



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Noves dianes terapèutiques per combatre infeccions per Bacteris multiresistents

Aina Mir Cirer

Grau de Biologia

Any acadèmic 2013-14

DNI de l'alumne: 43196636Z

Treball tutelat per Enrique Llobet Brossa
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:

Klebsiella pneumoniae, lípido A, MALDI-TOF, péptido antimicrobiano

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	3
MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	7
2. Experimentación animal y lavado broncoalveolar.....	7
3. Obtención y análisis del lípido A por MALDI-TOF.....	8
3.1. Crecimiento y preparación de las bacterias.....	8
3.2. Extracción del lípido A.....	8
3.3. Análisis mediante espectrometría de masas.....	8
4. Ensayos de resistencia frente a péptidos antimicrobianos.....	9
4.1. Ensayo por difusión radial.....	9
4.2. Ensayo por dilución (MIC).....	9
5. Estadística.....	10
RESULTADOS.....	11
DISCUSIÓN.....	16
REFERENCIAS.....	18

INTRODUCCIÓN

El género *Klebsiella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y está formado por bacilos Gram negativos, anaeróbicos facultativos y oxidasa negativos que se pueden encontrar de manera individual, formando pares o incluso cadenas cortas. *Klebsiella* spp. es un género ubicuo que engloba seis especies distintas: *K. oxytoca*, *K. mobilis*, *K. planticola*, *K. granulomatis*, *K. terrigena* y *K. pneumoniae* (Podschun and Ullmann, 1998). Podemos encontrar estas especies en diversos ambientes, ya sean aguas superficiales o residuales, suelos, plantas e incluso colonizando el tracto intestinal de mamíferos (Sahly and Podschun, 1997). Aunque la infección por *Klebsiella* puede darse en diversas partes del organismo, el tracto urinario y el tracto respiratorio son los lugares más usuales. Concretamente, *K. pneumoniae* es un patógeno oportunista que se ha convertido en un destacado patógeno nosocomial a lo largo de las últimas décadas, siendo el agente responsable de hasta el 8% de las infecciones bacterianas nosocomiales diagnosticadas en Europa y Estados Unidos, además de ser el causante del 9% de las infecciones del tracto urinario (Podschun *et al.*, 1993; Schaberg *et al.*, 1976) y del 60% de las neumonías de adquisición hospitalaria, especialmente en las unidades de Cuidados Intensivos (La Force, 1985), con unos índices de mortalidad de entre el 25% y el 60% (Sahly and Podschun, 1997; Podschun and Ullmann, 1998; Power *et al.*, 2004).

Klebsiella pneumoniae, como todas las bacterias Gram negativas, posee una envoltura celular compuesta por la membrana plasmática, un espacio periplasmático y la membrana externa. Esta última es la parte que se encuentra en contacto con el medio exterior, por lo que sus características son cruciales para la supervivencia de la bacteria y está formada por una bicapa lipídica cuya cara interna está compuesta por fosfolípidos y la cara externa por moléculas de lipopolisacárido (LPS) (Funahara and Nikaido, 1980). El LPS está formado por la cadena O, el núcleo y el lípido A, siendo esta última la parte más interna de la molécula y responsable de las propiedades endotóxicas del LPS (Gomes Cardoso *et al.*, 2006). La estructura del lípido A está relativamente conservada dentro del grupo de las enterobacterias (Raetz and Whitfield, 2002). Tomando el lípido A de *Escherichia coli* como modelo, vemos que su estructura química consta de dos moléculas de glucosamina con enlace β (1-6), acilado con residuos 3-hidroximiristato (3-OH-C₁₄) en las posiciones 2, 3, 2', 3' y fosforilado en 1 y 4'. Además, los ácidos grasos de las posiciones 2' y 3' se encuentran esterificados con otros ácidos grasos, normalmente laureato (C₁₂) y miristato (C₁₄) (Raetz, 1990). En la **Figura 1** se

muestra el característico espectro de masas del lípido A de *E. coli*. Este espectro presenta una masa/carga [m/z] 1797, correspondiente al lípido A hexaacilado descrito anteriormente.

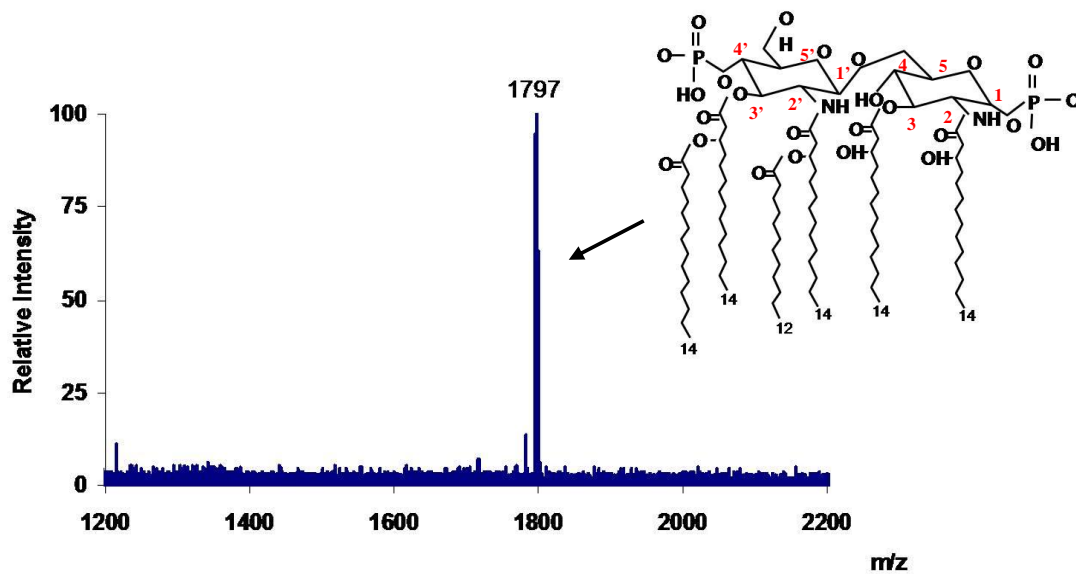


Figura 1. Estructura del lípido A de *E. coli*. A la derecha se muestra la estructura hexaacilada del lípido A de *E.coli* correspondiente al pico mayoritario del espectro (MALDI-TOF)

Algunas bacterias Gram negativas expresan variaciones de la estructura anterior. Estas variaciones se refieren tanto a longitud, número y posición de los ácidos grasos como a la presencia de fosfatos o grupos polares y la composición del disacárido. En la **Figura 2** se muestran las diferentes modificaciones que pueden darse en la estructura del lípido A y los respectivos genes que las provocan (Needham, and Trent, 2013). En patógenos, estas modificaciones se han asociado tanto a virulencia como a resistencia frente a péptidos antimicrobianos (Miller *et al.*, 2005; Darveau, 1998; Nizet, 2006)

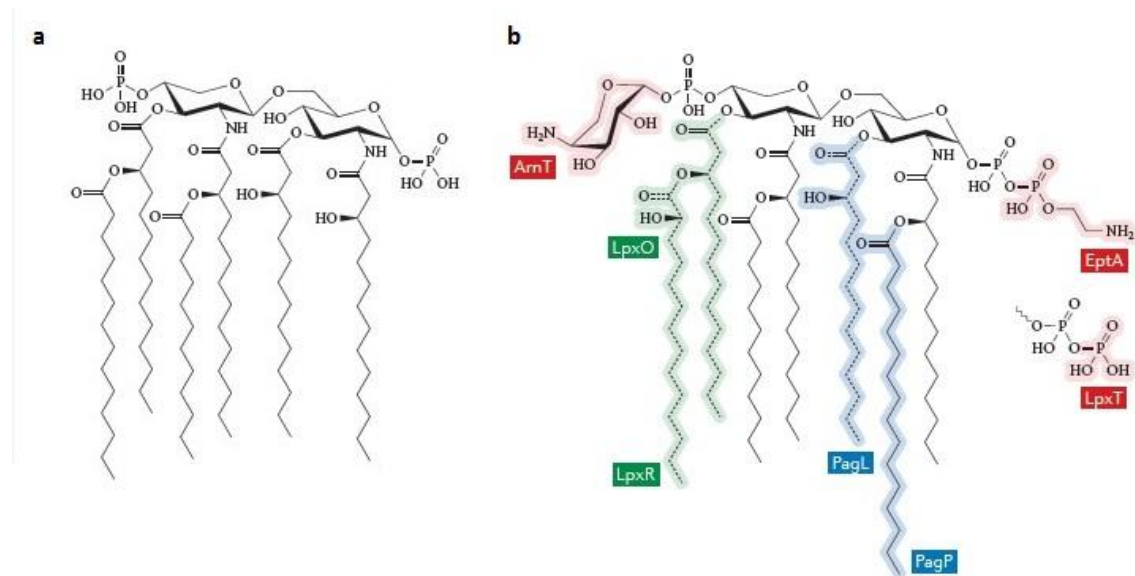


Figura 2. **a.** Estructura común del lípido A. **b.** Estructura del lípido A con las modificaciones producidas por los diferentes genes que se indican en diferentes colores.

El mecanismo de actuación de estos péptidos contra las bacterias Gram negativas generalmente se inicia con una atracción electrostática generada por la carga positiva de los péptidos y la carga negativa de los lipopolisacáridos de la membrana externa de las bacterias, más concretamente de los lípidos A presentes en ella (Hancock and Chapple, 1999). Después de esta interacción, los péptidos antimicrobianos generan áreas de inestabilidad en la membrana externa, permitiendo la translocación de estos mismos a través de la bicapa externa; una vez localizados en la membrana, pueden sufrir modificaciones en su conformación y producir daños en la membrana o internamente (Téllez and Castaño, 2010). Por tanto, es la carga que presenta el lípido A la que influye principalmente en la unión de los péptidos antimicrobianos a la membrana bacteriana. Esta carga depende directamente de la estructura del lípido A, con lo que variaciones de esta estructura provocan variaciones en la carga neta del lípido A influyendo directamente en la unión péptido-membrana y como consecuencia de ello, en la resistencia que pueda presentar la bacteria contra estos péptidos.

En el caso de *K. pneumoniae*, el lípido A presenta una estructura mayoritariamente hexaacilada, correspondiente a dos glucosaminas, dos grupos fosfato, cuatro 3-OH-C₁₄ primarios y dos C₁₄ secundarios. Esta estructura corresponde al pico situado a *m/z* 1824 en el análisis realizado por espectrometría de masas (**Figura 3**). Existen modificaciones de esta estructura que dan diferentes picos. En *K. pneumoniae* se han descrito que las modificaciones con masa *m/z* 1840, *m/z* 1955 y *m/z* 2036 dependen de los genes *lpxO*, el operón

arnBCADTEF y el gen *pagP*, respectivamente. Un estudio reciente ha mostrado como *K. pneumoniae* regula estas modificaciones para hacer frente a péptidos antimicrobianos (Llobet *et al.*, 2011)

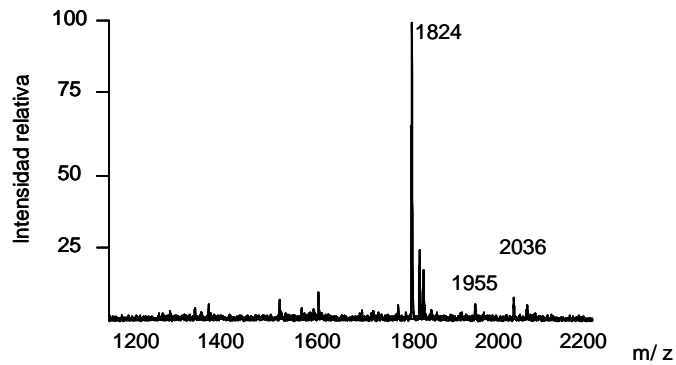


Figura 3. Espectrometría de masas del lípido A de *K. pneumoniae* 52145 cultivada en LB a 37°C obtenida mediante MALDI-TOF

En este trabajo nos planteamos estudiar si *K. pneumoniae* es capaz de variar la estructura de su lípido A cuando se enfrenta a los péptidos antimicrobianos presentes en el pulmón, así como los genes responsables de estas variaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas bacterianas usadas en este trabajo así como sus características más relevantes están descritas en la tabla siguiente:

Cepa	Características relevantes	Referencia
Kp52145	Aislado clínico; serotipo O1:K2;	Nassif <i>et al.</i> , 1989
52- Δ PhoP	Mutante por delección en el gen <i>phoP</i> de la cepa Kp52145	Llobet <i>et al.</i> , 2011
52- Δ lpxO	Mutante por delección en el gen <i>lpxO</i> de la cepa Kp52145	No publicado
52- Δ PhoP Δ lpxO	Mutante doble por delección del <i>phoP</i> y del gen Δ lpxO de la cepa Kp52145	Llobet <i>et al.</i> , 2011

Las bacterias se cultivaron en medio LB (Luria-Bertani) a 37°C en agitación 180 rpm o en LB agar a 37°C en caso de cultivar las bacterias en placa. En el caso de la prueba de la MIC se utilizó medio Mueller-Hinton (Oxoid). En todos los experimentos, las bacterias se recogieron en la fase exponencial de crecimiento. Cuando fue necesario se añadió: kanamicina 50 µg/ml; ampicilina 50 µg/ml.

2. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL Y LAVADO BRONCOALVEOLAR

Se utilizaron ratones hembra CD1 de 8 semanas de edad. El Comité de Ética para la experimentación animal de la Universitat de les Illes Balears aprobó todas las manipulaciones *in vivo*. Los ratones se pesaron y se anestesiaron intraperitoneal con una mezcla de quetamina/xilacina (Llobet *et al.*, 2011). Para obtener el lavado broncoalveolar (BAL), 1 ml de PBS fue inculcado a través de una cánula traqueal y recuperado por aspiración manual suave. El lavado se centrifugó, y se filtró con un filtropur 0,2 µm (Sarstedt) para recuperar la parte soluble.

3. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DEL LÍPIDO A POR MALDI-TOF

3.1. Crecimiento y preparación de las bacterias

Para la extracción del lípido A las bacterias se crecieron en agitación (180 rpm) toda la noche a 37°C en 5 ml de LB. A la mañana siguiente se hizo una dilución del cultivo 1:10 con 0,5 ml de cultivo en 4,5 ml de medio fresco se crecieron a 37°C en agitación (180 rpm) hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. En el caso de querer estudiar el efecto de una estimulación sobre la estructura del lípido A, el estímulo se añadió al cultivo diluido después de una hora y media de crecimiento a 37°C y 180 rpm. Las bacterias se recuperaron por centrifugación (4000 rpm, 20 min, 25°C), y se procesaron inmediatamente.

3.2. Extracción del lípido A

La extracción del lípido A se realizó mediante el método hidróxido amonio/ácido butírico descrito por Llobet y colaboradores (Llobet *et al.*, 2011). Se resuspendieron las bacterias con 400 µl de ácido butírico/hidróxido de amonio 1M (5:3, v:v) y se incubaron a 100 °C durante 2 horas, agitando las muestras cada 15 minutos. Transcurrido este tiempo las muestras fueron enfriadas y centrifugadas a 2000 \times g durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y diluido con el mismo volumen de agua destilada. Seguidamente, se liofilizaron las muestras.

La muestra conteniendo el lípido A se resuspendió en 400 µl de metanol para quitar impurezas, y se centrifugó a 2000 \times g durante 15 minutos a temperatura ambiente. El precipitado se volvió a resuspender en metanol y centrifugar en las mismas condiciones explicadas anteriormente. El lípido A se solubilizó a partir de precipitado resultante empleando 100µl de una mezcla de cloroformo/metanol/agua (3:1,5:0,25, v:v:v).

3.3. Análisis mediante espectrometría de masas

El análisis del lípido A se realizó mediante MALDI-TOF (“*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectroscopy*”). Tras solubilizar el lípido A de cada muestra, se añadieron unos granos de la resina de intercambio iónico Dowex 50WX8-H⁺ (Sigma-Aldrich) y el espectro de masas se analizó mediante MALDI-TOF. Para ello, se

depositó 1 µl de muestra sobre una placa de análisis y se cubrió con la misma cantidad de matriz (ácido cítrico 0.1 M saturado con 2',5'-ácido dihidroxibenzoico, Sigma-Aldrich). El análisis se realizó en un espectrómetro de masas Autoflex II (Bruker Corporation) en modo negativo y fijando un voltaje de aceleración iónica de 20 kV. Para la calibración del MALDI-TOF se utilizó una solución estandarizada de péptidos (Bruker Corporation). Cada espectro final es el resultado de la suma de 300 espectros distintos obtenidos de una misma preparación.

4. ENSAYOS DE RESISTENCIA FRENTE A PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

4.1. Ensayo por difusión radial

La actividad antimicrobiana de la polimixina B, colistina y BAL fue determinada siguiendo el método de difusión radial descrito por Lehrer y colaboradores con pequeñas modificaciones.

Se preparó un gel de medio mínimo compuesto por 1% de agarosa en HEPES 2 mM (pH 7,2) y 0,3 mg/ml de TSB (Oxoid) que se atemperó a 50°C. Se inocularon 180 µl de la suspensión bacteriana en 30 ml de gel y se vertió en una placa de Petri cuadrada (10 cm x 10 cm). Una vez solidificado el gel, se realizaron unos pocillos de unos 10 µl de capacidad a los que se añadieron 10 µl de distintas concentraciones de los diferentes péptidos. La placa se incubó durante 3 h a 37°C. A continuación, se preparó un medio rico compuesto por 1% agarosa y 6% TSB. Seguidamente se vertieron 30 ml del medio rico sobre el gel anterior. La placa se incubó durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se midió el diámetro de los halos de inhibición de crecimiento.

4.2. Ensayo por dilución (MIC)

Este ensayo determina de manera cuantitativa la concentración mínima inhibitoria de los péptidos antimicrobianos que actúan sobre el microorganismo estudiado. Para determinar esta concentración se siguió el método descrito por Wiegand y colaboradores con pequeñas modificaciones.

Las bacterias se crecieron como se ha indicado en el primer apartado. Una vez recogido el

cultivo por centrifugación, se resuspendió en PBS a una concentración de 1×10^9 ufc/ml. El cultivo se diluyó en medio líquido Mueller-Hinton para obtener una concentración de 1×10^6 ufc/ml. Por otro lado se realizaron las diluciones deseadas de péptido antimicrobiano a estudiar en PBS. En la placa de 96 pocillos se añadieron 100 μ l de las diferentes diluciones de péptidos antimicrobianos en cada pocillo de las columnas de la 1 a la 10. En la columna 11 se añadieron 100 μ l de la última dilución del péptido (dejando así esta columna como control negativo de crecimiento). En la columna 12 se añaden 100 μ l de medio de cultivo usado, en este caso el medio Muller-Hinton. Finalmente se añaden 10 μ l del organismo a estudiar en todos los pocillos de la placa, a excepción de la columna 11 que sirve como control negativo de crecimiento. La placa se incubó a 37°C durante 12-16 horas y finalmente se lee con un espectrofotómetro a una OD₆₀₀. Los resultados se dan en porcentaje de crecimiento con respecto al crecimiento obtenido en la columna 12.

5. ESTADÍSTICA

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. La igualdad de los resultados se contrastó a partir de un análisis de la varianza (ANOVA) o mediante el test *t* de Student de dos colas, empleando el programa informático GraphPad Prism versión 4. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de P era menor de 0.05.

RESULTADOS

Como se ha descrito en la Introducción, *K. pneumoniae* tiene la capacidad de modificar la estructura de su lípido A para contrarrestar el efecto de los péptidos antimicrobianos. Para poder estudiar si *K. pneumoniae* modula la estructura de su lípido A para hacer frente a los péptidos antimicrobianos presentes en el pulmón, lo primero que nos planteamos fue estudiar el lípido A que presenta *Klebsiella* en estas condiciones.

La extracción de lípido A se realizó tanto a partir de un cultivo de *K. pneumoniae* en LB, como de un cultivo de *K. pneumoniae* estimulado con la parte soluble de un lavado broncoalveolar (BAL) de ratón. En la **Figura 4** se muestran los espectros del lípido A obtenidos. En el espectro del lípido A obtenido directamente a partir de LB podemos observar que la especie más abundante es la de m/z 1824 y en menor medida podemos identificar las de m/z 1840, m/z 1955 y m/z 2036 (**Figura 4a**).

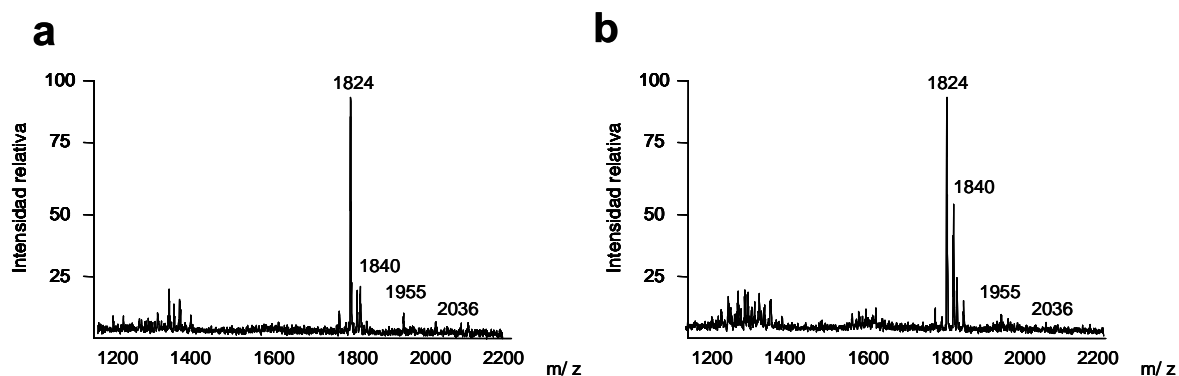


Figura 4: Espectros del lípido A de *K. pneumoniae* en LB (a) y estimulado con BAL (b). Los resultados son representativos de, al menos, 3 extracciones independientes.

Por otro lado, la estructura que presenta *K. pneumoniae* después de su estimulación con el BAL de ratón es distinta a la encontrada directamente de LB (**Figura 4**). En este caso, los picos mayoritarios son los de m/z 1824 y m/z 1840 (representado en la **Figura 5**) y con menor intensidad, aunque presente, los picos de m/z 1955 y m/z 2036 (**Figura 4b**).

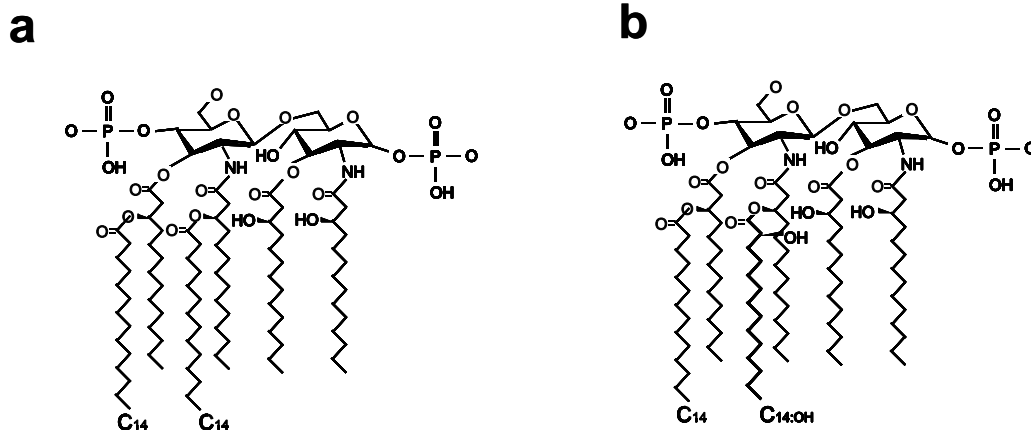


Figura 5: Estructura de lípido A propuesta para la especie de m/z 1824 (a) y de m/z 1840 (b).

La estructura de m/z 1840, se corresponde con un lípido A hexaacilado similar al de m/z 1824 pero con la sustitución de la cadena de miristato en posición 2' por una de 2-hidroximiristato. La enzima responsable de la 2-hidroxilación de los ácidos grasos del lípido A es LpxO. Para determinar si LpxO es la responsable del patrón que observamos, se analizó la estructura del lípido A del mutante $\Delta lpxO$ en las mismas condiciones. Como se puede observar en la **Figura 6**, tanto al crecer el mutante en LB como estimulado con BAL, la estructura predominante del lípido A se corresponde con el pico de m/z 1824, y la m/z 1840 desaparece por completo.

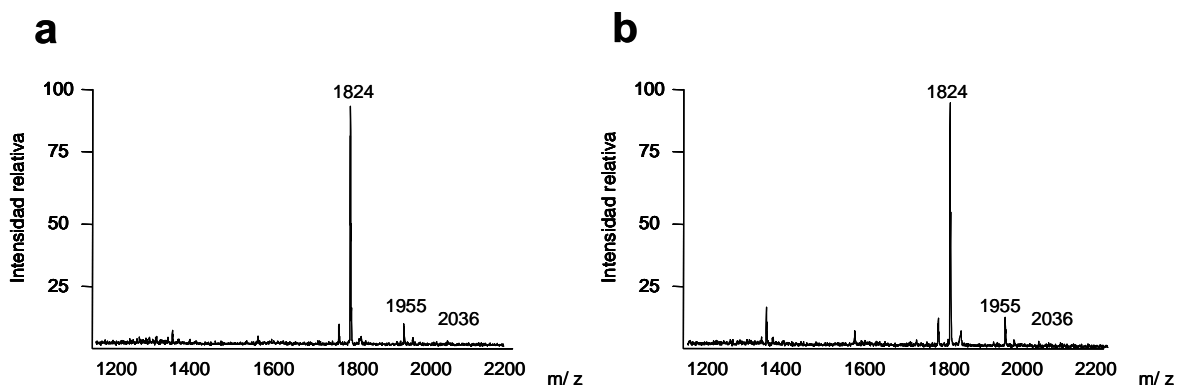


Figura 6: Espectros del lípido A del mutante $\Delta lpxO$ de *K. pneumoniae* en LB (a) y estimulado con BAL (b). Los resultados son representativos de, al menos, 3 extracciones independientes.

Una vez comprobamos que efectivamente *K. pneumoniae* puede modificar su lípido A como respuesta a una estimulación con BAL de ratón, y comprobado la implicación del gen *lpxO* en estas modificaciones, quisimos comprobar si este gen media resistencia frente a péptidos antimicrobianos.

Es sabido que las modificaciones del lípido A confieren resistencia frente ciertos tipos de péptidos antimicrobianos. Además, la resistencia a péptidos antimicrobianos se correlaciona con la virulencia de la bacteria. Para estudiar la implicación de la 2-hidroxilación en resistencia, realizamos ensayos de supervivencia de la cepa silvestre de *K. Pneumoniae* y los mutantes $\Delta lpxO$, $\Delta phoP$ y $\Delta phoP\Delta lpxO$ frente a β -defensina 1 y 2 y HNP-1, ya que son defensinas naturales, polimixina B (PxB), pues es el péptido antimicrobiano que se utiliza como modelo de acción bactericida, y colistina por que es el péptido antimicrobiano que generalmente se usa para tratar infecciones de *K. pneumoniae* multiresistentes.

En los ensayos de supervivencia para las defensinas hBD-1 y hBD-2, para HNP-1 así como para la colistina, las diferencias en la supervivencia entre la cepa 52145 y $52\Delta lpxO$, resultaron ser significativas. Además, la delección de *phoPQ* afecta de una manera drástica la sensibilidad de *K. pneumoniae* pues la supervivencia tanto del mutante simple como del mutante $52\Delta phoQP\Delta lpxO$, se vio muy reducida en todos los péptidos antimicrobianos testados (**Figura 7**).

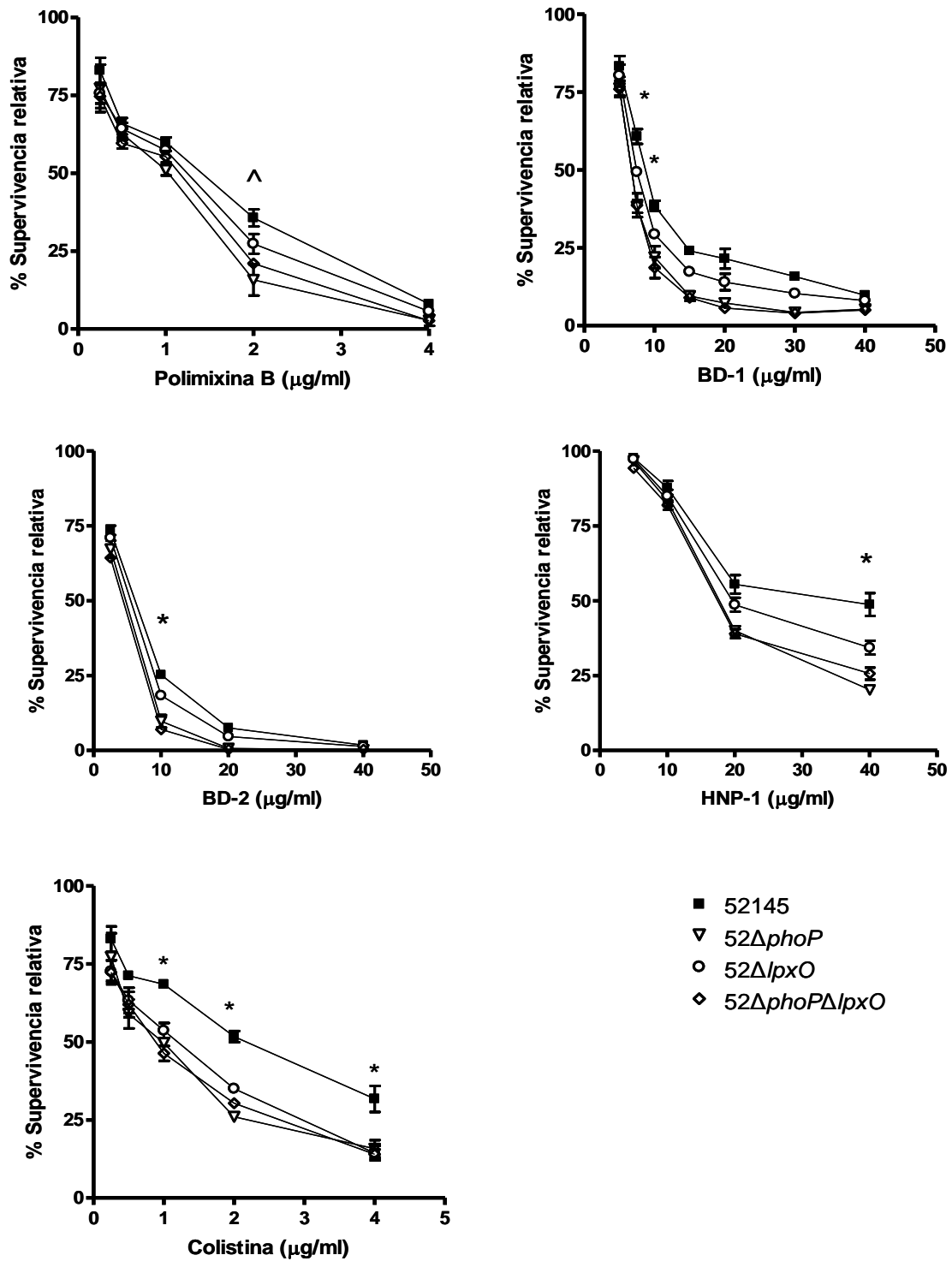


Figura 7: Ensayos de sensibilidad frente a AMPs, PxB (A), hBD-1 (B), hBD-2 (C), HNP-1 (D) y colistina (E). ^ indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$, análisis de varianza de dos colas ANOVA) entre la cepa salvaje y el mutante 52Δ*phoP*. * indica un diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, análisis de varianza de dos colas ANOVA) entre la cepa salvaje y el mutante 52Δ*lpxO*.

Finalmente, determinamos la CMI_{50} frente a colistina de las cepas 52145, $52\Delta lpxO$ y $52\Delta phoPQ$ usando el método de microtitulación. El mutante $52\Delta lpxO$ es más sensible que el mutante $52\Delta phoPQ$ y que la cepa salvaje a bajas concentraciones de colistina (**Figura 8**).

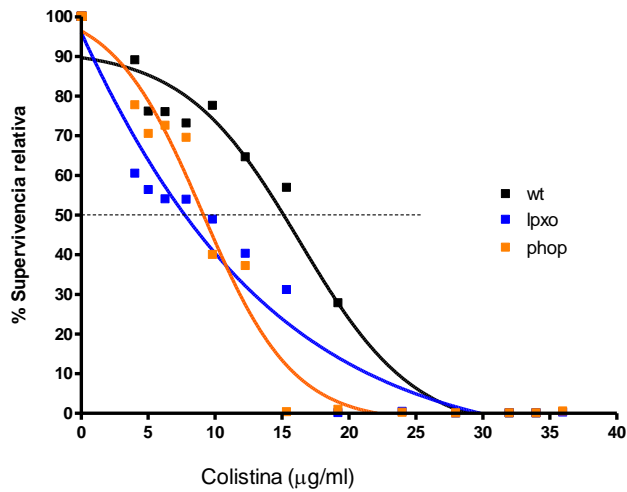


Figura 8: Determinación de la CMI_{50} de la cepa 52145 (wt), del mutante $52\Delta lpxO$ (lpxO) y $52\Delta phoPQ$ (phoP).

DISCUSIÓN

En un trabajo previo de este laboratorio se demostró que *K. pneumoniae* varía la estructura del lípido A presente en la membrana externa en respuesta a péptidos antimicrobianos. El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar si *K. pneumoniae* tiene también la capacidad de modular la estructura de su lípido A como respuesta a los componentes solubles que se encuentran en el pulmón de ratón, y como influyen estas modificaciones en la resistencia de *K. pneumoniae* a péptidos antimicrobianos.

En este trabajo se ha demostrado que *K. pneumoniae* modula su lípido A al estimular su crecimiento con el BAL del pulmón de ratón. Mediante espectrometría de masas se ha comprobado que la diferencia principal que presenta *K. pneumoniae* en su lípido A debida a esta estimulación es un aumento en el pico m/z 1840, cuya estructura corresponde a la sustitución de la cadena de miristato en posición 2' por una de 2-hidroximiristato. El gen implicado en la modificación de esta estructura es el gen *lpxO*, y en este estudio se ha comprobado que la estructura de lípido A del mutante $\Delta lpxO$ no varía como efecto del BAL. Este hecho corrobora que, efectivamente, el gen que está implicado en la modificación del lípido A como respuesta a una estimulación con BAL es el gen *lpxO*.

Una vez identificado el gen responsable de esta modificación, y debido a que es lógico pensar que en el BAL se encuentran los péptidos antimicrobianos que protegen a un ratón de las infecciones pulmonares, nos planteamos estudiar el papel de *lpxO* en la resistencia a péptidos antimicrobianos. Por ello se realizaron los diferentes ensayos de resistencias y, efectivamente, los resultados indican que $\Delta lpxO$ tiene una mayor sensibilidad que la cepa salvaje.

Un trabajo aun no publicado de este grupo pone de manifiesto la regulación de *lpxO* por parte del sistema de dos componentes PhoPQ, por lo que decidimos comparar el efecto de la delección del gen *phoP* en la resistencia a péptidos antimicrobianos observada en el mutante $\Delta lpxO$. Al realizar los ensayos de resistencia se observó que tanto el mutante $\Delta phoP$ como el doble mutante $\Delta phoP \Delta lpxO$ son más sensibles que la cepa salvaje, de igual manera que se observaba al comparar el mutante $\Delta lpxO$ tiene con la cepa salvaje. Todos estos resultados ponen de manifiesto que la resistencia observada en los distintos péptidos testados depende en gran medida de las variaciones en la estructura del lípido A dependientes de *lpxO* vía PhoPQ.

El alarmante aumento de infecciones causadas por cepas de *K. pneumoniae* multiresistentes a los antibióticos hace que los resultados obtenidos cobren mayor importancia

ya que los péptidos antimicrobianos se consideran el último recurso efectivo para el tratamiento de estas infecciones. En este sentido, cabe destacar que los resultados obtenidos demuestran claramente que la 2-hidroxilación del lípido A mediada por *lpxO* es un mecanismo de resistencia frente a colistina. El mecanismo por el que *lpxO* media resistencia a colistina es aún desconocido y son necesarios más experimentos para profundizar en este aspecto.

Poniendo en conjunto todos los resultados, podemos decir que este trabajo ha servido para ver que *K. pneumoniae* tiene la capacidad de modificar su lípido A como respuesta a los compuestos que hay en el BAL de ratón, que *lpxO* es el principal responsable de estas modificaciones, y que además media resistencia a distintos péptidos antimicrobianos, entre ellos la colistina considerado como uno de los últimos recursos para el tratamiento de infecciones provocadas por cepas de *K. pneumoniae* multiresistentes a los antibióticos.

REFERENCIAS

- Cortés, G., de Astorza B., Benedi V.J., and Alberti S.** 2002. Role of the *htrA* gene in *Klebsiella pneumoniae* virulence. *Infect. Immun.* **70**:4772-4776
- Darveau, R.P.** 1998. Lipid A diversity and the innate host response to bacterial infection. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**: 36-42
- El Hamidi. A., Tirsoaga, A., Novikov, A., Hussein, A. and Caroff, M.** 2005. Microextraction of bacterial lipid A: easy and rapid method for mass spectrometric characterization. *J Lipid Research* **46**, 1773-1778
- Funahara, Y. and Nikaido, H.** 1980. Asymmetric localization of lipopolysaccharides on the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **141**, 1463-1465
- Gomes Cardoso, P., Costa Macedo, G., Azevedo, V. and Costa Oliveira, S.** 2006. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb. Cell Fact.* **5**: 13
- Hancock,R.E.W. and Chapple,D.S.** 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chem* **43**: 1317-1323
- La Force F.M.** 1985. Community-acquired lower respiratory tract infections. Prevention and cost-control strategies. *Am. J. Med.* **78**:52-57
- Lehrer, R.I., Rosenman, M., Harwig, S.S., Jackson, R. and Eisenhauer, P.** 1991. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J Immunol Meth* **137**: 167-173
- Llobet, E., Campos M.A., Jiménez P., Moranta D. and Bengoechea J.A.** 2011. Analysis of the networks controlling the antimicrobial-peptide-dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors. *Infect. Immun.* **79**: 3718-3732
- Miller,S.I., Ernst,R.K. and Bader,M.W.** 2005. LPS, TLR4 and infectious disease diversity.

Nat. Rev. Microbiol. **3**: 36-46

Nassif, X., Fournier J.M., Arondel J. and Sansonetti P.J. 1989. Mucoïd phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infect. Immun.* **57**:546-552.

Needham, Brittany D. and Trent, M. Stephen. 2013. Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodeling on bacterial pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol* **11**: 467-481.

Nizet, V. 2006. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr. Issues Mol. Biol.* **8**:11-26

Podschun R., Sievers D., Fischer A., and Ullmann U. 1993. Serotypes, hemagglutinins, siderophore synthesis, and serum resistance of *Klebsiella* isolates causing human urinary tract infections. *J. Infect. Dis.* **168**:1415-1421

Podschun R., and Ullmann U. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogen: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:589-603

Power M.R., Peng Y., Maydanski E., Marshall J.S., and Lin T.J. 2004. The development of early host response to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is critically dependent on myeloid differentiation factor 88 in mice. *J. Biol. Chem.* **279**:49315-49322

Raetz, C. R. H. 1990. Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 129-170.

Raetz, C.R., and Whitfield C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**:635-700

Sahly H., and Podschun R. 1997. Clinical, bacteriological, and serological aspects of *Klebsiella* infections and their spondylarthropathic sequelae. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **4**: 393-399

Schaberg, D.R., Weinstein R.A., and Stamm W.E. 1976. Epidemics of nosocomial urinary tract infection caused by multiply resistant Gram negative bacilli: epidemiology and control. *J. Infect. Dis.* **133**:363-366

Schoenbach, E. B., Bryer, M. S., and Long, R. H. 2006. The clinical use of polymyxin. *Annals of the New York Acad. Os Scien.* **51**: 987-997

Téllez, G. A., and Castaño, J. C. 2010. Antimicrobial peptides. *Infect.* **14**: 55-67

Wiegand, I., Hilpert, K. and Hancock, R. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, **3**(2): 163-175