



**Universitat**  
de les Illes Balears

# EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA TERAPIA SECUENCIAL EN EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN RESPIRATORIA CRÓNICA POR *Pseudomonas aeruginosa*

**ROSA RUBIO CASINO**

**Memoria del Trabajo Final de Máster**

*BIOTECNOLOGIA, GENÉTICA Y BIOLOGÍA CELULAR*

de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Curso Académico 2015-2016

*Fecha: 04 de julio de 2016*

*Nombre del Tutor del Trabajo: MARIA DOLORES MACIA ROMERO*

# Índice

<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>2</b>
<b>1. INFECCIÓN PULMONAR CRÓNICA</b>	<b>3</b>
<b>2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	<b>6</b>
Características generales	6
Importancia clínica	6
Factores de patogenicidad	7
Resistencia antibiótica	8
Factores de cronicidad	9
<b>3. <i>BIOFILM</i></b>	<b>10</b>
Resistencia antibiótica	11
<b><u>HIPÓTESIS DEL TRABAJO</u></b>	<b>12</b>
<b><u>OBJETIVOS</u></b>	<b>14</b>
<b><u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	<b>16</b>
Cepas de <i>P. aeruginosa</i>	17
Modelo de crecimiento de <i>biofilm</i> en cámara de flujo o <i>flow cell</i>	17
Evaluación de la eficacia terapéutica y de la selección de mutantes	18
Análisis microscópico	18
Análisis estadístico	19
<b><u>RESULTADOS</u></b>	<b>20</b>
Cepa LES-1	21
Cepa 1089	25
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>29</b>
<b><u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b>	<b>31</b>

# INTRODUCCIÓN

# 1. INFECCIÓN PULMONAR CRÓNICA

Las vías aéreas son la puerta de entrada de los microorganismos hacia los pulmones. En individuos sanos, las infecciones son raras a pesar de que las bacterias son inhaladas continuamente. Esto se debe a los mecanismos de defensa presentes en la mucosa del tracto respiratorio, como la presencia de moco y cilios, inmunoglobulina A y macrófagos que previenen la colonización bacteriana. En las vías aéreas altas, la flora presente incluye *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. y *Neisseria* spp., y ocasionalmente puede existir colonización por *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. En las vías aéreas baja, la flora presente incluye *Prevotella* spp., *Streptococcus* spp., *Fusobacterium* spp., *Veillonella* spp., *Haemophilus* spp. y *Acinetobacter* spp. Sin embargo, el microbioma puede variar según las condiciones geográficas, climatológicas y otras condiciones medioambientales.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la fibrosis quística (FQ) son enfermedades relacionadas con la infección pulmonar crónica. Se caracterizan por una inflamación de las vías aéreas, alteración de la producción del moco y disminución del aclaramiento muco-ciliar. Pueden causar bronquiectasias, y ambas se caracterizan por repetidos ciclos de inflamación, con afectación del tejido pulmonar e infecciones crónicas bacterianas que contribuyen a un rápido deterioro de la función pulmonar.

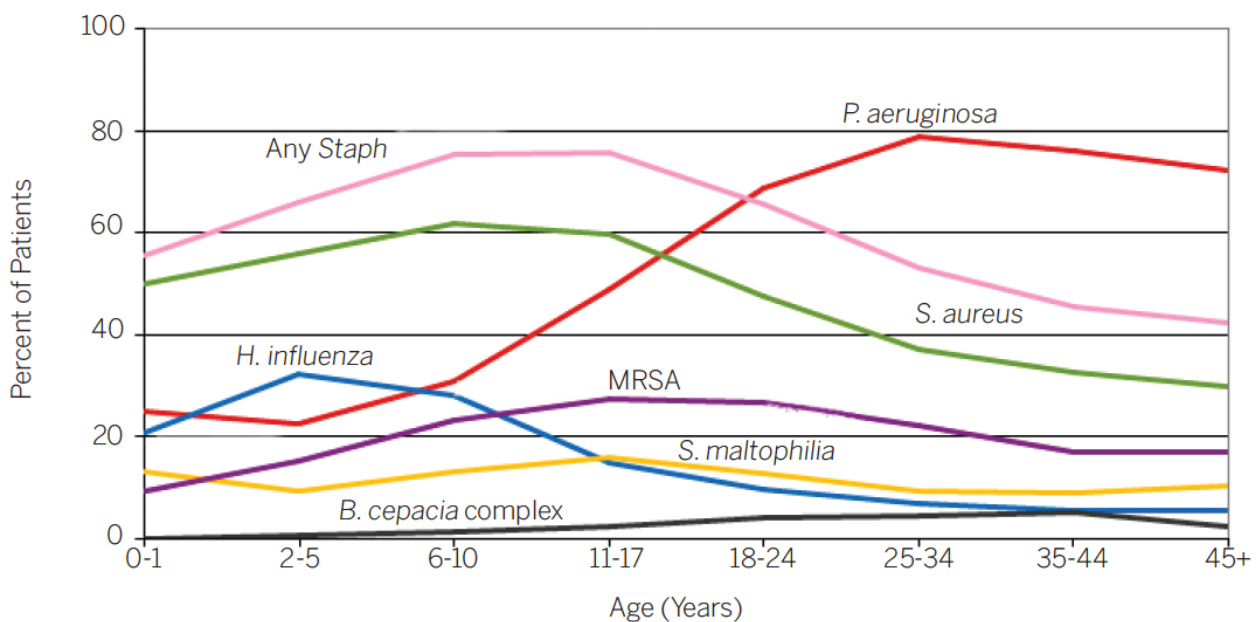
La EPOC se caracteriza por un flujo espiratorio disminuido, pérdida de elasticidad pulmonar, fibrosis y estrechamiento de las vías aéreas. La inflamación, el edema, y las secreciones también contribuyen a la limitación del flujo respiratorio. Fumar es el principal factor de riesgo. *H. influenzae* es el mayor colonizador del pulmón de estos pacientes, junto con *Moraxella catarrhalis* y *Pseudomonas aeruginosa* en menor medida. *H. influenzae* se asocia con infecciones crónicas persistentes, algo que no ocurre tan frecuentemente con *M. catarrhalis* y *P. aeruginosa* (1).

La FQ es la enfermedad autosómica recesiva más común en la población caucásica, su frecuencia estimada se sitúa en 1 cada 2500 recién nacidos vivos. Esta enfermedad está causada por mutaciones en un gen del brazo largo del cromosoma 7, que codifica una proteína reguladora de la conductancia transmembrana: *cystic fibrosis transmembrane regulator* (CFTR); un canal cloro regulado por AMPc situado en las células epiteliales. Alrededor de 1000 mutaciones se han relacionado con esta enfermedad. Sin embargo, la delección de una fenilalanina en la posición 508 (F508del) en CFTR es la mutación más común. Además de su función como canal cloro, CFTR

regula otros canales de membrana como los canales de sodio o el transporte de  $\text{HCO}_3^-$  (2).

Aunque la proteína CFTR se expresa en la membrana apical de muchos tipos de células epiteliales, el cuadro clínico está focalizado en el tracto respiratorio, gastrointestinal y órganos sexuales. El tracto respiratorio se ve afectado en mayor medida, ya que la reabsorción de cloro y sodio acompañada de una reabsorción pasiva de agua provoca la deshidratación de la superficie del epitelio ciliado aumentando la viscosidad de las secreciones. Esto, junto a la sulfatación de los proteoglicanos del moco, y la incapacidad de las células secretoras para responder a estímulos externos, favorece la infección pulmonar crónica generada por distintos microorganismos patógenos.

En el inicio de la enfermedad, los primeros patógenos implicados son los virus y bacterias intracelulares como *Mycoplasma pneumoniae* o *Chlamydomphila pneumoniae*. Poco después, los patógenos respiratorios de la edad pediátrica como *H. influenzae* o *S. pneumoniae* empiezan a predominar, pero son rápidamente desplazados por *S. aureus* y *P. aeruginosa* que tal como muestra la figura 1, adquiere mayor relevancia en la edad adulta. Finalmente, y como consecuencia de la degeneración de la función pulmonar y el uso de antibióticos de amplio espectro, se pueden aislar patógenos como *Achromobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) así como otros bacilos gram negativos no fermentadores (3).



**Figura 1.** Patrón de colonización (% aislamiento) por edades de pacientes FQ. CFF Annual Report 2011

El manejo de estas infecciones conlleva un uso masivo de antibióticos. Obviamente, esta estrategia ha reducido la morbilidad y mortalidad de estos pacientes, pero como daño colateral ha aumentado la prevalencia de bacterias multirresistentes (MDR): *S. aureus* meticilin resistente (MRSA), *P. aeruginosa* MDR y otros bacilos gram negativos no fermentadores MDR (4, 5).

## 2. *Pseudomonas aeruginosa*

### Características generales.

*P. aeruginosa* es un bacilo gram negativo no formador de esporas. Estructuralmente, es un bacilo recto o ligeramente curvo, cuyo tamaño oscila entre 0.5-1  $\mu\text{m}$  de ancho y entre 1-3  $\mu\text{m}$  de largo. Posee un flagelo polar que le confiere movilidad y diversos pilis o fimbrias.

Su metabolismo respiratorio es estrictamente aerobio. Sin embargo, puede crecer en condiciones de anaerobiosis si utiliza el nitrato como alternativa de aceptor de electrones. A nivel metabólico, *P. aeruginosa* no fermenta carbohidratos como la lactosa o sacarosa. Se caracteriza por poseer catalasa y oxidasa. Y además, puede crecer a 42°C, característica que la diferencia de otras especies como *P. fluorescences* y *P. putida*.

Tiene la capacidad de producir pigmentos: piocinanina (azul), piorubina (rojo), piomelanina (marrón) y pioverdina (verde), y puede tener variantes de crecimiento como el morfotipo enano o “*small colony variant*” (SCV) o el morfotipo mucoide, ligados a las infecciones crónicas respiratorias como la FQ (6).

### Importancia clínica

A nivel hospitalario, *P. aeruginosa* es una de las causas de infección más frecuentes y graves, asociada a una elevada mortalidad (7). Afecta especialmente a pacientes con heridas quirúrgicas, quemaduras, sometidos a ventilación mecánica y a aquellos que reciben tratamiento quimioterápico (7, 8). Las infecciones nosocomiales más frecuentes son la neumonía asociada a ventilación mecánica, la bacteriemia, la infección urinaria, la infección de heridas y la peritonitis en pacientes sometidos a diálisis peritoneal (9-11). También, es la principal causa de infección en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas como la FQ, las bronquiectasias o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). A nivel de las infecciones adquiridas en la comunidad, destacan la foliculitis, la otitis externa, y la queratitis asociada al uso de lentillas.

## Factores de patogenicidad

*P. aeruginosa* posee múltiples, diversos y complejos factores de virulencia. La mayoría de los factores se encuentran en ésta bacteria, cómo podemos ver en la tabla 1 tabla resumen.

**Tabla 1.** Principales determinantes de virulencia de *P. aeruginosa*

Localización o clase	Factor de virulencia	Actividad o efecto
Superficie celular	Alginato	Antifagocitaria/resistencia a opsonización
	LPS	Endotoxico/antifagocitario
	Pilis	Movilidad “ <i>twitching</i> ”, formación biofilm, adherencia
	Flagelo	Movilidad, formación <i>biofilm</i> , adherencia, quimiotaxis
Membrana externa	Receptores sideróforos	Provee de hierro
	Bombas de expulsión	Expulsión de antibióticos
Sistemas de secreción tipo III	ExoS y Exo T	Intoxicación de polimorfonucleares Bloqueo de la transducción de señales de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (12, 13) Modulación de GTPasas (14)
	Exo U	Citotóxico Fosfolipasa tóxica (15) Marcador de virulencia de cepas clínicas (16) Activador de canales de Ca <sup>+2</sup> (17)
	Exo Y	Modulador del citoesqueleto de actina
Proteasas	Proteasa LasA; elastasa LasB; proteasa alcalina; proteasa IV	Degradación de efectores inmunitarios (anticuerpos, complemento, etc.) Degradación de proteínas de matriz

Adquisición de hierro	Pioverdina; piochelina	Captan el hierro del huésped
Toxinas secretadas	Exotoxina A	Inhibición de la síntesis proteica
	Fosfolipasa leucocidina	Matar leucocitos
	Hemolisinas	Hemolisis de glóbulos rojos
	Ramrólípido	Degradación de glicolípidos de la superficie celular
Factores oxidativos	Piocianina; Ferripiochelina	Producen especies reactivas de oxígeno: $H_2O_2$ Interrumpe la función de las células epiteliales
<i>Quorum sensing</i>	LasR/LasI	Formación de <i>biofilm</i>
	RhlR/RhII PQS	Regulación de la secreción de factores de virulencia

### Resistencia antibiótica

*P. aeruginosa* presenta de forma natural resistencia a muchos antibióticos de uso clínico, tal como la mayoría de penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, y muchas de tercera generación, tetraciclinas, cloranfenicol, cotrimoxazol y rifampicina. La resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* se debe principalmente a la expresión de una beta-lactamasa cromosómica inducible no inhibible por ácido clavulánico (cefalosporinasa del grupo AmpC). Además puede desarrollar multiresistencia de alto nivel durante el tratamiento antibiótico, por adquisición de mecanismos de resistencia por transmisión horizontal y por mutación en genes cromosómicos.

### Bombas de expulsión

Las bombas de expulsión encontradas en *P. aeruginosa* (tabla 2) pertenecen a la subclase RND (resistencia-noculación-división) y están compuestas por tres componentes, una proteína situada en la membrana citoplasmática que actúa como bomba, un canal situado en la membrana externa y una proteína periplásmica que fusiona los otros dos componentes. Además de eliminar antimicrobianos, las bombas de expulsión permiten la eliminación de detergentes, desinfectantes, solventes orgánicos y moléculas involucradas en el *quorum sensing* (18).



Se han descrito cuatro bombas de expulsión hasta la fecha: MexA-MexB-OprM y MexX-MexY-OprM, que se expresan de forma constitutiva en las cepas *wild-type* y MexC-MexD-OprJ y MexE-MexF-OprN, cuya expresión se observa en fenotipos multiresistentes.

**Tabla 2.** Bombas de expulsión de *P. aeruginosa* (Tratado SEIMC)

	BL	CM	FQ	ML	TC	TP	NV	SF	AG
Mex A- MexB- OprM	X (excepto imipenem)	X	X			X	X	X	
MexC- MexD- OprJ	X	X	X	X	X	X	X		
MexE- MexF- OprN		X	X			X			
MexX- MexY- OprM			X	X (eritromicina)		X			X

BL: betalactámicos; CM: cloranfenicol; FQ: fluoroquinolonas; ML: macrólidos; TC: tetraciclinas; TP: trimetoprim; NV: novobiocina; SF: fulfonamidas; AG: aminoglucósidos

### Factores de cronicidad

A continuación, en la tabla 3, se presenta un resumen de las adaptaciones de *P. aeruginosa* en el proceso de cronificación de las infecciones.

**Tabla 3.** Factores de adaptación de *P. aeruginosa* en el proceso de cronificación de las infecciones.

COMPONENTE BACTERIANO	ADAPTACIÓN	EFECTO
Exopolisacárido	De morfotipo no mucoide a mucoide	Reducir la expresión de factores de virulencia. Resistencia antibiótica. Resistencia al ataque inmunitario
Morfotipo	“ <i>Small colony</i> ”	Resistencia antibiótica,

	<i>variants</i> ”	supervivencia intracelular, reducción de la $\alpha$ -toxina
ADN	Mutaciones (SNP, deleciones, etc.)	Cambios genéticos de adaptación
Proteínas de membrana externa	Mutaciones en el gen <i>Phu</i>	Aumento de la transcripción y captación de hierro
Lipopolisacárido	Pérdida del antígeno O	Evasión del sistema inmunitario
Movilidad	Pérdida del flagelo	Evasión de la fagocitosis
<i>Quorum sensing</i>	Mutaciones en <i>lasR</i> y <i>rhlR</i>	Disminuye la producción de factores de virulencia Aumento de la resistencia a betalactámicos Ventajas de crecimiento con niveles menores de aminoácidos

### 3. BIOFILM

Los *biofilms* se definen como comunidades bacterianas adheridas a superficies bióticas o abióticas rodeadas de una matriz extracelular. Los *biofilms* se desarrollan en una unidad compleja y bien coordinada por señales que regulan la densidad celular, la disponibilidad de nutrientes y energía disponibles en el medio (19). La formación de *biofilm* requiere un sistema de señalización celular o “*quorum sensing*” que permite a la macrocomunidad bacteriana regular su densidad (20). Esta forma de crecimiento es considerada como una estrategia de supervivencia bacteriana en ambientes hostiles, incluyendo el ser humano (21) debido a su alta tolerancia a los antimicrobianos y al sistema inmune.

La adherencia a una superficie es el primer paso para la formación del *biofilm* y es posible gracias a los flagelos y pilis, en el caso de bacterias gram negativas, o a proteínas de superficie, en el caso de bacterias gram positivas. Después de la adhesión, el *biofilm* prolifera y produce una matriz extracelular, compuesta de diversos exopolisacáridos, proteínas, ADN, productos de lisis bacteriana y compuestos del huésped. Finalmente, ocurre una fase de dispersión, en la cual algunas bacterias se desprenden del *biofilm* para colonizar nuevas superficies y empezar de nuevo el ciclo.

Acorde con la información disponible, entre el 65-80% de todas las infecciones están asociadas a la formación de *biofilms*, evidenciando así el enorme impacto clínico que supone. Además los

*biofilms* están relacionados con las infecciones crónicas mientras que el crecimiento planctónico está ligado a las infecciones agudas. En el ser humano, las heridas crónicas y las infecciones pulmonares crónicas como las que se dan en la FQ representan el mayor porcentaje de infecciones relacionadas con la producción de *biofilms* (22-25).

En FQ, como en otras enfermedades pulmonares crónicas como bronquiectasias y EPOC, la formación de *biofilm* junto con la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* y la alta prevalencia de cepas hipermutadoras, hacen que la erradicación de la infección sea prácticamente imposible (26,27).

En resumen *P. aeruginosa* diseña una estrategia de supervivencia basada en reducir la expresión de los factores de virulencia tradicionales para reducir costes energéticos e invertir la energía en adaptarse a otras alternativas metabólicas como las condiciones anaerobias que se dan dentro del *biofilm* (28).

### **Resistencia antibiótica en *biofilms***

Una de las características más importantes de los *biofilms* es su mayor tolerancia a los antimicrobianos. Se ha demostrado que un *biofilm* puede tolerar entre 100 y 1000 veces más concentración de antibiótico que bacterias en estado planctónico (22, 29-33). En los últimos años se ha profundizado en las causas involucradas en esta mayor tolerancia de los *biofilms* a los antibióticos en las que concurren tanto aspectos fisiológicos como mecanismos de resistencia propios que se resumen a continuación.

#### Menor penetración de antibiótico.

La matriz exopolisacárida actúa como una barrera física que disminuye la penetración de antimicrobianos. Además el alginato y el ADN que contiene actúan como quelantes de los antibióticos(34)

#### Diferentes tasas de crecimiento y disponibilidad de nutrientes

Los *biofilms* contienen canales que regulan la circulación de agua, nutrientes y oxígeno (35). Sin embargo, se forma un gradiente en el cual las zonas más externas son aerobias y metabólicamente activas, mientras que las zonas más profundas son anaerobias, nutricionalmente deficientes y con menor tasa de crecimiento (36-40). Puesto que muchos antibióticos muestran mayor efectividad frente a células en división, estas células con menor crecimiento en las zonas internas del *biofilm* contribuyen a la tolerancia antibiótica (29,41).

#### Fenómeno de persistencia

Las bacterias persistentes son variantes “dormidas” con una elevada tolerancia a los antibióticos

(42) y a la respuesta inmunitaria, pudiendo causar recaídas de la infección (41).

#### Inducción de mecanismos de resistencia

Este tipo de resistencia depende de la presencia del antibiótico y puede ser específica o no específica para un antimicrobiano particular. Uno de los mecanismos no específicos es la regulación positiva de bombas de expulsión. Diversos estudios han demostrado diferente expresión de genes de resistencia en *biofilm*, comparado con crecimiento planctónico (43).

#### Resistencia mutacional

Las cepas hipermutadoras son muy prevalentes en las infecciones respiratorias crónicas. Los mecanismos de mutación clásicos juegan un gran papel en la resistencia antibiótica del *biofilm*, incluso más que las propias características fisiológicas (44). De hecho, existen estudios recientes que demuestran que la mutagénesis se ve aumentada en los *biofilms* y que la hipermutación juega un papel importante en los procesos de desarrollo, adaptación y diversificación. (45-48).

#### Transferencia de genes

La estructura del *biofilm* favorece la transferencia horizontal de genes entre bacterias, la cual juega un papel muy importante en la aparición de resistencias antibióticas (48).

# HIPÓTESIS DEL TRABAJO

La infección crónica respiratoria por *P. aeruginosa* es la principal causa de morbilidad, mortalidad de los pacientes con FQ y, como se ha expuesto previamente, la formación de *biofilm* y la aparición de mutaciones adaptativas, incluidas las mutaciones de resistencia, contribuyen al establecimiento y permanencia de la infección crónica y hacen extremadamente difícil la erradicación de *P. aeruginosa*.

Por ello es fundamental la búsqueda de nuevos tratamientos o estrategias terapéuticas que ayuden a prevenir la formación y/o erradicación del *biofilm*. En los últimos años se está profundizando en el desarrollo de terapias de mantenimiento con, cada vez más, antibióticos inhalados (tobramicina, aztreonam, levofloxacino, colistina, amikacina) con las que se alcanza una mayor concentración intrapulmonar que con las terapias endovenosas u orales.

Por otro lado, existen interacciones antagonistas entre mecanismos de resistencia que pueden ayudar a diseñar nuevas estrategias terapéuticas. El tratamiento con aminoglucósidos conlleva, a menudo, la selección de mutantes que sobreexpresan la bomba de expulsión MexXY-OprM, la cual ha sido frecuentemente relacionada con la inactivación de la bomba de expulsión MexAB-OprM. (49). Por tanto, teóricamente, el tratamiento con sustratos de MexXY-OprM (como tobramicina) estará ligado a una mayor sensibilidad a los sustratos de MexAB-OprM (como aztreonam). Entonces, el tratamiento secuencial con tobramicina seguido de aztreonam debería suponer un aumento del efecto terapéutico y una disminución en la selección de mutantes.

# OBJETIVOS

1. Evaluar la eficacia terapéutica del tratamiento secuencial con antibióticos inhalados en un modelo *in vitro* de crecimiento en *biofilm*.
2. Evaluar la dinámica de selección de mutantes en los *biofilms* sometidos a terapia secuencial.
3. Comparar el efecto de la monoterapia con tobramicina y aztreonam con la alternancia secuencial de ambos antibióticos.



**MATERIALES**

**Y**

**MÉTODOS**

### Cepas de *P. aeruginosa*:

De una colección de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes de FQ, previamente caracterizada, se seleccionaron dos cepas en base a su capacidad de formar *biofilm* y por su importante relevancia clínica.

- Cepa 1089: cepa hipermutadora
- Cepa 146: cepa epidémica multirresistente. Clon epidémico de Liverpool (LES-1).

Las cepas clínicas de *P. aeruginosa* se marcaron con fluorescencia, utilizando *gfp* (green fluorescent protein) en construcciones mini-Tn7, conteniendo gentamicina como marcador de resistencia.

### Modelo de crecimiento de *biofilm* en cámara de flujo o *flow cell*

Los *biofilms* se formaron en el sistema *flow cell*. Este sistema está formado por un matraz que abastece de medio a los canales de la celda de flujo o *flow cell* mediante una bomba peristáltica. Las *flow cell* disponen de tres canales, y en cada uno de ellos se inocula la suspensión de la cepa bacteriana. En los canales se inocularon 250 $\mu$ l de una dilución saturada de *P. aeruginosa* (aproximadamente  $10^6$ - $10^7$  UFC/ml) y se dejó el sistema sin flujo durante 1 h para permitir la adherencia bacteriana. Después, se instauró un flujo de 3 ml h<sup>-1</sup>, mediante una bomba peristáltica Watson Marlow 205S, con medio FBA suplementado con glucosa 0.3 mM y 2% de caldo Luria-Bertani (LB) (las cepas demostraron ser auxótrofas). Los *biofilms* se incubaron a 30°C.

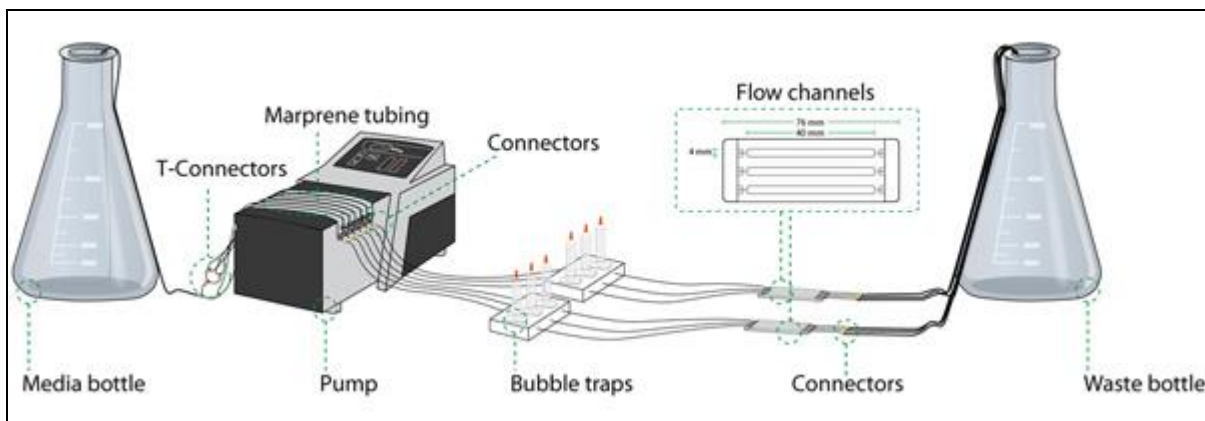


Figura 2. Esquema del sistema *flow cell*. El matraz con medio es donde añadimos los antibióticos y abastece a los canales de la celda de flujo. La bomba peristáltica provee el flujo laminar. Las *buble traps* o atrapador de burbujas, se encarga de eliminar las burbujas de aire que se forman en el sistema. La *flow cell* o cámara de flujo consta de tres canales en los que se inocula la cepa y donde se va a formar el *biofilm*. El matraz recolector es utilizado para recoger el medio sobrante.

El tiempo óptimo para empezar los tratamientos se estableció en 96 horas. Tiempo en el que encontramos un *biofilm* maduro, simulando una infección crónica respiratoria.

Se instauraron 4 tratamientos diferentes, eligiendo la concentración pico de antibiótico alcanzada en esputo tras inhalación, 1000 mg/l de tobramicina (TOB) y 700 mg/l de aztreonam (ATM). Los distintos tratamientos fueron:

- Tobramicina (6 días de tratamiento).
- Aztreonam (6 días de tratamiento).
- Tobramicina (2 días de tratamiento) / Aztreonam (2 días de tratamiento) / Tobramicina (2 días de tratamiento).
- Aztreonam (2 días de tratamiento) / Tobramicina (2 días de tratamiento) / Aztreonam (2 días de tratamiento).

### **Evaluación de la eficacia terapéutica y de la selección de mutantes**

A diferentes tiempos, t0 (96 horas, *biofilm* maduro, antes de iniciar tratamiento), t4 (4 días de tratamiento) y t6 (6 días de tratamiento), se separa el *biofilm* mediante lavado con 1 ml de una suspensión de *glass beads* en 0,9% de NaCl y se recoge para su posterior siembra. Se realizan diluciones seriadas y se siembra en agar Muller-Hinton (MHA) para determinar el número de células viables. Los mutantes resistentes se determinan mediante siembra en placas de MHA con una concentración de antibiótico de 4 y 16 veces la CMI de ATM (8 y 32 mg/l respectivamente) y 4 y 16 veces la CMI de TOB (16 y 64 mg/l respectivamente, para la cepa 1089; 4 y 16 mg/l respectivamente, para la cepa LES1). Las placas se incubaron a 37°C durante 24h para el posterior conteo de bacterias viables; y durante 36h para el conteo de mutantes.

### **Análisis microscópico**

El seguimiento del *biofilm* se realizó cada dos días mediante microscopía laser confocal (MLC). Para visualizar el efecto bactericida de los diferentes antibióticos, los *biofilms* se tiñeron con yoduro de propidio y las células/áreas muertas del *biofilm* se observaron en color rojo. Las imágenes se reconstruyeron tridimensionalmente mediante el software IMARIS (Bitplane AG, Zurich, Switzerland) y se calcularon parámetros estructurales, como la biomasa, mediante el programa COMSTAT (50).

Todos los experimentos se realizaron por triplicado (3 canales por cada celdilla de flujo).

### **Análisis estadístico**

El análisis comparativo entre la biomasa del *biofilm* control frente al *biofilm* tratado con cada uno de los cuatros regímenes y la biomasa de los *biofilms* con tratamientos individuales frente a tratamientos secuenciales se hizo mediante Mann- Whitney U test. Los valores de  $P < 0,05$  se consideraron como estadísticamente significativos.

# RESULTADOS

## LES-1

Tal como muestra la figura 1, en la cepa LES-1, ATM redujo ligeramente la carga bacteriana (3 log a los 6 días de tratamiento). Mientras que el tratamiento con TOB consiguió reducir la carga bacteriana por debajo del límite de detección desde t4 hasta el final del experimento. El tratamiento secuencial T/A/T, reduce la carga bacteriana por debajo del límite de detección desde t4 hasta el final del tratamiento. Esta reducción, comparada con la cepa control sin tratamiento, fue de 11 log aproximadamente, además se demostró que la terapia T/A/T fue muy superior a la monoterapia con ATM, aunque no con TOB, en términos de células viables. El tratamiento secuencial A/T/A también redujo la carga bacteriana por debajo del límite de detección desde t4 hasta el final del tratamiento. La disminución de células viables, comparada con el grupo control no tratado, fue de aproximadamente 11 log y en cuanto a la comparación con las monoterapias, el tratamiento secuencial A/T/A fue muy superior al tratamiento con ATM, pero no con TOB.

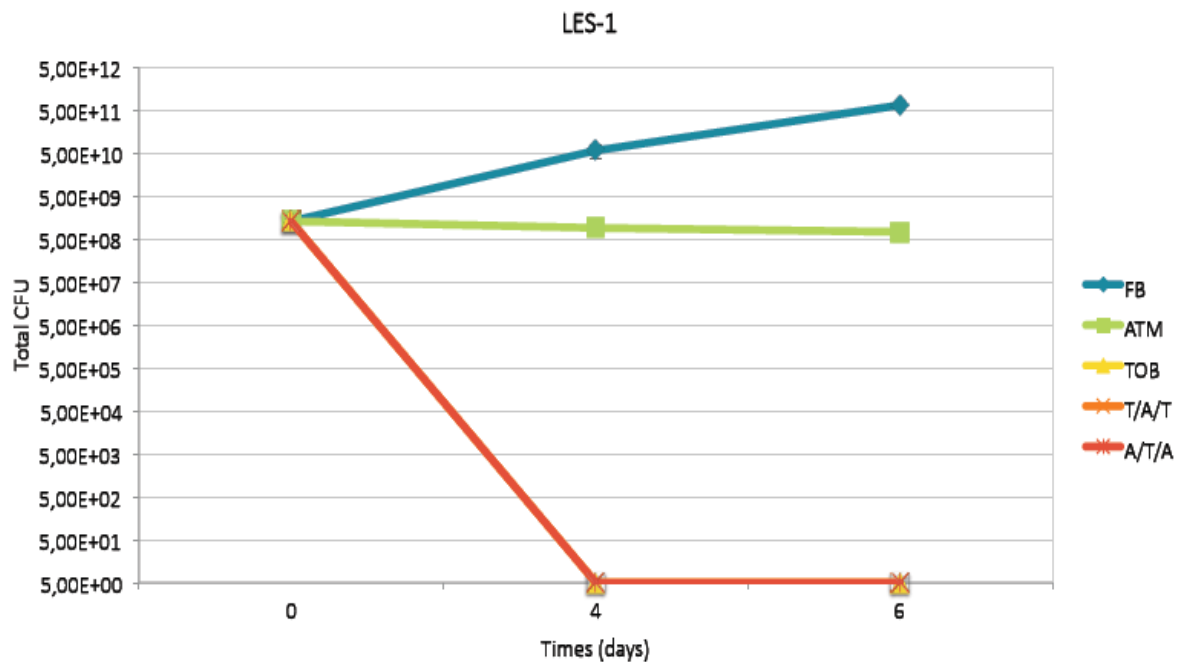


Figura 1. Dinámica poblacional de la cepa LES-1. Los resultados representan las medianas (puntos) y el rango intercuartil (barras de error) de tres experimentos independientes.

En la figura 2, observamos que ATM disminuyó los mutantes resistentes preexistentes, pero no los erradicó por completo. Con el tratamiento con TOB (figura 3) no se seleccionaron mutantes y se erradicaron los mutantes resistentes a TOB preexistentes (aproximadamente 4 log a t6). Con las

terapias secuenciales con T/A/T y A/T/A no se seleccionaron mutantes resistentes y se erradicaron los mutantes preexistentes (figuras 2 y 3).

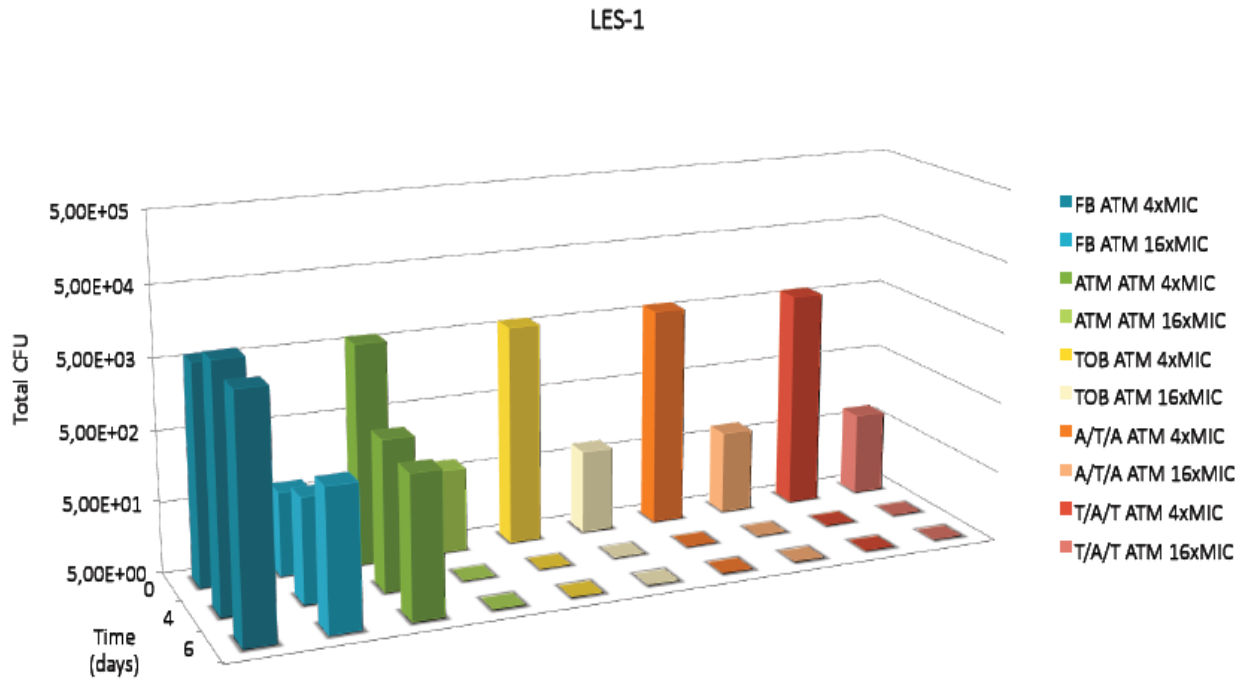


Figura 2. Dinámica en el tiempo de los mutantes resistentes de la cepa LES-1, a 4 y 16 veces la CMI de ATM. Los resultados representan las medianas (barras) de tres experimentos independientes.

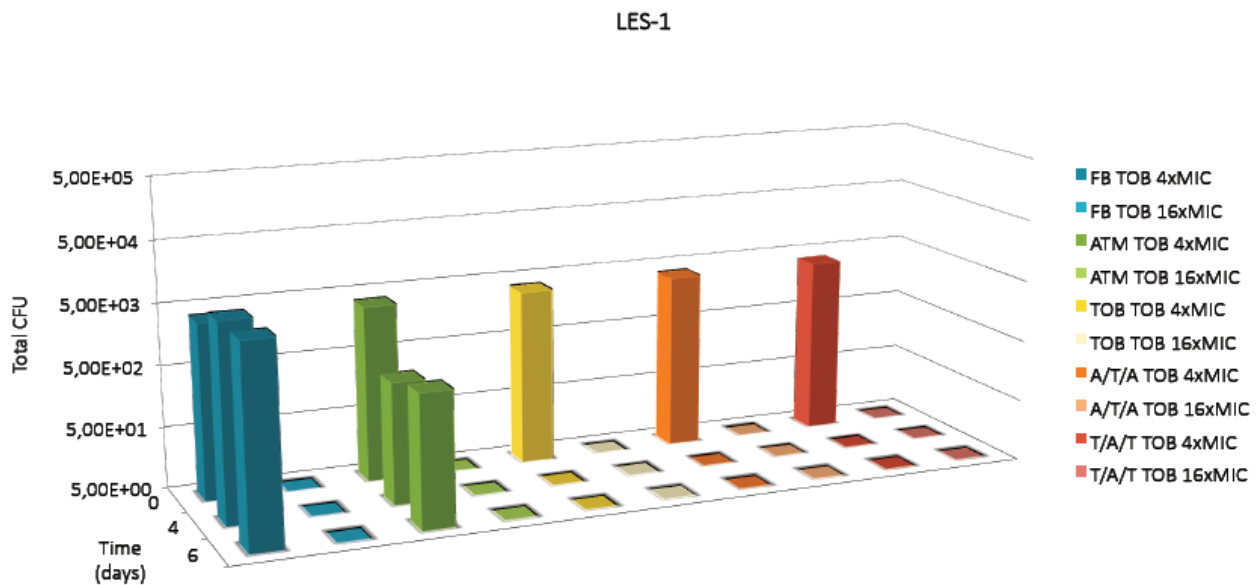


Figura 3. Dinámica en el tiempo de los mutantes resistentes de la cepa LES-1, a 4 y 16 veces la CMI de TOB. Los resultados representan las medianas (barras) de tres experimentos independientes.

En cuanto a la biomasa (figura 4), ATM no consiguió disminuirla. Con TOB, sin embargo, la reducción de la biomasa del *biofilm* fue estadísticamente significativa al compararla con el grupo control. Con T/A/T la disminución de la biomasa fue significativa tanto al compararla con el

grupo control sin tratamiento como al compararla con las monoterapias. Al igual que el otro tratamiento secuencial, A/T/A redujo de forma estadísticamente significativa la biomasa del *biofilm*, tanto al comparar con los grupos control sin tratamiento como con las monoterapias

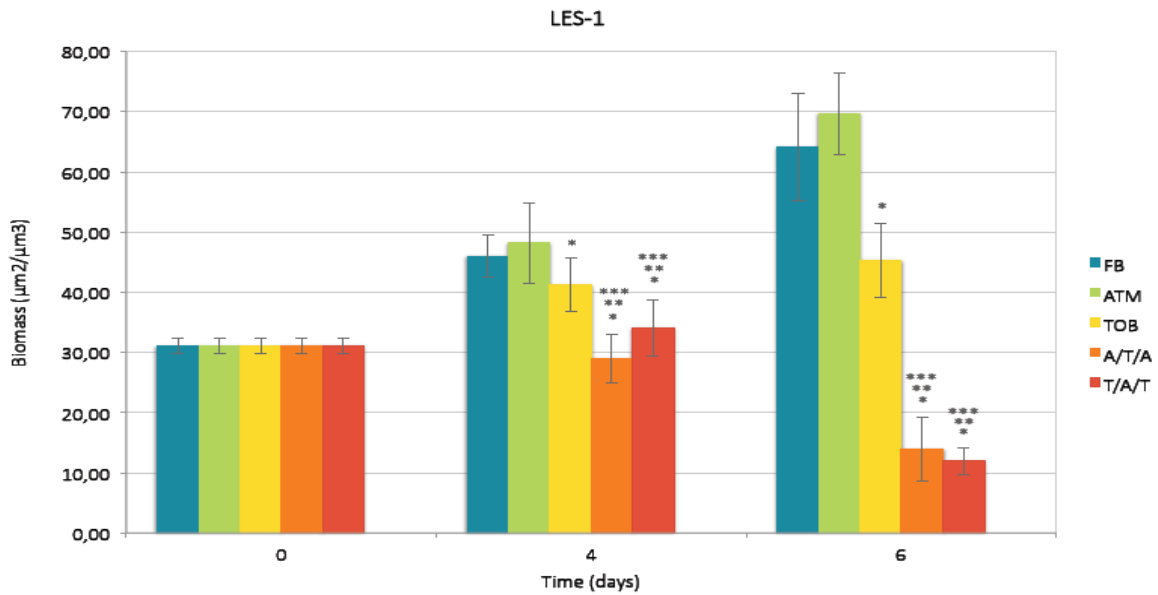


Figura 4. Análisis de la biomasa del *biofilm* formado por la cepa LES-1 bajo tratamiento antibiótico o control (FB) obtenido con el programa COMSTAT. Los resultados representan la media (barras) y la desviación estándar (barras de error) de tres experimentos independientes. \*: diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos y control. \*\*: diferencia estadísticamente significativa entre aztreonam y tratamientos secuenciales. \*\*\*: diferencia estadísticamente significativa entre tobramicina y tratamientos secuenciales.

Respecto a las imágenes obtenidas con tecnología láser confocal, en la figura 5 se puede ver como ATM no redujo la biomasa, posiblemente, debido a la gran filamentación observada en las imágenes 3D. En resumen, ATM altera la estructura del *biofilm* maduro de LES-1, sin conseguir un efecto bactericida sobre el mismo. Con TOB las imágenes 3D mostraron como el *biofilm* conservaba su estructura y cómo había células vivas (verdes) en su interior. Hecho que contrasta con los resultados mostrados en la figura 1. La explicación podría venir dada porque las células en el interior del *biofilm* están vivas, pero no son viables en estado planctónico. Con la terapia secuencial de A/T/A las imágenes 3D evidencian un efecto sinérgico del efecto bactericida y de filamentación. Con la terapia secuencial de T/A/T, las imágenes 3D evidenciaron la desestructuración del *biofilm*, así como su efecto bactericida.



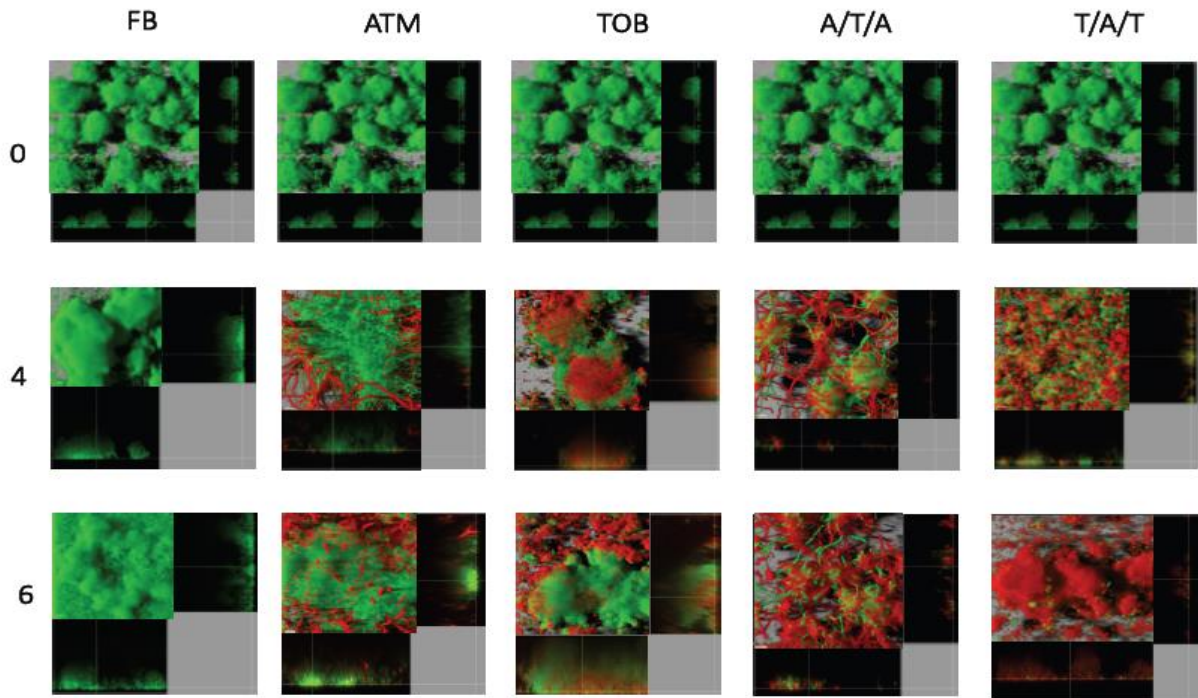


Figura 5. Imágenes tridimensionales y cortes transversales de la cepa LES-1 (marcada con GFP, verde)-como control, y *biofilm* tratado con los diferentes regímenes, y teñidos con yoduro de propidio (células muertas, rojo). Imágenes obtenidas en tres tiempos distintos: t0, t4 y t6.

1089

Como vemos en la figura 6, ATM disminuyó el número de células viables (aproximadamente 6 log en 6 días), pero no logró erradicar completamente el *biofilm*. TOB, al igual que pasa con LES-1, redujo el número de células viables por debajo del límite de detección desde t4 hasta final del tratamiento. En el tratamiento secuencial A/T/A se redujo la carga bacteriana por debajo del límite de detección desde t4 hasta el final del tratamiento. La reducción al final del tratamiento (t6), comparado con el grupo control sin tratamiento, fue de 9 log aproximadamente. En comparación con las monoterapias, este tratamiento secuencial fue muy superior al tratamiento con ATM, e igual de efectivo que la terapia con TOB. El tratamiento secuencial T/A/T redujo la carga bacteriana por debajo del límite de detección al final del tratamiento (t6). Comparando con los grupos control sin tratamiento, se redujo aproximadamente 9 log., y con las monoterapias, este tratamiento secuencial fue muy superior al tratamiento con ATM, pero no con TOB en cuanto a la erradicación de células viables.

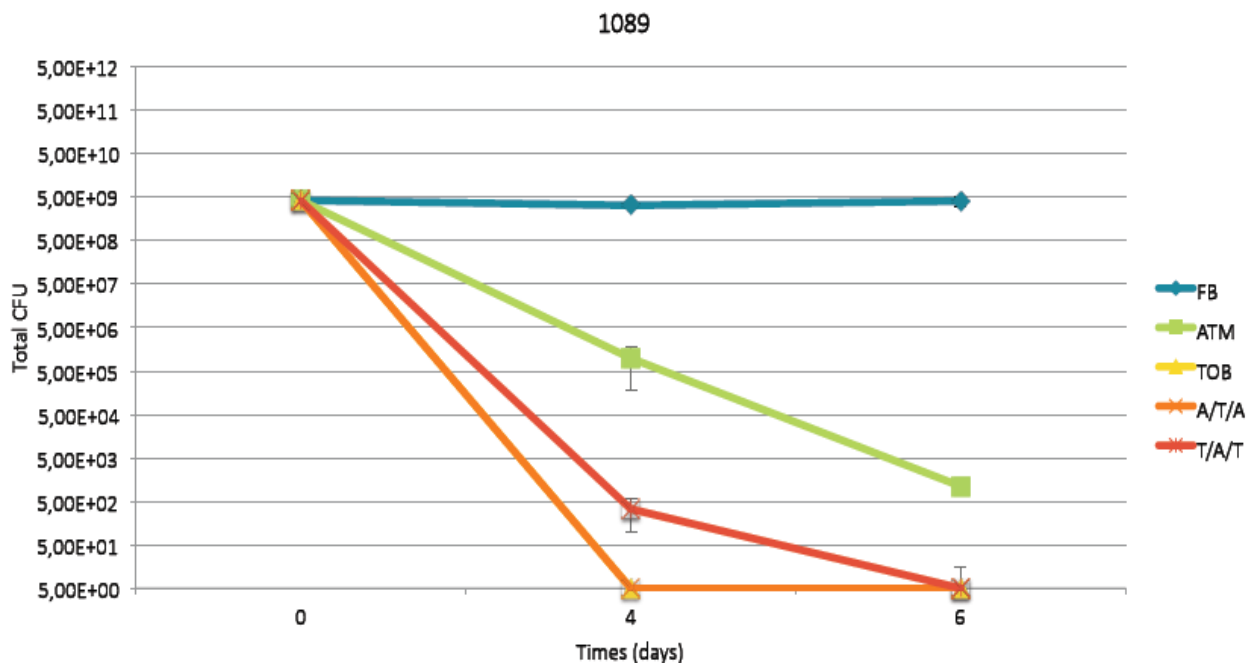


Figura 6. Dinámica poblacional de la cepa 1089. Los resultados representan las medianas (puntos) y el rango intercuartil (barras de error) de tres experimentos independientes.

Tal como vemos en las figuras 7 y 8, ATM redujo los mutantes preexistentes, hasta erradicarlos a los 6 días de tratamiento. Con el tratamiento con TOB no se seleccionaron mutantes. Y con las

terapias secuenciales, A/T/A y T/A/T, no se seleccionaron mutantes resistentes y se erradicaron los mutantes preexistentes.

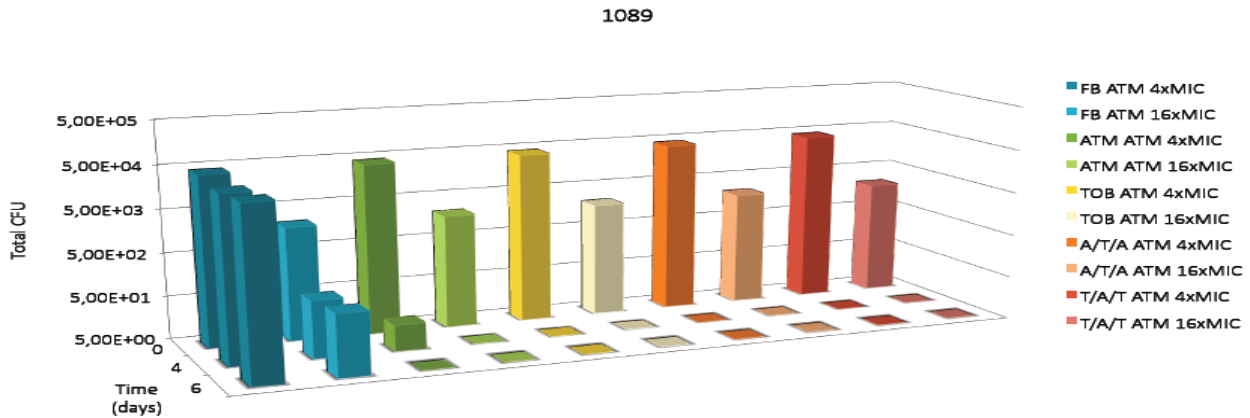


Figura 7. Dinámica en el tiempo de mutantes resistentes de la cepa 1089, a 4 y 16 veces la CMI de ATM. Los resultados representan las medianas (barras) de tres experimentos independientes.

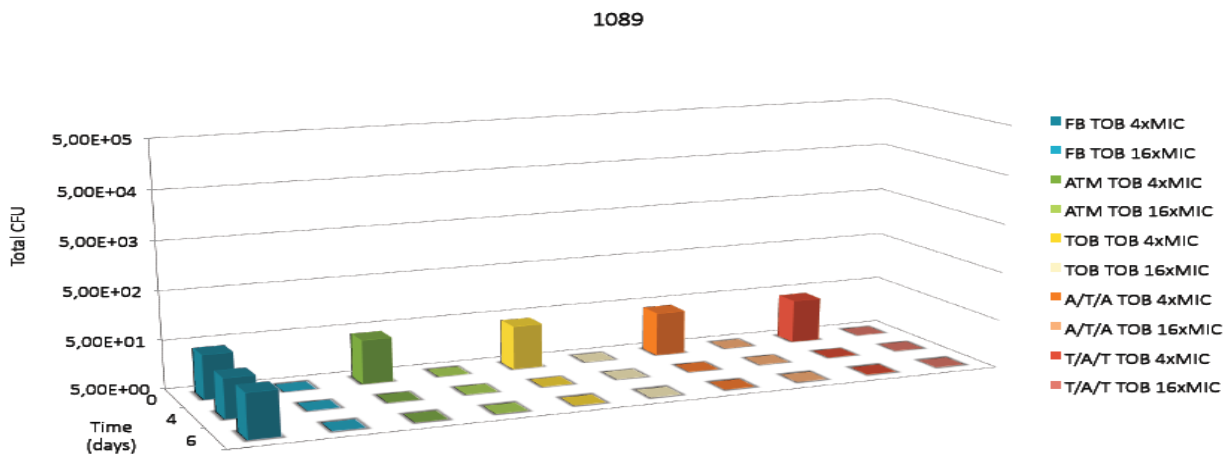


Figura 8. Dinámica en el tiempo de mutantes resistentes de la cepa 1089, a 4 y 16 veces la CMI de TOB. Los resultados representan las medianas (barras) de tres experimentos independientes.

La figura 9 muestra como con el tratamiento con ATM la reducción de la biomasa fue estadísticamente significativa. Con TOB no se evidenció una disminución de la biomasa. El tratamiento secuencial con A/T/A fue superior que la monoterapia con TOB (estadísticamente significativo a t4), pero no con ATM. La terapia secuencial T/A/T demostró una menor eficacia en

la reducción de la biomasa que la monoterapia con ATM, aunque sí fue más efectiva que la monoterapia con TOB a t4 (estadísticamente significativo).

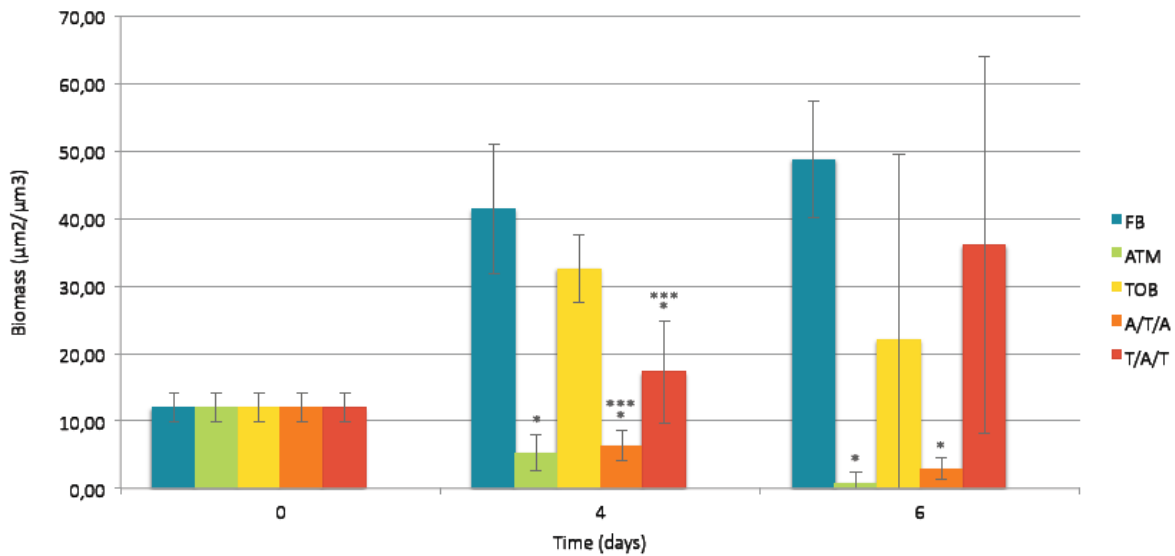


Figura 9. Análisis de la biomasa del *biofilm* formado por la cepa 1089 bajo tratamiento antibiótico o control (FB) obtenido con el programa COMSTAT. Los resultados representan la media (barras) y la desviación estándar (barras de error) de tres experimentos independientes. \*: diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos y control. \*\*: diferencia estadísticamente significativa entre aztreonam y tratamientos secuenciales. \*\*\*: diferencia estadísticamente significativa entre tobramicina y tratamientos secuenciales.

En la figura 9, se evidencia el efecto bactericida y la filamentación causada por ATM. Con el tratamiento con TOB, las imágenes 3D, de nuevo, muestran células vivas en el interior del *biofilm*. En el tratamiento secuencial A/T/A, las imágenes CLSM muestran un efecto sinérgico del efecto bactericida y de filamentación, con un aumento de la destrucción del *biofilm*. En el tratamiento secuencial T/A/T las imágenes 3D evidencian un aumento de estructuras verdes (células vivas).

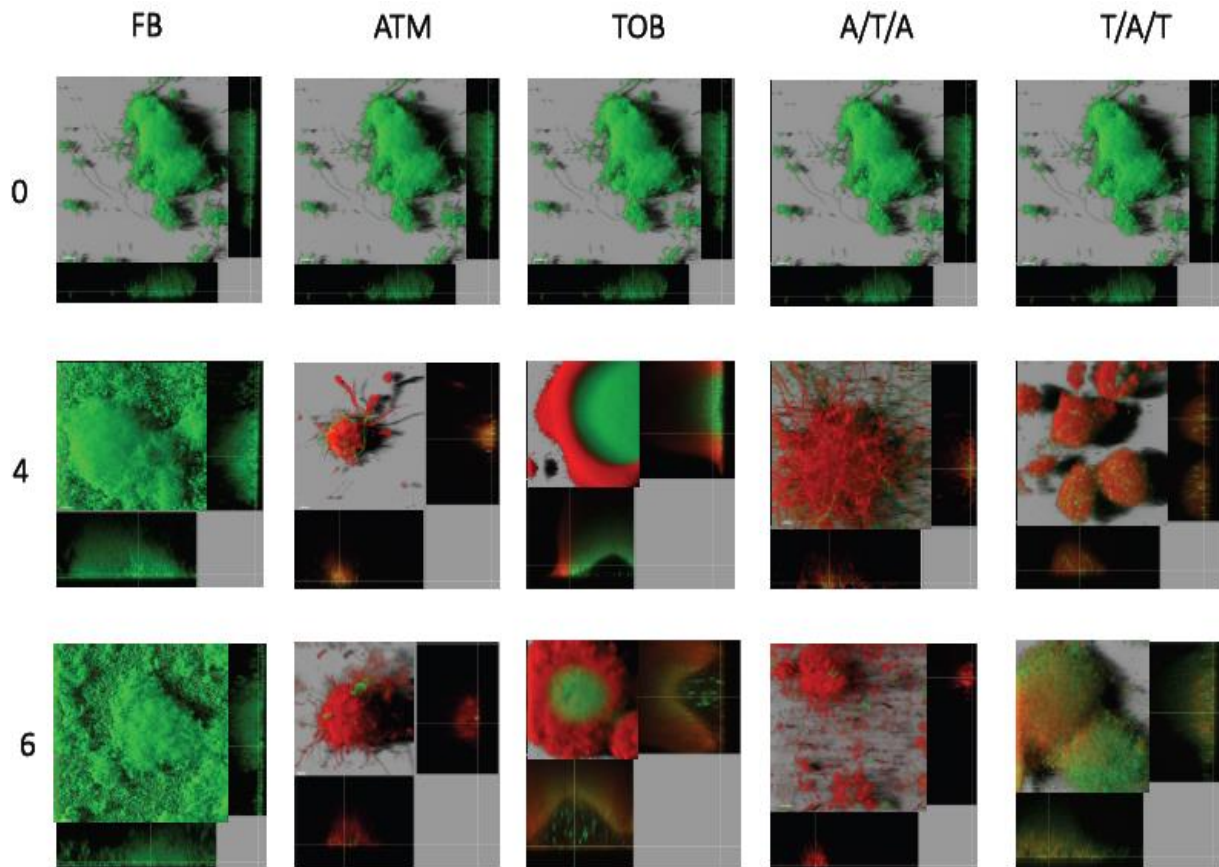


Figura 10. Imágenes tridimensionales y cortes transversales de la cepa 1089 (marcada con GFP, verde)-como control, y *biofilm* tratado con los diferentes regímenes, y teñidos con yoduro de propidio (células muertas, rojo). Imágenes obtenidas en tres tiempos distintos: t0, t4 y t6.

# CONCLUSIONES

1. El tratamiento en monoterapia con ATM redujo 3 y 6 log la carga bacteriana a los 6 días en LES-1 y 1089, respectivamente.
2. La terapia con TOB demostró reducir la carga bacteriana por debajo del límite de detección a los 6 días tanto en LES-1 como en la cepa 1089.
3. Las terapias secuenciales erradicaron las células viables a tiempo 6 en ambas cepas.
4. Los tratamientos estudiados no solo no seleccionaron mutantes resistentes, sino que eliminaron los mutantes espontáneos preexistentes.
5. Las terapias secuenciales comparadas con las monoterapias tuvieron un mayor efecto en reducción de la biomasa y mayor efecto bactericida, excepto a t6 para 1089 en la alternancia A/T/A.
6. El tratamiento con ATM provocó la filamentación de ambas cepas lo que produjo la desestructuración del *biofilm*.
7. En la reconstrucción tridimensional de las imágenes se observa una sinergia en los tratamientos secuenciales, sobre todo en T/A/T, entre la filamentación y el efecto bactericida

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



1. Cullen L, McClean S. Bacterial Adaptation during Chronic Respiratory Infections. *Pathogens*. 2015 Mar 2;4(1):66-89. doi: 10.3390/pathogens4010066)
2. Felix Ratjen, Gerd Döring. Cystic fibrosis. *The Lancet, Volume 361, Issue 9358, 22 February 2003, Pages 681-689*.
3. Bethesda, MD. Cystic fibrosis foundation patient registry. 2012 Annual data report. Cystic Fibrosis Foundation.
4. McNamara S, Buccat AM, et al. Changes in cystic fibrosis sputum microbiology in the United States between 1995 and 2008. *Pediatr Pulmonol* 2010; 45(4):363-70
5. LiPuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2010;23(2):299-323
6. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Cap 219(pag-2835-2857
7. Gerald P, Reuben R. 2010. *Pseudomonas aeruginosa*, p 2865---2890. En Mandell, Douglas y Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th ed. Churchill Livingstone, Inc, New York, NY.
8. Lynch JP. 2001. Hospital---acquired pneumonia: risk factors, microbiology, and treatment. *Chest* 119 (suppl 2): S373---S384.
9. Bernardini J, Piraino B, Sorkin M. 1987. Analysis of continous ambulatory peritoneal dialysis---related *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Am J Med* 83: 829---832.
10. Mousa HA. 1997. Aerobic, anaerobic and fungal burn wound infections. *J Hosp Infect* 37: 317---323.
11. Vincent JL. 2003. Nosocomial infections in adult intensive---care units. *Lancet* 361: 1068-2077.
12. Coburn J, Frank DW. 1999. Macrophages and epithelial cells respond differently to *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Infect Immun* 67: 3151---3154.
13. Lee VT, Smith RS, Tummler B, Lory S. 2005. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the type III secretions system in vitro and during infection. *Infect Immun* 73: 1695---1705.
14. Barbieri JT, Sun J. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 152: 79---92.
15. Philips Rm, Six DA, Dennis EA. 2003. In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mamalian cells with phospholipase A2 inhibitors. *J Biol Chem* 278: 41326---41332.
16. Sato H, Frank DW. 2004. ExoU is a potent intracelular phospolipase. *Mol Microbiol* 53:1279---1290.

17. Jacob T, Lee RJ, Engel JN. 2002. Modulation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration in airway epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 70: 6399--6408.
18. Poole K, Srikumar R. **Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance.** *Curr Top Med Chem*. 2001 May;1(1):59-71. **Review.**
19. Moreau-Marquis S, Stanton BA, O'Toole GA. *Pseudomonas aeruginosa biofilm* formation in the cystic fibrosis airway. A short review. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2008;21(4):595-599. doi:10.1016/j.pupt.2007.12.001.
20. E. Rojo-Molinero and A. Oliver. Antimicrobial susceptibility testing in *biofilm*-growing bacteria *Clin Microbiol Infect*. 2014 Oct;20(10):981-90. doi: 10.1111/1469-0691.12651
21. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56: 187–209.
22. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987; 41: 435–464.
23. Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Bacterial communications in implant infections: a target for an intelligence war. *Int J Artif Organs* 2007; 30: 757–763.
24. Wolcott RD, Rhoads DD, Bennet ME et al. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *J Wound Care* 2010; 19: 45–46, 48–50, 52–53.
25. Bjarnsholt T, Jensen PO, Fiandaca MJ et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol* 2009; 44: 547–558.
26. Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000; 288: 1251–1254.
27. Macia MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Pérez JL, Oliver A. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3382–3386.
28. Sousa AM, Pereira MO. *Pseudomonas aeruginosa* Diversification during Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs—A Review. *Pathogens*. 2014;3(3):680-703. doi:10.3390/pathogens3030680.
29. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318–1322.
30. Bjarnsholt T, Jensen PO, Burmolle M et al. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology* 2005; 151: 373–383.
31. Alhede M, Kragh KN, Qvortrup K et al. Phenotypes of non-attached *Pseudomonas aeruginosa* aggregates resemble surface attached biofilm. *PLoS ONE* 2011; 6: e27943.

32. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9: 34–39.
33. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167–193.
34. Alipour M, Suntres ZE, Omri A. Importance of DNase and alginate lyase for enhancing free and liposome encapsulated aminoglycoside activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 317–325.
35. De Beer D, Srinivasan R, Stewart PS. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 4339–4344.
36. Bjarnsholt T, Ciofu O, Molin S, Givskov M, Hoiby N. Applying insights from biofilm biology to drug development—can a new approach be developed? *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12: 791–808.
37. Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs* 2005; 28: 1062–1068.
38. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 711–745.
39. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35: 322–332.
40. Werner E, Roe F, Bugnicourt A et al. Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 6188–6196.
41. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 999–1007.
42. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol* 2010; 64: 357–372.
43. Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 2001; 413: 860–864.
44. Macia MD, Perez JL, Molin S, Oliver A. Dynamics of mutator and antibiotic-resistant populations in a pharmacokinetic/pharmacodynamics model of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 5230–5237.
45. Lujan AM, Macia MD, Yang L, Molin S, Oliver A, Smiana AM. Evolution and adaptation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms driven by mismatch repair system-deficient mutators. *PLoS ONE* 2011; 6: e27842.
46. Conibear TC, Collins SL, Webb JS. Role of mutation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *PLoS ONE* 2009; 4: e6289.
47. Boles BR, Singh PK. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 12503–12508.
48. Driffield K, Miller K, Bostock JM, O'Neill AJ, Chopra I. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 1053–1056.

49. Vettoretti L, Plésiat P, Muller C, El Garch F, Phan G, Attrée I, Ducruix A, Llanes C. Lucie Efflux Unbalance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 May;53(5):1987-97.
50. Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 2000; 146 (Pt 10):2395-407.