se sembraron, en este periodo las células llegaban a una 85% de confluencia, es decir 5x10⁵ células/pocillo.

4.3 Preparación *Pseudomona aeruginosa*

Las diferentes cepas de *Pseudomona aeruginosa* aisladas de los pacientes con FQ se cultivaron a 37°C en un medio de cultivo LB. Pasadas 24 horas, se recogieron las placas y con un hisopo estéril se extrajeron las bacterias y se diluyeron con PBS, con la finalidad de obtener una densidad óptica de 0.2 ($\lambda=400\text{nm}$), de esta manera se obtuvieron aproximadamente 5x10⁷ UFC/ml.

A continuación, se realizó una dilución 1/10 de las suspensiones bacterianas con el medio de cultivo celular LCH-8. De esta forma, los aislados de *Pseudomona aeruginosa* estaban preparados para infectar a las células IB3-1.

4.4 Determinación de la producción de IL-6 en células IB3-1

Para comenzar la determinación, en primer lugar se comprobó que la placa que contenía las células IB3-1 tuviera una confluencia del 85%. Una vez se alcanzó dicha confluencia se retiró el medio y se limpió con 1 ml de PBS, el proceso se repitió tres veces para evitar que quedaran restos de citoquinas liberadas antes de la infección.

En segundo lugar, se añadió 1 ml de la suspensión bacteriana en los pocillos que contenían las células IB3-1. Se incubó la placa durante 3 horas, a 37°C y con un 5% CO₂.

Al cabo de 3 horas se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 14000rpm durante 5 minutos y a 4°C, con la finalidad de que las bacterias y otros restos celulares que se hubieran recogido, sedimentaran. Los sobrenadantes fueron guardados a -80°C para su posterior análisis.

Para determinar la producción de IL-6 de las células infectadas se utilizó la técnica ELISA tipo sándwich, ELISA Development Kit 900-K16 Lot#0413016 de la casa comercial PeproTech.

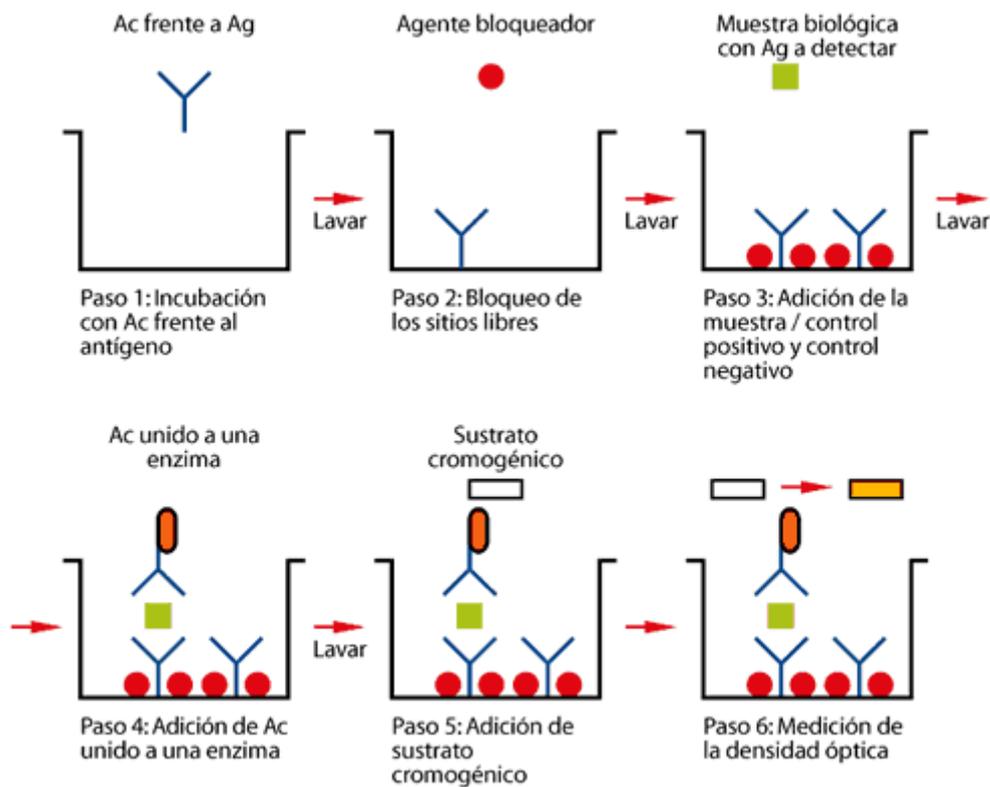


Figura 6: Representación esquemática de la técnica ELISA tipo sándwich.

En primer lugar, se activó una placa con 96 pocillos añadiendo un anticuerpo de captura (antígeno de cabra antiIL-6+2.5 mg D-mantinitol) y se dejó toda la noche a Tª ambiente. Se realizaron 4 lavados con un buffer de lavado (0.05% Tween 20) y se añadió un tampón de bloqueo para sellar los sitios libres que hubieran podido quedar en los pocillos.

A continuación, se realizó un patrón de concentraciones conocidas del antígeno (IL-6), del que se obtuvieron 9 puntos, con concentraciones desde 0 a 1 ng/ml, que se añadieron en la primera fila de pocillos de la placa. En los pocillos restantes se añadieron 100µl de cada muestra por duplicado, es decir, de los sobrenadantes resultantes de la infección. Tanto los antígenos de las muestras como los del patrón se unieron al anticuerpo de captura.

Después de 4 lavados se añadió el anticuerpo de detección que se unió a las sustancias retenidas por el anticuerpo de captura, en este caso IL-6. Tras 4 lavados se añadió la enzima Avidina que se unió al anticuerpo de detección y después se añadió ABTS (sustrato cromogénico) que se conjuga con la Avidina produciendo una coloración característica para cada concentración.

Finalmente, se determinó la intensidad de la coloración con un espectrofotómetro de microplacas (Bio-Rad, Model 680) a 415 nm.

5. Resultados y discusión

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la mayoría de los aislados iniciales de los pacientes produjeron una respuesta inflamatoria mayor, debido a que las células IB3-1 infectadas con aislados iniciales secretaron mayor cantidad de IL-6 que los aislados tardíos. En la figura 7 se puede observar que las únicas parejas de aislados que no cumplen la afirmación anterior son FQSE10 donde la producción de IL-6 fue prácticamente la misma, y los aislados de FQSE11 y FQSE21 (únicamente en el clon FQSE-H) donde la producción ha sido mayor en los aislados tardíos.

También podemos observar como el clon FQSE-A no se comporta igual en tres pacientes (FQSE-10, FQSE-15 y FQSE24). En el caso del paciente FQSE-10, hay un aumento en la producción de IL-6 de las células IB3-1 infectadas con los aislados tardíos, en cambio, en los otros dos pacientes observamos una disminución de dicha producción.

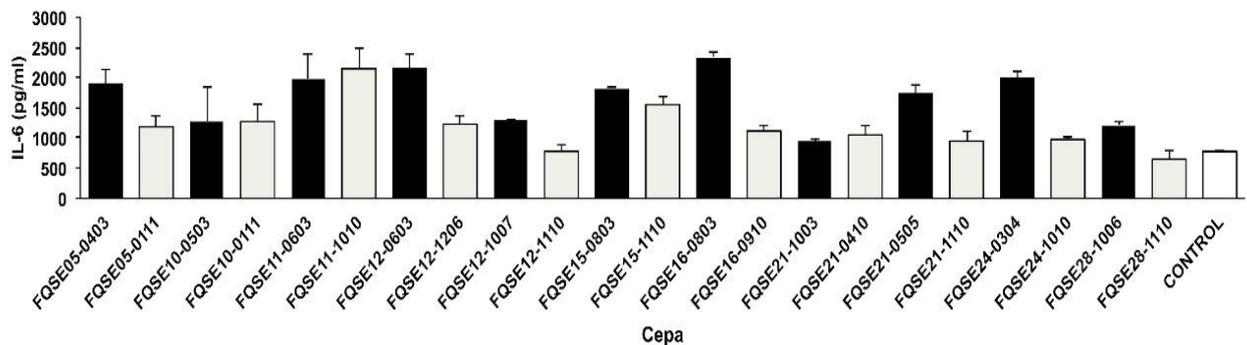


Figura 7: Producción de IL-6 por células epiteliales IB3-1 infectadas con distintos aislados secuenciales de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quística. Las columnas negras y grises corresponden, respectivamente, a los aislados iniciales y finales de cada paciente. La columna control corresponde a la producción de IL-6 de las células sin infectar. Los resultados mostrados son la media \pm la desviación standard de tres experimentos independientes

Prácticamente todos los pacientes presentaron una diferencia en la producción de IL-6 entre los aislados iniciales y los tardíos. Para comprobar si estas diferencias son significativas se realizó un análisis estadístico comparando el porcentaje de producción de IL-6 de las células IB3-1 infectadas con aislados finales respecto a las infectadas con aislados iniciales, siendo la producción de IL-6 inicial igual al 100%.

En la figura 8 se puede observar que el porcentaje de FQSE11 es 100%, esto quiere decir que las células infectadas con el aislado final han producido la misma cantidad de IL-6 que las células infectadas con el aislado inicial.

Las columnas grises de la figura 8 (FQSE05, FQSE16, FQSE21', FQSE 24 y FQSE28) son aquellas en las que la diferencia en la producción de IL-6 por infección de aislados tardíos e iniciales es estadísticamente significativa. Por ejemplo, en el paciente FQSE05, las células IB3-1 infectadas con un aislado tardío produjeron un 40% menos de IL-6 que las células que fueron infectadas con el aislado inicial. De este modo podemos observar que las parejas de aislados que son estadísticamente significativas disminuyeron entre un 30 y un 50% la producción de IL-6 en sus aislados tardíos.

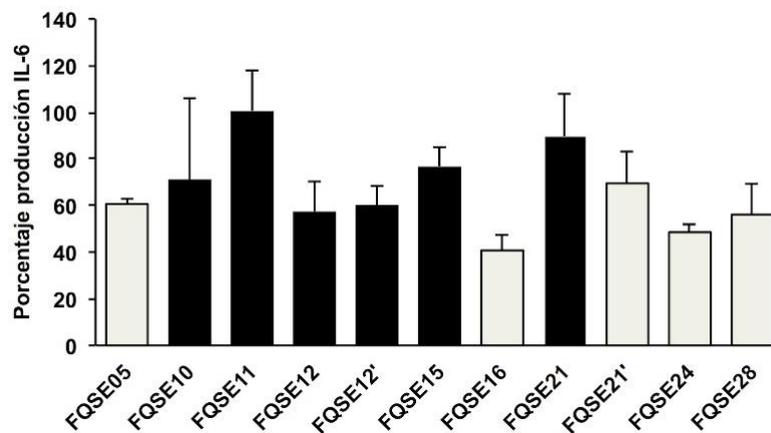


Figura 8: Porcentaje de la producción de IL-6 por células epiteliales IB3-1 infectadas con los aislados finales respecto a la producción de las células infectadas con los aislados iniciales de cada paciente. Las columnas grises corresponden a las cepas cuya diferencia de producción entre el aislado inicial y final es estadísticamente significativa ($P < 0,05$, Test de Student de dos colas). Los resultados mostrados son la media \pm la desviación standard de tres experimentos independientes.

Los pacientes que padecen fibrosis quística son muy susceptibles a una infección pulmonar causada por *Pseudomona aeruginosa*, ya que se produce una alteración en la secreción de mucosidades por parte del epitelio pulmonar y esto hace que sea un lugar idóneo para la proliferación bacteriana. Esta infección suele empezar con una colonización intermitente, en este momento la bacteria puede ser erradicada, pero cuando la infección se prolonga durante un largo tiempo, se vuelve crónica y es prácticamente imposible erradicar la bacteria del epitelio pulmonar (Gómez et al. 2007).

Cuando un patógeno entra en contacto con los receptores específicos de nuestro cuerpo, se ponen en marcha diversos mecanismos para activar el sistema inmunitario innato. El contacto con el patógeno, causado por los factores de virulencia de superficie, como el flagelo, produce la activación de la transducción de señales intracelulares, mediante factores de transcripción como NF- κ B, produciéndose la liberación de factores proinflamatorios, como por ejemplo TNF- α , IL-1, IL-8 o IL-6 (Akira et al. 2006). IL-6 es la citoquina objeto de este estudio.

Las citoquinas liberadas provocan el reclutamiento de neutrófilos y otros componentes del sistema inmune para controlar la infección. Los componentes del sistema inmune fagocitan a la bacteria con la finalidad de eliminarla (Nixon et al. 1998).

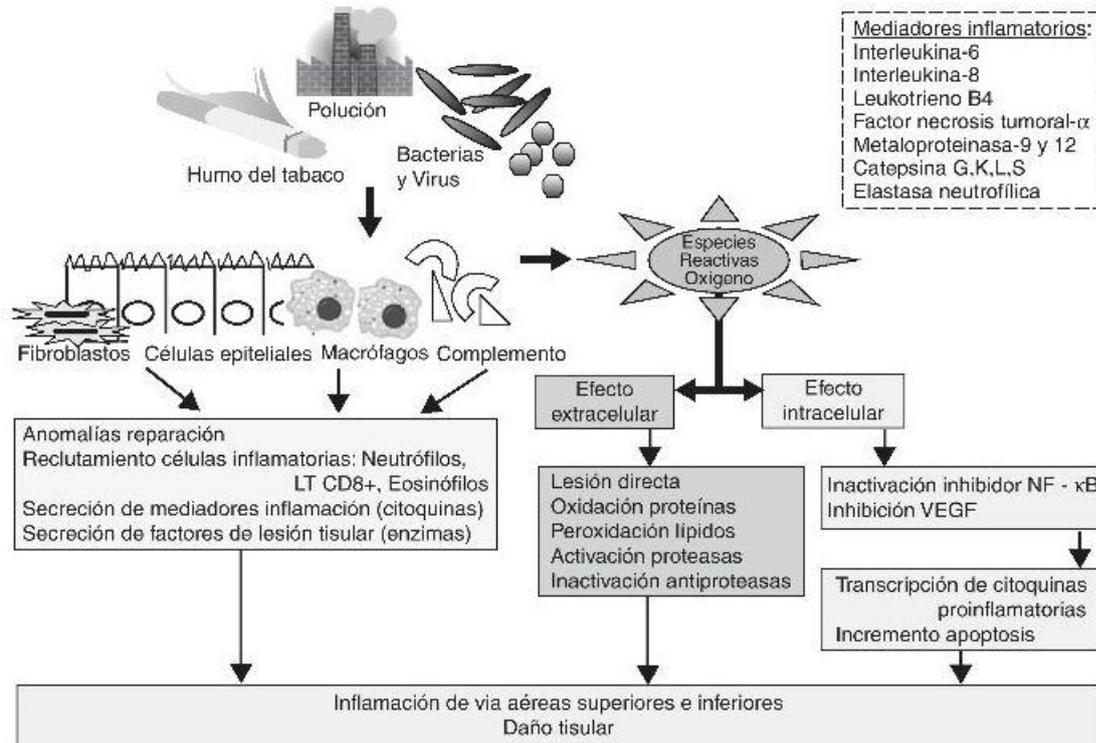
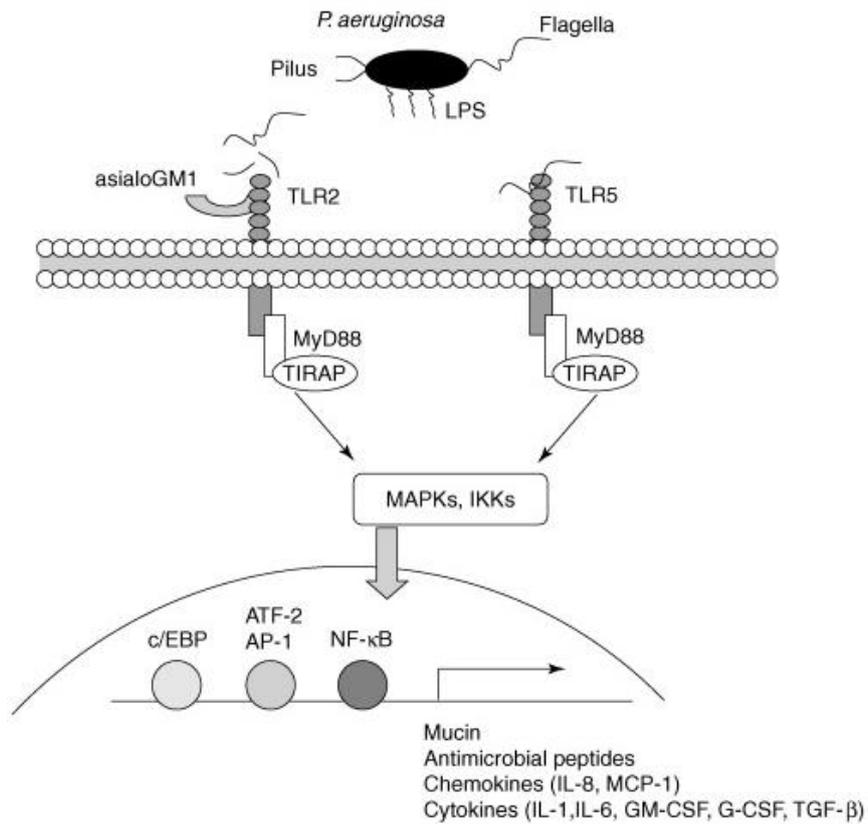


Figura 9: Representación de la respuesta inflamatoria frente a una infección causada por microorganismos

En este estudio se utilizó como marcador proinflamatorio la citoquina IL-6, una de las diferentes citoquinas que existen en el sistema inmunológico humano. La interleukina-6 es una citoquina pleiotrópica implicada en la regulación de la respuesta inmune de fase aguda y en la hematopoyesis. Esta citoquina es liberada por una gran variedad de células epiteliales después de la estimulación producida por una infección microbiana (Tilg et al. 1994).

El hecho de que sólo se utilice una única citoquina se debe a que cada citoquina induce, a su vez, la producción de otras citoquinas. En el caso de IL-6, es inducida por TNF-α e IL-1, y a la inversa (Akira et al. 1990).

P.aeruginosa entra en contacto con las células del epitelio pulmonar y sus receptores (Toll-like receptors o TLRs) detectan factores de virulencia como flagelos, pili o LPS, y se activa la respuesta inmune. Se produce una transcripción de señal y se activa la proteína quinasa C, que a su vez fosforila proteínas MAPKs y se produce la liberación de citoquinas, entre ellas IL-6 (Akira et al. 1990; Gómez et al. 2007).



Current Opinion in Pharmacology

Figura 10: Representación de la liberación de citoquinas cuando las células epiteliales entran en contacto con los factores de virulencia de *P.aeruginosa* (Gómez et al. 2007).

Analizando los resultados obtenidos en este estudio, figura 7, los pacientes FQSE05, FQSE12 (incluyendo sus dos clones FQSE-B y FQSE-C), FQSE15, FQSE16, FQSE21' (únicamente en clon FQSE-I), FQSE24 y FQSE28 han producido una mayor cantidad de IL-6 en los aislados iniciales que en los tardíos. Una explicación para estos resultados, es que durante el desarrollo de la infección crónica la bacteria sufre cambios a nivel genético y fisiológico, debidos a la fuerte presión del medio del hospedador. De esta forma, *P.aeruginosa* sufre diferentes mutaciones que le permiten sobrevivir dentro del pulmón, siendo su objetivo la evasión de la respuesta inmune del hospedador y seguir colonizando el medio. Entre las citadas mutaciones podríamos encontrar la pérdida de los factores de virulencia, entre ellos pili, flagelos y LPS; una morfología mucóide causada por la liberación de alginato por parte de la bacteria y una resistencia a antibióticos (Bragonzi et al. 2009; Sousa et al.2014; Hogart et al.2010; Stewart et al.2001).

Cuando *P.aeruginosa* pierde factores de virulencia de superficie se disminuye su capacidad inmunoestimuladora y, así, puede pasar desapercibida frente al sistema inmune del hospedador, y colonizar otras regiones del aparato respiratorio del paciente.

En un estudio realizado en 2009 se comprobó que *P.aeruginosa* sufre diversas mutaciones para evadir la respuesta inmune del paciente. En este estudio se utilizó como marcador proinflamatorio el LPS de la bacteria. El resultado fue una mutación en el LPS, concretamente en el lípido A, disminuyendo la capacidad inmunoestimuladora de la bacteria, consiguiendo evadir la respuesta del sistema inmune (Cigana et al. 2009). Los resultados de nuestro estudio, es decir, la disminución en la liberación de IL-6 en los aislados tardíos, son refutados con los resultados y conclusiones del estudio de 2009.

En cambio, en las parejas de los aislados de los pacientes FQSE-10, FQSE-11, FQSE-21' (solo en el caso del clon FQSE-H) se observó una tendencia al mantenimiento o incluso al aumento de la expresión de IL-6 por células epiteliales IB3-1 infectadas con aislados tardíos de *P.aeruginosa*. La explicación puede encontrarse en la evolución de cada cepa en su medio, es decir en el pulmón de cada paciente. En este estudio, solamente se ha utilizado una molécula como marcador, por tanto, no se puede afirmar que los aislados tardíos de *P.aeruginosa* de estos tres pacientes estén peor adaptados que los aislados iniciales. Aunque estas parejas no presentaron una reducción de la producción de IL-6 podrían tener algunas de las mutaciones descritas en la introducción, como la resistencia a antibióticos o la pérdida de flagelos y pili, que les permitan una buena adaptación al pulmón de un paciente con FQ. Como se ha comentado anteriormente, la aparición de mutaciones viene dada por la presión del medio, por tanto las características del pulmón y el tratamiento del paciente son elementos que condicionan las adaptaciones de *P.aeruginosa* (Hogardt et al. 2010; Stewart et al. 2001; Sousa et al.2014).

En un estudio realizado en 2010, se observó que los aislados tardíos de *P.aeruginosa* presentaban mutaciones donde se perdían los factores de virulencia para evitar la estimulación del sistema inmune del hospedador pero que retenían su capacidad proinflamatoria, es decir, la liberación de citoquinas como IL-6 o TNF- α (Hawdon et al. 2010). Una posible explicación es que *P.aeruginosa* utilice estas capacidades inflamatorias para debilitar el sistema inmune del paciente y así poder sobrevivir y seguir colonizando el medio. No obstante, los resultados de este estudio no se pueden comparar con el nuestro, ya que se utilizaron células A549, que son una línea celular del epitelio pulmonar de una persona sana, mientras que en nuestro estudio que se utilizaron células IB3-1 procedentes del epitelio pulmonar de pacientes con FQ. Además en 2010 se realizaron aislados de infecciones intermitentes, es decir, de la etapa inicial de la infección, y aislados de infecciones crónicas que no pertenecían al mismo paciente. De esta manera, no se pudo establecer una evolución clara de la bacteria durante el desarrollo de la infección crónica, ya que como se ha mencionado las mutaciones se producen a causa de la presión ambiental.

De ahí que en el estudio del 2010, aunque no pueda ser del todo comparable con el nuestro, se afirme que un aumento producción de citoquinas por parte de *P.aeruginosa* no indica una peor adaptación a la infección crónica.

Anteriormente se ha comentado que el clon FQSE-A actúa de manera distinta en los tres pacientes en los que se encuentra (FQSE-10, FQSE-15 y FQSE24). Cabe esperar que un mismo clon se comporte igual en todos los pacientes; pero en este caso, influye el medio donde se encuentra la bacteria. Según las características de cada pulmón *P.aeruginosa* sufre diferentes mutaciones para poder sobrevivir (Sousa et al.2014). En la figura 7 podemos observar que FQSE-15 y FQSE24 produjeron una mayor cantidad de IL-6 en los aislados iniciales en comparación con los aislados tardíos. En cambio FQSE-10 liberó prácticamente la misma cantidad de IL-6 en los aislados iniciales y tardíos. En resumen, un mismo clon puede comportarse de manera distinta en cada paciente ya que se encuentra condicionado por las características del pulmón que influyen en las mutaciones necesarias para la adaptación de *P.aeruginosa* al medio.

6. Conclusiones

Aproximadamente la mitad de las parejas de aislados de *P.aeruginosa* mostraron una reducción significativa (30-50%) de la producción de IL-6 en una infección pulmonar crónica. No obstante no podemos afirmar que la pérdida de la capacidad inflamatoria sea una característica general, aunque sí existe una tendencia a dicha pérdida. De la misma forma el hecho de que una cepa no pierda sus capacidades inflamatorias no significa que esté peor adaptada al pulmón de un paciente con fibrosis quística.

7. Referencias

Akira, S., Hirano, T., Taga, T., Kishimoto, T. (1990), *Biology of multifunctional Cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF)*, The FASEB journal, vol 4, nº 11, pp 2860-2867

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O (2006), *Pathogen Recognition and Innate Immunity*, Cell, nº124, pp 783–801

Boyd, A., Chakrabarty, AM., (1994), *Role of alginate lyase in cell detachment of Pseudomonas aeruginosa*, Applied and environmental microbiology, vol 60, nº7, pp 2355-2359

Bragonzi, A., Paroni, M., Nonis, A., et al. (2009); *Pseudomonas aeruginosa microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence*, American journal of respiratory and critical care medicine, vol 180, nº 2, pp 138-145

Clazure M, Valdivieso AG, Massip Copiz MM, Schulman G, Teiber ML, et al. (2014), *Disruption of interleukin-1b autocrine signalling rescues complex I activity and improves ROS levels in immortalized epithelial cells with impaired Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) function*, PLoS ONE, vol 9, nº6

Cigana C, Curcuru L, Leone MR, Ierano` T, Lore` NI, et al. (2009), *Pseudomonas aeruginosa exploits Lipid A and Muropeptides modifications as a strategy to lower innate immunity during Cystic Fibrosis lung infection*, PLoS ONE, vol 4, nº12

Estahbanati, HK., Kashani, PP., Ghanaatpisheh, F. (2002), *Frequency of Pseudomonas aeruginosa serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics*, Burns, vol 28, nº4, pp 340-348

Freud, E., Farkash, U., Prieto, F., et al (1999), *Perineal reconstruction for severe sequela of ecthyma gangrenosum – Report of a case*, Diseases of the colon & rectum, vol 42, nº 7, pp 961-963.

Gómez, M., Prince, A (2007), *Opportunistic infections in lung disease: Pseudomonas infections in cystic fibrosis*, Current opinion in pharmacology, vol7, nº 3, pp 244-251.

Hart, CA., Winstanley, C., (2002), *Persistent and aggressive bacteria in the lungs of cystic fibrosis children*, British Medical Bulletin, vol 61, pp 81–96

Hasset, DJ., Cuppoletti,J., Trapnell, B., Lyman, SV., et al. (2002), *Anaerobic metabolism and quorum sensing by Pseudomonas aeruginosa biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets*, Advanced Drug Delivery Reviews, vol 54, pp 1425–1443

Hawdon, N. A., Aval, P. S., Barnes, R. J., Gravelle, S. K., Rosengren, J., Khan, S., et al. (2010). *Cellular responses of A549 alveolar epithelial cells to serially collected pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis patients at different stages of pulmonary infection*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, vol 59, nº2, pp 207-220.

Hazlett, LD., Rosen, DD., Berk, RS. (1977), *Age-Related Susceptibility to Pseudomonas aeruginosa ocular infections in mice*, Infection and immunity, vol 20, nº 1, pp 25-29

Hentzer, M., Teizel, GM., Balzer., GJ et al (2001), *Alginate overproduction affects Pseudomonas aeruginosa biofilm structure and function*, Journal of bacteriology, vol 183, nº 18, pp 5395-5401

Hentzer, M., Wu, H., Andersen, JB. et al (2003), *Attenuation of Pseudomonas aeruginosa virulence by quorum sensing inhibitors*, The EMBO journal, nº 22, pp 3803-3815

Hogardt, M., Heesemann, J. (2010), *Adaptation of Pseudomonas aeruginosa during persistence in the cystic fibrosis lung*, International Journal of medical microbiology, nº 300, pp 557-562

Hornef, MW., Roggenkamp, A., Geiger, AM. et al. (2000), *Triggering the ExoS regulon of Pseudomonas aeruginosa: A GFP-reporter analysis of exoenzyme (Exo) S, ExoT and ExoU synthesis*, Microbial pathogenesis, vol 29, nº 6, pp 329-343

Kang, C., Kim, SH., Kim, HB., Park, SW., et al. (2002), *Pseudomonas aeruginosa bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome*, Clinical infectious diseases, vol 37, nº 6, pp 745-751

Kerstens, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., De Vos, P., et al. (1990), *Recent Changes in the Classification of the Pseudomonads: an Overview*, Systematic and Applied Microbiology, vol 19, nº4, pp 465-477

Kirisits, MJ., Prost, L., Starkey, M., et al (2005), *Characterization of colony morphology variants isolated from Pseudomonas aeruginosa biofilms*, Applied and environmental microbiology, vol 71, nº 8, pp 4809-4821

Levin, AS., Barone, AA., Penco, J., et al (1999), *Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii*, Clinical infectious diseases, vol 28, nº 5, pp 1008-1011.

Li, JD., Dohrman, AF., Gallup, M., et al. (1997), *Transcriptional activation of mucin by Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide in the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease*, Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America, vol 94, nº3, pp 967-972.

Lopez-Causape, C., Rojo-Molinero, E., Mulet, X., Cabot, G., Moya, B., Figuerola, J., et al. (2013). *Clonal dissemination, emergence of mutator lineages and antibiotic resistance evolution in Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis chronic lung infection*. PloS One, 8(8), e71001.

Lyczak, JB., Cannon, CL., Pier, GB (2000), *Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist*, Microbes and infection, vol 2, nº 9, pp 1051-1060

Lynch, JP. (2001), *Hospital-acquired pneumonia –Risk factors, microbiology and treatment*, Chest, vol119, nº2, pp 373-384

Madigan,T., Martinko, JM., Parker, J., *Brock Biología de los microorganismos*, 10 ed, Pearson 2003, ISBN 9788420536798, pp 368-371

Meyer, JM (2000), *Pyoverdines: pigments, siderophores and potencial potencial taxonomic markers of fluorescent Pseudomonas species*, Archives of microbiology, vol 174, nº 3, pp 135-142

Murphy, TF., Brauer, AL., Eschberger, K., Lobbins, P., Grove, L., Cai, X., Sethi, S. (2008), *Pseudomonas aeruginosa in chronic obstructive pulmonary disease*, American journal of respiratory and critical care medicine, vol 177, pp 854-860

Niveditha, S., Pramodhini, S., Umadevi, S., et al (2012), *The isolation and the biofilm formation of uropathogens in the patients with catheter associated urinary tract infections (UTIs)*, Journal of clinical and diagnostic research, vol 6, nº 9, pp 1478-1482

Nixon, LS., Yung, B., Bell, S., Elborn, JS et al. (1998) *Circulating Immunoreactive Interleukin-6 in Cystic Fibrosis*. American journal of respiratory and critical care medicine, vol 157, nº 6, pp 1764-1769

Romling, U., Wingender, J., Muller, H., et al.(1994), *A major Pseudomonas aeruginosa clone common to patients and aquatic habitats*, Applied and environmental microbiology, vol 6, nº 6, pp 1734-1738

Roy-Burman, A., Savel, RH., Racine, S., et al. (2001), *Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic Pseudomonas aeruginosa infections*, Journal of infectious diseases, vol 183, nº 12, pp 1767-1774

Sadikot, R., Blackwell, TS., Christman, J., Prince, AS., (2005) *Pathogen–Host Interactions in Pseudomonas aeruginosa Pneumonia*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, vol 171, nº11, pp 1209-1223.

Sousa, AM., Pereira, MO., (2014), *Pseudomonas aeruginosa diversification during infection development in cystic fibrosis lungs – a review*, Pathogens, vol 3, nº3, pp 680-703

Stewart, PS., Costerton, JW. et al. (2001), *Antibiotic resistance of bacteria in biofilms*, The lancet, vol 358, nº 9276, pp 135-138

Terrés, A., Olivera., R., Barreda, H., et al (1990), *El grupo Piciánico y las infecciones intrahospitalarias*, Revista mexicana de Patologías Clínicas, vol 37, nº 1-2, pp 15-19

Tilg, H., Trehu, E., Atkins, MB., et al (1994), *Interleukin-6 (IL-6) as an antiinflammatory cytokine-induction of circulating IL-1-receptor antagonist and soluble tumor-necrosis-factor receptor-P55*, Blood, vol 83, nº1, pp113-118

Trinidad, A., Ramirez-Camacho, R., García-Berrocal, José et al (2007), *Tissular changes induced by Pseudomonas aeruginosa in an otitis media rat model with tubal obstruction*, Acta Otolaryngologica, vol 127, nº 2, pp 132-137

Van Alst, N., Picardo, KF., Iglewski, BH., et al. (2007), *Nitrate sensing and metabolism modulate motility, biofilm formation, and virulence in Pseudomonas aeruginosa*, Infection and immunity, vol 75, nº 8, pp 3780-3790