



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

**Caracterización de los perfiles de sensibilidad a
proteínas inmunes innatas cuya diana es la
envoltura bacteriana (BPI y sistema del
complemento) de cepas de *Pseudomonas
aeruginosa* procedentes de infección aguda vs
infección crónica**

Sara Tur Gracia

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2017-18

Treball tutelat per Carlos Juan Nicolau
Departament de Biologia

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

Pseudomonas aeruginosa, bacterièmia, fibrosis quística, BPI, sistema del complemento, supervivència.

Índice

1. Resumen.....	2
2. Introducción.....	3
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
2.1.1 Características generales.....	3
2.1.2 Factores de virulencia.....	5
2.1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y fibrosis quística.....	6
2.2 La proteína inductora de la permeabilidad bacteriana (BPI).....	8
2.2.1 La BPI en neumonía.....	10
2.2.2 La BPI en fibrosis quística.....	11
2.3 Sistema del complemento.....	13
2.3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vs Sistema del complemento.....	14
3. Hipótesis y objetivos.....	17
4. Materiales y métodos.....	17
4.1 Colecciones bacterianas.....	17
4.2 Ensayo de supervivencia al sistema del complemento.....	18
4.3 Ensayo de supervivencia a la BPI.....	19
4.4 Análisis estadístico.....	20
5. Resultados.....	20
5.1 Ensayo de supervivencia al sistema del complemento.....	20
5.2 Ensayo de supervivencia a la BPI.....	21
6. Discusión.....	22
6.1. Ensayo de supervivencia al sistema del complemento.....	22
6.2 Ensayo de supervivencia a la BPI.....	26
7. Conclusión.....	27
8. Referencias.....	28

1. Resumen

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram Negativa responsable de la mayor parte de infecciones oportunistas hospitalarias, siendo de gran importancia por ejemplo la infección aguda causada en pacientes con respiración asistida entre otras. Éstas habitualmente se pueden diseminar a la sangre (bacteriemia), con obvias y dramáticas consecuencias para el paciente; más aún, teniendo en cuenta el alto grado de resistencia que muestra *P. aeruginosa* a los antibióticos.

Además, se ha observado que esta bacteria también es la principal causa de infección pulmonar en pacientes con fibrosis quística, enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por la producción de una mucosidad alterada, con osmolaridad y densidad anormal. El tipo de infección provocada en estos pacientes es de carácter crónico y se ha visto que *P. aeruginosa* sufre toda una serie de adaptaciones a lo largo de dicha infección causando, por ejemplo, la citada adquisición de resistencia a diversos antibióticos, lo que provoca que sea muy difícil erradicar este tipo de infecciones.

En estas cepas también se producen otros cambios fisiológicos que permiten que sobrevivan en un hábitat tan particular como el pulmón con fibrosis quística, con características de pobre difusión de gases, nutrientes y elementos inmunitarios. Se ha propuesto que estas adaptaciones fisiológicas podrían tener contrapartidas que se traducirían en un aumento en la sensibilidad a diferentes componentes del sistema inmune.

En este trabajo pretendimos comprobar si esta idea podría ser cierta en cuanto a dos componentes básicos del sistema inmune innato, como son el sistema del complemento y la proteína inductora de la permeabilidad bacteriana (BPI) en concreto. Así, se compararon las sensibilidades frente a estos elementos en dos amplias colecciones de cepas clínicas de *P. aeruginosa*, procedentes de bacteriemia (infección aguda) vs fibrosis quística (crónica), con el fin de ver si las cepas de fibrosis quística pueden mostrar adaptaciones que las acaban haciendo más sensibles a los mencionados componentes inmunitarios (de los cuales quedarían protegidas gracias al particular hábitat del pulmón con fibrosis quística), y si estas adaptaciones se hacen más patentes a medida que avanza el tiempo durante el proceso crónico.

Por otro lado, el estudio tiene interés descriptivo en sí mismo, pues nunca antes se han evaluado estos parámetros en colecciones tan amplias de cepas clínicas de *P. aeruginosa*. Nuestros resultados muestran una mayor sensibilidad media de las cepas de fibrosis quística al complemento, en comparación con las cepas de bacteriemia al contrario de lo que ocurre con la sensibilidad ante BPI, bastante baja en ambas colecciones. Por otra parte, destacan algunas cepas puntuales con una especial sensibilidad a complemento y/o BPI.

A falta de conocer las bases genéticas y moleculares que sustentan el incremento en la sensibilidad al complemento / BPI de algunas de las cepas de este estudio, parece claro que éstas sufren modificaciones que, a cambio de mejorar su adaptación, disminuirían su resistencia a estos elementos de nuestro sistema inmune innato. Hallar las bases responsables de este incremento de sensibilidad podría revelar nuevas dianas atacables por fármacos a ser desarrollados en el futuro, que permitirían que el sistema inmunitario volviera a ser un aliado defensivo válido en el contexto de una infección por *P. aeruginosa*.

2. Introducción

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.1 Características generales

Pseudomonas es un género de bacterias que se incluye dentro de la familia *Pseudomonaceae* y cuyas especies se caracterizan por ser bacilos Gram Negativos rectos o ligeramente curvados. Todas las especies que se engloban dentro de este género son aerobias estrictas y móviles gracias a la presencia de flagelos polares. Cabe destacar que también son catalasa y oxidasa positivos. Aunque este conjunto de especies no es capaz de fermentar ningún azúcar, sí que tiene la habilidad de usarlos para obtener energía a partir del metabolismo oxidativo (Delgado-Iribarren, et al., 1994).

La especie más destacable de este género es *Pseudomonas aeruginosa* ya que es la que más comúnmente provoca infecciones sobre los seres humanos, tema que se ampliará a continuación. Se trata de un patógeno oportunista que puede llegar a provocar la muerte de sus huéspedes, dependiendo del tipo de infección (Robbins, et al., 2015).

Pseudomonas aeruginosa es capaz de crecer en muchos ambientes diferentes, cosa que hace que sea fácilmente aislable en el laboratorio, tanto en medios enriquecidos como en medios no enriquecidos (Lovewell, et al., 2014).

Por otro lado, suele presentar un único flagelo polar y es capaz de usar tanto la glucosa como la xilosa y, en algunas ocasiones, la maltosa como sustratos para el metabolismo oxidativo (Mahon, et al., 1995). Además, es la única especie del género *Pseudomonas* capaz de producir pirocianina, un pigmento fácilmente observable sobre las placas de cultivo, otorgando a las colonias un característico color azulado-verdoso (Delgado-Iribarren, et al., 1994). Es destacable también la habitual capacidad beta-hemolítica de este microorganismo sobre el agar sangre (Mahon, et al., 1995).

En cuanto a las enfermedades producidas en el ser humano, *P. aeruginosa* puede realizar dos tipos principales de infección, aguda y crónica. La mayoría de las infecciones agudas provocadas por este microorganismo se producen en el ámbito hospitalario en personas que sufren algún tipo de inmunodeficiencia o quemadura. Además, es común encontrar también infecciones provocadas por *P. aeruginosa* en pacientes bajo algún tipo de tratamiento invasivo, ya sean catéteres, sondas urinarias y, sobretodo, ventilación mecánica. En este último grupo de pacientes se produce un tipo de infección llamada “*ventilator-associated pneumonia*” o VAP que suele aparecer después de permanecer durante 48-72 horas con ventilación asistida. La cantidad de pacientes afectados varía según el hospital y las características del propio paciente pero se estima que esta infección incrementa un 24-76% la probabilidad de muerte del paciente, siendo este porcentaje aún mayor en pacientes que se encuentran en estado crítico (Robbins, et al., 2015; Charles, et al., 2014).

La VAP provoca un obvio incremento del tiempo de permanencia de los pacientes en la UCI lo que es un problema también a nivel económico. Es importante saber también que un diagnóstico temprano de esta patología puede ayudar a erradicarla de forma más eficaz, proporcionando un antibiótico efectivo contra la bacteria causante (Charles, et al., 2014).

A parte de estas infecciones nosocomiales, *P. aeruginosa* también puede provocar infecciones agudas (generalmente de poca importancia) fuera del hospital en diferentes partes del cuerpo como otitis, foliculitis o infección ocular (Morita, et al., 2014).

Por otro lado, este microorganismo es capaz de sufrir toda una serie de cambios fenotípicos gracias a la selección de mutaciones, que provocan que las infecciones que causa sean difíciles de erradicar o tratar y, en algunos casos, se vuelvan infecciones crónicas. Entre las infecciones crónicas causadas por este microorganismo destaca la que sufren los pacientes que presentan fibrosis quística y otras enfermedades respiratorias crónicas, circunstancia que se explicará más adelante (Balasubramanian, et al., 2015).

2.1.2 Factores de virulencia

La mencionada gran variedad de infecciones causadas por *P. aeruginosa* es debida a la presencia de multitud de factores de virulencia, de los cuales aquí se revisarán sólo los más importantes. *P. aeruginosa* es capaz de adherirse a las células epiteliales y a las secreciones mucosas del pulmón gracias a la presencia de multitud de mecanismos de adhesión, entre los cuales se halla el propio lipopolisacárido (LPS), el flagelo, y determinadas estructuras fimbriales denominadas pili. El LPS, además, es un conocido factor de virulencia que se caracteriza por su inmunogenicidad y capacidad pro-inflamatoria (de hecho se conoce también como endotoxina), además de conferir integridad estructural y defensiva ante la difusión de determinados ataques químicos (ciertos antibióticos) e inmunológicos, como se verá posteriormente.

Los flagelos y pili participan además en la capacidad de motilidad de la bacteria, que también obviamente contribuye a la virulencia (Delgado-Iribarren, et al., 1994, Robbins, et al., 2015). Además, una vez en el cuerpo humano, *P. aeruginosa* secreta diversas exotoxinas entre las que destacan la A y la S. La exotoxina A provoca necrosis de los tejidos del huésped mientras que la exotoxina S tiene la función de alterar la organización del citoesqueleto celular así como de eliminar las inmunoglobulinas G y A, cosa que ayuda a la resistencia de este microorganismo a la opsono-fagocitosis mediada por macrófagos y otros fagocitos. La presencia de estas exotoxinas se asocia con los signos y síntomas que se observan en pacientes que sufren de sepsis (Ben Haj Khalifa, et al., 2011).

A parte de la secreción de exotoxinas, la bacteria también secreta fosfolipasa C, provocando la lisis de los hematíes y la destrucción del surfactante pulmonar de los pacientes, así como elastasa, que degrada la matriz extracelular del tejido afectado (facilitando la diseminación de la infección) junto con los anticuerpos presentes del tipo IgG.

Por otro lado, *P. aeruginosa* tiene la capacidad de segregar un exopolisacárido mucoide llamado alginato, siendo la producción del mismo comúnmente mayor en cepas de pacientes con fibrosis quística, gracias a la selección de mutantes. Este exopolisacárido mucoide protege a la bacteria frente a la llegada de los anticuerpos, el sistema del complemento, la fagocitosis y los antibióticos. La hiperproducción de alginato es pues uno de los motivos que favorecen la presencia crónica de la bacteria en pacientes con fibrosis quística, incluso durante décadas, lo cual acaba provocando una insuficiencia respiratoria crónica que puede causar su muerte (Robbins, et al., 2015).

Para acabar, es destacable la formación, por parte de *P. aeruginosa*, de sideróforos, moléculas con alta afinidad para secuestrar el hierro, entre los que destaca la pioverdina (que también es un pigmento típico de *P. aeruginosa*). Ello permite el crecimiento de la bacteria en condiciones de poca disponibilidad de hierro libre, como las que se hallan en el hospedador de la infección (Ben Haj Khalifa, et al., 2011).

2.1.3 Pseudomonas aeruginosa y fibrosis quística

La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por la presencia de un defecto en un canal de cloro localizado en la membrana de las células (denominado CFTR), cosa que provoca multitud de efectos, entre ellos, la producción de moco muy espeso y con osmolaridad alterada, difícil de eliminar (Rimoin, et al., 2013). Este moco se acumula en diversas partes del cuerpo, entre las que destaca el pulmón, provocando un cambio en sus características que acaban favoreciendo la infección por parte de diferentes especies, pero sobre todo de *P. aeruginosa*.

La infección pulmonar por *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística suele ser crónica ya que el patógeno queda en cierta manera protegido ante el acceso de determinados componentes del sistema inmune (fagocitos, complemento, anticuerpos, etc.), gracias al citado moco tan espeso que dificulta su difusión. A ello también contribuye la forma de vida en biofilm que adquiere *P. aeruginosa* en este contexto, que no es más que una comunidad muy compleja, en forma de película, que queda envuelta por el citado alginato, producido en gran cantidad en las cepas propias de fibrosis quística.

Esto se debe a mutaciones que se acaban seleccionando, y que causan una sobre-producción de este polímero, otorgando a las colonias un aspecto mucoso. Gracias a ello, y a la selección de mutaciones en el tiempo, *P. aeruginosa* adquiere resistencia a una gran variedad de antibióticos así como cambios en la composición del LPS y otros componentes de las envolturas celulares, como el peptidoglucano (Lorè, et al., 2012). Estos cambios parecen disminuir su capacidad pro-inflamatoria, lo cual contribuiría a que la bacteria sea menos inmunogénica y pase más desapercibida para el sistema inmune, favoreciendo su establecimiento crónico (Cigana, et al., 2009).

Además, es habitual en pacientes de fibrosis quística el aislamiento de cepas de morfología puntiforme, también llamadas colonias enanas o "*small colony variants*", de crecimiento muy lento que tienen mayor capacidad de formar biofilms y resistencia a multitud de antibióticos. La presencia de este tipo de cepas en el esputo de los pacientes es un mal pronóstico clínico. Las bases moleculares del establecimiento de este fenotipo aún no se conocen con exactitud, pero se cree que está relacionado con la elevación de los niveles de ciclina di-GMP intracelular (Evans, 2015). La ciclina di-GMP es un segundo mensajero muy importante en vías de señalización bacteriana para cambiar de un fenotipo móvil a un fenotipo no móvil, con mayor capacidad de formar biofilms (Valentini, et al., 2016).

Otro evento destacable es precisamente la pérdida de movilidad de las cepas de *P. aeruginosa* que provocan infección crónica. Se ha observado que muchas de las cepas aisladas de pacientes con fibrosis quística son no móviles y resistentes a la fagocitosis por macrófagos. Los aislados iniciales sí que presentan gran movilidad y expresan tanto flagelo como pili. En cambio, los aislados tardíos dentro del proceso crónico no suelen tener flagelo o bien, éste es inmóvil. Se hipotetiza que el fenotipo no móvil puede dotar a *P. aeruginosa* de una ventaja de supervivencia en la infección crónica ya que hace que no sea fagocitada y conserve energía (Mahenthiralingam, et al., 1994).

Esta infección crónica, en la que se intercalan episodios puntuales de exacerbación inflamatoria y de sobre-crecimiento de *P. aeruginosa*, provoca que la función pulmonar de los pacientes de fibrosis quística sea cada vez menor, acortando su esperanza de vida (Hraiech, et al., 2015).

Por este motivo, es muy importante detectar la presencia de esta bacteria lo antes posible ya que se ha observado que una detección y tratamiento precoz disminuye las probabilidades de que la colonización se vuelva crónica (Cantón, et al., 2014).

Hoy en día, el grupo de antibióticos más usados contra este patógeno son los β -lactámicos pero continuamente se aíslan, en pacientes que padecen fibrosis quística, cepas resistentes a éstos. La consecuencia de este hecho es la imposibilidad de dar un tratamiento efectivo a estos pacientes ya que se reduce progresiva y enormemente el abanico de fármacos útiles para eliminar a estas cepas. Por tanto, se debe seguir investigando para encontrar nuevas dianas terapéuticas para poder hacer frente a las infecciones que provoca *P. aeruginosa* en el contexto de la fibrosis quística, pero también en el contexto de la infección oportunista aguda, en donde el problema de la resistencia a antibióticos no es menor. (Balasubramanian, et al., 2015).

2.2 La proteína inductora de la permeabilidad bacteriana (BPI)

Son muchos los sistemas de defensa que presenta el sistema inmunitario contra los patógenos como *P. aeruginosa*. Una de estas defensas son los leucocitos polimorfonucleares (PMN, o también llamados granulocitos), células que forman parte del sistema inmunitario innato. Éstas son esenciales para la defensa del organismo frente a las infecciones bacterianas y pueden ser de tres tipos: neutrófilos, eosinófilos y basófilos, siendo los primeros los que mayor peso específico tienen en la defensa antibacteriana (Mannion, et al., 1989).

Los PMNs en general y los neutrófilos en particular son los tipos de células leucocitarias predominantes en la sangre. Presentan un núcleo multilobulado, multitud de gránulos en su citoplasma y, precisamente, según el pH del colorante con el que se tiñan esos gránulos, obtenemos la previamente citada clasificación en neutrófilos, basófilos y eosinófilos.

Estos gránulos pueden ser de dos tipos, primarios o secundarios. Los gránulos primarios contienen proteínas antimicrobianas pre-formadas como mieloperoxidasa (MPO), defensinas y BPI. Por otro lado, los gránulos secundarios contienen proteínas más específicas que se suelen sintetizar *de novo* tras un estímulo, como lactoferrina, lisozima o fosfatasa alcalina (Delves, et al., 2012).

Con tal de realizar su función, los PMNs son capaces de fagocitar a los microorganismos y de liberar dentro del fagosoma el contenido de sus gránulos, tanto de los primarios como de los secundarios, para provocar su muerte (Mannion, et al., 1989). Además, la liberación del contenido granular puede ser también hacia el exterior celular, con idéntica finalidad microbicida.

Una de las proteínas más importantes que liberan los PMNs es la ya citada BPI que, en determinadas condiciones, puede ser sintetizada y secretada por ciertos epitelios (Holweg, et al., 2011). Se trata de una proteína catiónica, altamente citotóxica para bacterias Gram negativas que se une a la membrana de este tipo de microorganismos (Mannion, et al., 1989). Esta proteína, para poder realizar su función, necesita unirse a la membrana bacteriana. Una vez unida, crea poros sobre esta membrana haciendo que la bacteria pierda el equilibrio osmótico y muera por lisis (Weiss, et al., 1984).

Cabe destacar que esta proteína tan solo es efectiva frente a bacterias Gram negativas, no tiene efectos sobre las bacterias Gram positivas o sobre células eucariotas. Esta unión selectiva a bacterias Gram negativas es debida a que la proteína se une con gran afinidad a la membrana externa de estas bacterias, en concreto al LPS. Así, tan solo aquellas bacterias que contienen LPS son sensibles a esta proteína. Además, según la composición específica del LPS, las bacterias serán más o menos sensibles a BPI.

Cabe destacar que la presencia de otras proteínas que forman parte de los gránulos de los PMNs no interfieren en la función de esta proteína, aunque BPI sí que es capaz de inhibir la unión de otras proteínas a la membrana de las bacterias de Gram negativas. Concretamente, se observó que la presencia de BPI inhibía la unión de MPO a la membrana de *Escherichia coli* (Mannion, et al., 1989).

La expresión de BPI está conservada en muchas especies y su peso molecular es de 55-60 kDa aproximadamente. La cristalización con rayos X mostró que presenta dos dominios funcionales. El dominio N-terminal es el llamado catiónico y es el que presenta actividad bactericida y de unión al LPS. Cabe destacar que la afinidad de unión de la BPI al LPS es incluso mayor que la que presenta la proteína de unión al LPS (LBP), que también forma parte del sistema inmune innato (Holweg, et al., 2011).

La membrana externa de los Gram Negativos, tras la unión con la BPI, empieza a presentar ligeros cambios estructurales ya después de unos 30 segundos. Por otro lado, la membrana interna de las bacterias se mantiene intacta hasta 30-60 minutos después del contacto de la proteína con la membrana externa.

Las bacterias a las que se les ha unido la BPI son capaces de seguir sintetizando moléculas hasta una hora después de dicha unión con la membrana, siendo capaces incluso de recuperar la permeabilidad correcta de las membranas si la BPI se retira. Para retirar la BPI se necesita tripsina o altas concentraciones de magnesio.

Aun así, se ha observado que esta reparación depende de la temperatura y del tiempo puesto que, si el daño es muy elevado, la reparación no es posible. Por tanto, observamos que la interacción de la BPI con el LPS es crucial para las perturbaciones causadas por dicha BPI (Weiss, et al., 1984).

La protección por el sistema inmune y concretamente por la BPI, es especialmente importante en los pulmones ya que estos están expuestos de manera frecuente a multitud de patógenos diferentes, al ser una puerta de entrada abierta al medio exterior a través de las vías respiratorias superiores. Además, el epitelio respiratorio es el epitelio más grande del cuerpo para que se pueda llevar a cabo el intercambio de gases de manera correcta. Por este motivo, es frecuente la aparición de neumonías y otras patologías, contra las cuales, el papel de la BPI resulta esencial (Holweg, et al., 2011).

2.2.1 La BPI en neumonía

En personas sanas, las partículas y los patógenos que se inhalan no suelen llegar a los pulmones ya que son atrapadas en las capas mucosas de la parte superior del tracto respiratorio. Este moco, juntamente con las células ciliadas, eliminan mecánicamente estas partículas del tracto respiratorio haciendo que el organismo las expectore o las trague.

Aun así, algunos microorganismos son capaces de pasar esta barrera mecánica y llegar a los alveolos, donde se enfrentan a multitud de moléculas antimicrobianas entre las que destaca la BPI (Figura 1A).

Una vez se ha reconocido el patógeno se produce una infiltración masiva de neutrófilos (que caracteriza la primera fase de la neumonía aguda), como la BPI está presente en los gránulos preformados de estos PMNs, se secreta rápidamente siendo, junto a otras como la MPO o las defensinas, una de las moléculas imprescindibles para la lucha contra los microorganismos.

Se ha visto que *P. aeruginosa* es una bacteria en principio muy sensible a la actividad de la BPI, por tanto, esta molécula puede jugar un papel importante en las infecciones provocadas por dicho microorganismo. En relación a ello, los neutrófilos también son capaces de secretar parte de su cromatina descondensada, que sale junto a proteínas antimicrobianas, capturando las bacterias en la llamada NET (trampas extracelulares de neutrófilos). Esta estructura provoca que la concentración de proteínas antimicrobianas, entre ellas la BPI, se encuentre muy elevada en un punto en concreto, cosa que favorece la destrucción de las bacterias en dicho punto.

Durante infecciones agudas del tracto respiratorio, la BPI hace también una función reguladora, neutralizando los efectos proinflamatorios de las endotoxinas (LPS) liberadas por las bacterias Gram negativas. Además, es capaz de conducir a estas bacterias a las células dendríticas, promoviendo la presentación de antígeno y, por tanto, activando la respuesta inmune adaptativa (Holweg, et al., 2011).

2.2.2 La BPI en fibrosis quística

Debido a las características alteradas del epitelio pulmonar en los pacientes que presentan esta patología, las vías respiratorias de estas personas son más proclives a padecer infecciones bacterianas y fúngicas de manera crónica, como se ha mencionado anteriormente.

La bacteria que afecta en mayor medida a los pacientes de fibrosis quística es *P. aeruginosa*. La infección por esta bacteria en pacientes con fibrosis quística está caracterizada por ser de tipo crónico de baja intensidad, aunque muy difícil de erradicar mediante terapia antibiótica, a la que suele desarrollar resistencia por selección de mutaciones. Sin embargo, el proceso crónico se intercala con episodios agudos periódicos, caracterizados por exacerbaciones inflamatorias y de sobre-crecimiento de la bacteria, que se relaciona con un empeoramiento súbito de la función pulmonar que pone en riesgo la vida del paciente.

En estos pacientes se observa en la mucosa pulmonar la presencia masiva de proteínas antimicrobianas como la BPI, así como de un gran número de neutrófilos y NETs, que parecen contribuir a la inflamación crónica del epitelio. Aun así, bacterias como *P. aeruginosa* escapan a esta respuesta del sistema inmune y a diversos antibióticos mediante estrategias de evasión como las que se destacaban en el apartado 2.1.2 (y figura 1B), principalmente basadas en la propia mucosidad y el modo de vida en biofilms, así como ciertas modificaciones que pueden incluir al propio LPS que, como se ha visto, es precisamente el ligando de la BPI.

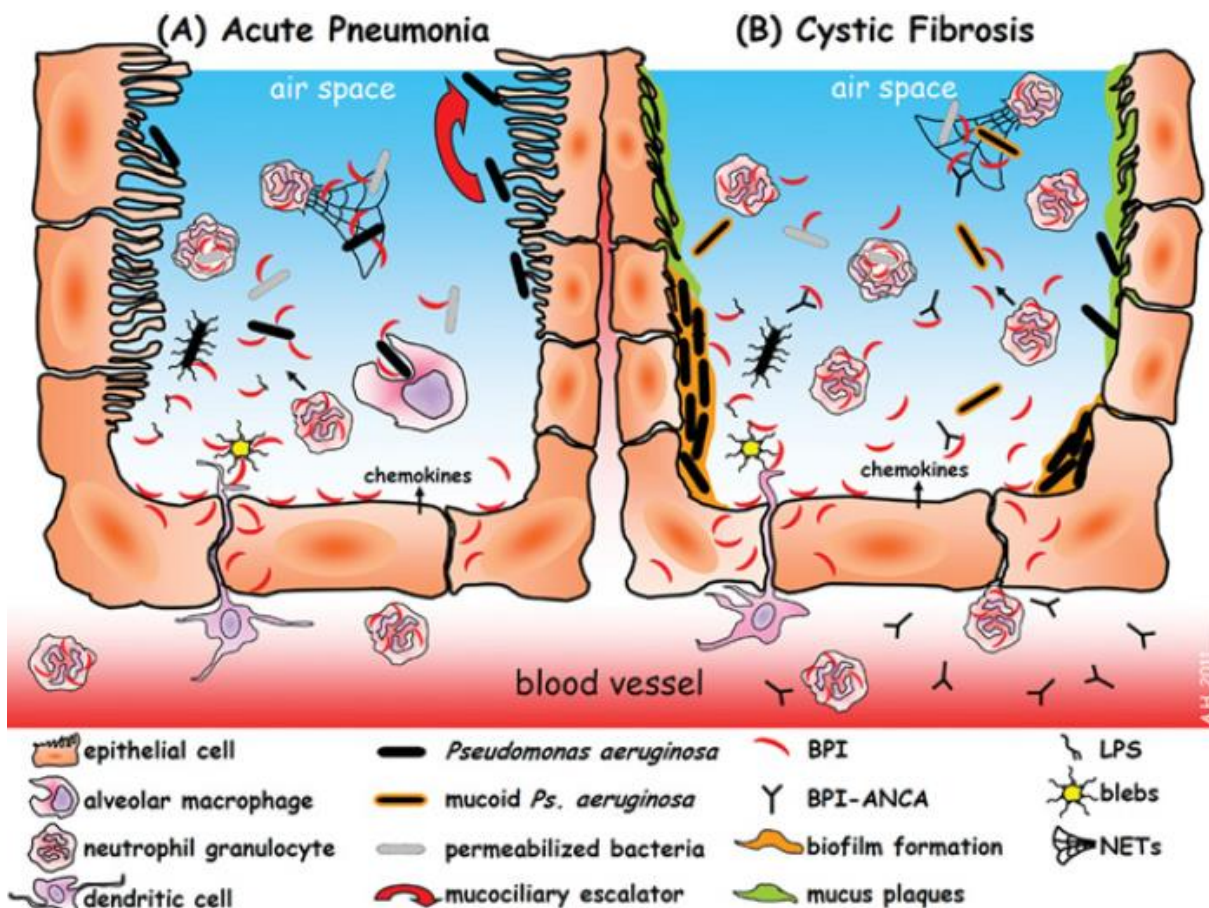


Figura 1. Modelo de las funciones de la BPI y otros elementos del sistema inmune en el pulmón durante infección aguda (neumonía) (A) e infección crónica (fibrosis quística) (B) (Holweg, et al., 2011).

Una consecuencia muy importante de la infección crónica por este microorganismo es el desarrollo de anticuerpos contra los neutrófilos, en concreto contra componentes citoplasmáticos de los mismos (ANCA), probablemente debido a la infiltración masiva, continua y anormal de este tipo celular en el epitelio respiratorio.

La presencia de estos anticuerpos dificulta la función de los mismos contribuyendo, entre otros factores, a que los neutrófilos ya no puedan eliminar a *P. aeruginosa*. Estos anticuerpos se forman debido a la inflamación y a la desgranulación constante de los neutrófilos. Se ha visto que estos ANCA podrían ser capaces de atacar también a la BPI, haciendo que ésta no sea funcional, lo cual contribuiría a la presencia crónica no erradicable de las bacterias. Además, los ANCA también contribuyen a la inflamación crónica del epitelio respiratorio en estos pacientes (Holweg, et al., 2011).

Si los ANCA contribuyesen a entorpecer la acción de la BPI, parece plausible que *P. aeruginosa*, en el contexto de la fibrosis quística, pueda permitirse el lujo de acumular mutaciones que le hagan perder la capacidad de resistencia ante la BPI, a cambio naturalmente de obtener ciertos beneficios fisiológicos necesarios para poder persistir en un hábitat tan particular.

2.3 El sistema del complemento

El sistema del complemento es un conjunto de unas 20 proteínas plasmáticas que forman parte del sistema inmune innato y son sintetizadas en gran parte por el hígado y los macrófagos. Se trata, en su mayoría de zimógenos, proenzimas que en condiciones normales se encuentran desactivadas, y que destacan por ser muy termolábiles. Los elementos que forman parte de este sistema del complemento se encuentran en gran concentración en la sangre, aunque también se pueden encontrar en secreciones mucosas en concentraciones más bajas.

Su forma de actuación es en cascada, motivo por el cual también se le llama cascada del complemento. Esto significa que, cuando una proteína se activa, es capaz de activar a la siguiente. La mayor parte de las proteínas son proteasas y, para activarse, sufren una escisión proteolítica por parte de la proteína inmediatamente anterior en la vía.

Hay 3 vías que forman parte del sistema del complemento, cada una de ellas con compuestos comunes pero también con compuestos exclusivos: vía clásica, vía de las lectinas y vía alternativa. Cabe destacar que el final de las vías es común en los tres casos (vía lítica), y se produce un complejo proteico con la capacidad de incluirse en las envolturas celulares de las bacterias Gram negativas formando un poro en éstas.

Este poro, también denominado complejo de ataque a la membrana (CAM) tiene como función alterar el equilibrio osmótico de las bacterias, provocando su lisis directa. Las bacterias Gram positivas son inmunes al CAM, gracias a su grueso peptidoglucano.

La activación del sistema del complemento se realiza de manera diferente en cada vía. Por norma general, anticuerpos u otras proteínas como la “*mannose-binding lectin*” se unen a polisacáridos de membrana presentes en las bacterias, a partir de lo cual empieza a activarse la cascada, sea por una vía u otra. Estos polisacáridos no se encuentran de manera normal en las células de eucariotas así que son reconocidos como extraños y, por tanto, patogénicos, poniéndose en marcha el sistema del complemento.

Los objetivos de este sistema del complemento son principalmente dos:

- Marcar a la bacteria para que sea reconocida más fácilmente y fagocitada por células inmunitarias como macrófagos o neutrófilos (“opsonización”).
- Provocar la lisis directa del microorganismo, como se ha explicado, a través de la llamada vía lítica y el CAM.

Además, cabe destacar que muchas de las proteínas que forman parte del sistema del complemento tienen actividad inflamatoria y quimiotáctica cuando están activas. Esto tiene como resultado la atracción de leucocitos para ayudar a la defensa contra el microorganismo patógeno, así como de activación y reclutamiento de otros componentes inmunitarios destinados a derrotar la infección (Delves, et al., 2012).

2.3.1 Pseudomonas aeruginosa vs Sistema del complemento

Se ha visto que la mayor parte de las cepas de *P. aeruginosa* que provocan infecciones agudas son resistentes a la actividad normal del suero humano, que habitualmente se ha utilizado en investigación como marcador de la actividad del sistema del complemento (Martínez-Ramos,

et al., 2014; Pérez-Gallego, et al., 2016). También se ha observado que la mencionada resistencia al sistema del complemento no viene por un fallo en la activación de éste, sino por el fallo en el ensamblaje del complejo terminal (CAM) en la membrana de la bacteria. Esto provoca que, a pesar de que la cascada se active, el poro no se forme correctamente, y no se pueda producir la lisis directa de dicha bacteria (Schiller, 1988).

Cabe destacar que la vía clásica del complemento se inicia mediante la interacción de anticuerpos con antígenos presentes en la superficie bacteriana, mientras que la vía alternativa se inicia, en ausencia de anticuerpos, sobre todo mediante el reconocimiento de polisacáridos complejos presentes en las bacterias, como el antígeno O del LPS (Figura 2).

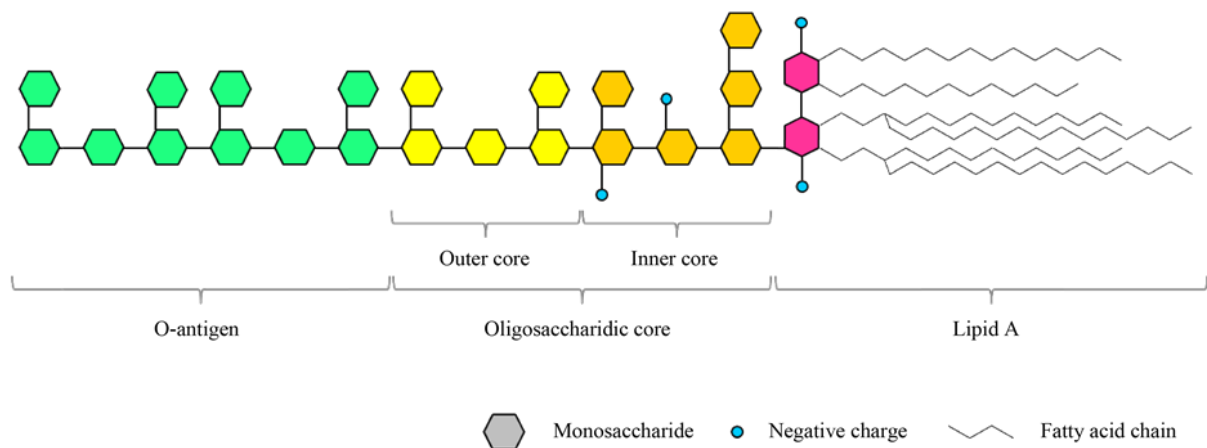


Figura 2: Representación esquemática del LPS en la que se pueden observar sus diferentes partes, incluyendo el antígeno O (Gemma, et al., 2016).

Aún así, las cepas de *P. aeruginosa* que provocan infecciones agudas, como neumonías o bacteriemias suelen ser muy resistentes al suero, a pesar de que presentan una gran cantidad de cadenas O (y además muy largas) en su LPS. Así, estas cepas, a pesar de activar la vía alternativa, serían resistentes al CAM probablemente gracias a las largas cadenas de antígeno O, que lo alejarían de la membrana, como se acaba de explicar. Además, cabe destacar que se trata de cepas no mucosas, y cuyo LPS se conocía clásicamente como *smooth* (liso) (Schiller, et al., 1989).

Por otro lado, las cepas de *P. aeruginosa* que se aíslan de pacientes con fibrosis quística son, de forma general, mucosas y deficientes en cadenas laterales O del LPS (o bien poseen cadenas O muy cortas). Su LPS se ha conocido clásicamente como *rough* (rugoso). Sin embargo, aunque esta carencia de cadena O sería compatible con una menor activación de la vía alternativa, estas cepas suelen ser bastante sensibles a la acción del CAM, probablemente activado por otras vías (Schiller, et al., 1989).

Estos hechos sugieren que las cepas de *P. aeruginosa* en fibrosis son sensibles al complemento porque éste no llega a afectarlas (merced a la pobre difusión en moco/alginato); así, la adaptación metabólica de *P. aeruginosa* al nicho ecológico de la fibrosis quística podría reducir su resistencia al complemento como contrapartida, sin que ello suponga consecuencias negativas para la viabilidad celular.

Se sabe que es imprescindible la participación del sistema del complemento para paliar infecciones agudas provocadas por *P. aeruginosa* en el pulmón. Experimentos realizados con ratones deficientes en este sistema presentan una mortalidad mayor así como una mayor susceptibilidad a sufrir daños broncoalveolares. Aun así, estos ratones no presentan una disminución en la inflamación, pues células como neutrófilos se encontraban presentes en el foco de infección de manera normal (Younger, et al., 2003).

Esto quiere decir que, aunque *P. aeruginosa* sea resistente a la lisis directa por el sistema del complemento, la función quimiotáctica de los diferentes compuestos sigue siendo efectiva. Es más, ésta es crucial para la supervivencia del huésped (Younger, et al., 2003), así como también lo es la presencia de neutrófilos, pues en modelos animales defectivos en este tipo de PMNs (neutropénicos) los efectos de la infección por *P. aeruginosa* han sido mucho más devastadores. Estos resultados también ponen de manifiesto la importancia de la anteriormente citada BPI en el contexto (Koh, et al., 2005; Koh, et al., 2009).

Todo ello indica la potencialidad de complemento y la BPI como armas útiles ante *P. aeruginosa* siempre que se hallen en las condiciones adecuadas, circunstancia de la cual podríamos aprovecharnos en un futuro como alternativa terapéutica. Es decir, si consiguiésemos hallar dianas atacables por fármacos que sensibilizasen a *P. aeruginosa* ante estos elementos, los rehabilitaríamos como aliados anti-pseudomónicos de gran capacidad.

3. Hipótesis y objetivos

Como se ha mencionado anteriormente, existen multitud de evidencias de que *P. aeruginosa* sufre una serie de cambios adaptativos durante los procesos de infecciones crónicas, como es la fibrosis quística. Esos cambios le otorgan ventajas para tener éxito en un ambiente tan particular como es el pulmón del paciente con fibrosis quística, en el que existe la mencionada mucosidad espesa y de elevada osmolaridad, que dificulta la disponibilidad de nutrientes, entre otros efectos. Por otra parte, esas condiciones tan particulares y el modo de vida en biofilm también dificultan el acceso de determinados componentes inmunitarios, lo cual posibilitaría, al menos en teoría, que las cepas de *P. aeruginosa*, al estar protegidas ante ellos, acumulasen adaptaciones que como efecto secundario aumentasen su sensibilidad (en el caso concreto de este trabajo ante complemento y/o BPI). Por ello, este trabajo tiene como objetivo analizar las diferencias que presentan cepas de *P. aeruginosa* provenientes de infección aguda (bacteriemia) y de infección crónica (fibrosis quística) en cuanto a resistencia a diferentes proteínas del sistema inmune innato, y así comprobar si la adaptación a largo plazo al nicho ecológico de la fibrosis quística (aislados iniciales vs aislados tardíos) produce cambios en los fenotipos de sensibilidad a estas proteínas. Por primera vez, se analizarán colecciones tan amplias de cepas clínicas de *P. aeruginosa* en cuanto a los mencionados parámetros, para analizar tendencias en la sensibilidad / resistencia en función de tipo de infección y evolución durante el proceso crónico.

4. Materiales y métodos

4.1 Colecciones bacterianas

Se usaron dos colecciones bacterianas de *P. aeruginosa*, una procedente de infección aguda (bacteriemia) y otra procedente de infección crónica (fibrosis quística). Como referencia se usaron dos cepas más: PAO1 y PA14, típicamente usadas como cepas tipo en la bibliografía.

La colección de fibrosis quística proviene de pacientes atendidos en el Hospital Universitario Son Espases (Palma de Mallorca) desde el año 2003 y se describe en el estudio llevado a cabo por López-Causapé y colaboradores en 2013 (López-Causapé, et al., 2013).

La colección se organizó por parejas de aislados isogénicos (es decir, cada pareja de aislados pertenecía a un mismo clon o cepa) obtenidos a lo largo de la infección crónica de cada paciente, mostrando cada pareja un intervalo de entre 3 y 8 años desde el aislado inicial hasta el aislado tardío. Se aisló de cada paciente una sola cepa a excepción de dos pacientes (12 y 21) a los que se les aislaron dos cepas diferentes (cada una con su aislado inicial/tardío). Cada cepa fue codificada de la siguiente forma: código numérico de cada paciente – año de aislamiento. En total se utilizaron 12 parejas de aislados.

Por otro lado, la colección de cepas de bacteriemia es proveniente de un estudio que se realizó entre 2008-2009 en el que participaron numerosos hospitales españoles, es decir, se trataba de un estudio multicéntrico (Cabot, et al., 2012, Mulet, et al., 2013). En total se usaron 12 cepas diferentes de este estudio, codificadas numéricamente.

Las cepas fueron conservadas en crioviales a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y, diariamente, fueron cultivadas en caldo LB (para realizar el experimento con la BPI) o en Agar LB (para realizar el experimento con el sistema del complemento). En el caso del caldo LB, las bacterias se cultivaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16 horas en agitación (180 rpm). Contrariamente, las bacterias sembradas en Agar LB se cultivaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en estático durante 16 horas.

4.2 Ensayo de supervivencia al sistema del complemento

En este ensayo se evaluó la muerte de las diferentes cepas bacterianas frente al sistema del complemento, tomando como representativo del mismo, al suero humano de donantes sanos.

Para realizarlo, las cepas se cultivaron en Agar LB y se resuspendieron en PBS con calcio y magnesio (Sigma) hasta conseguir una concentración bacteriana de 2×10^7 UFC/mL (Martínez-Ramos, et al., 2014; Pérez-Gallego, et al., 2016).

Después se mezclaron 80 μL de esta suspensión bacteriana con 40 μL de PBS con calcio y magnesio y 40 μL de suero humano o suero humano inactivado por calor (para inactivarlo se incubó previamente a $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos) en paralelo.

Ambas mezclas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos en estático y, posteriormente, se realizaron diluciones seriadas que fueron sembradas en placas de agar LB

o agar sangre (*Biomerieux*) para determinar la supervivencia de cada una de las cepas al sistema del complemento.

Para calcular la supervivencia de cada cepa, se cuantificó siempre el porcentaje respecto del tubo con suero inactivado. Además de las cepas experimentales, se usaron las cepas de referencia PAO1 y PA14 como control (Pérez-Gallego, et al., 2016). Los experimentos se realizaron por triplicado para cada cepa, mostrándose en los resultados el valor medio de los tres experimentos independientes.

4.3 Ensayo de supervivencia a la proteína inductora de la permeabilidad bacteriana (BPI)

Para realizar este ensayo se usó BPI comercial de la casa Sigma Aldrich, en un stock a una concentración de 100 µg/mL. El buffer que se usó estaba compuesto por 0.9 g de NaCl, 10 mL de Hank's balanced salt solution, 0.1 g de casaminoacids, 90 mL de H₂O destilada y 2 mL de Tris-HCl 2 M a pH 7.6, y fue autoclavado antes de los experimentos.

Las cepas bacterianas, tanto las experimentales como las control, se cultivaron en medio LB a 37 °C *overnight* en agitación (180 rpm). Posteriormente se hizo una dilución 1/20 en LB fresco y se midió la densidad óptica a 600 nm. A partir de los datos obtenidos se realizaron los cálculos pertinentes para disponer de 1x10⁶ bacterias.

En un *ependorf* se depositaron 20 µL de BPI (por tanto, se trabajó con una concentración final de aprox. 10 µg/ml) y 180 µL de buffer a los que posteriormente se añadieron los µL de bacterias calculados anteriormente, quedándonos un volumen de reacción aproximado de 205/210 µL. De esta mezcla se hicieron diluciones seriadas que fueron sembradas en placas de agar LB o agar sangre (*Biomerieux*).

Posteriormente, los tubos de reacción se dejaron incubar a 37 °C durante una hora en agitación (180 rpm). Pasada la hora, se hicieron otra vez diluciones seriadas para volver a sembrar en agar LB o agar sangre (*Biomerieux*).

Los cálculos de supervivencia se realizaron respecto de los recuentos obtenidos de los plaqu coastos de tiempo 0. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada cepa, mostrándose en los resultados el valor medio de los tres experimentos independientes.

4.4 Análisis estadístico

Tanto para el análisis estadístico como para la representación gráfica se usó el software *GraphPad Prism 5*. La representación gráfica de los resultados muestra la media junto a su valor de desviación estándar. La homogeneidad o heterogeneidad de las diferentes colecciones en la supervivencia frente a BPI/suero se calculó mediante un ANOVA de un factor (*One-way ANOVA*) y, posteriormente, en el caso de las cepas de fibrosis quística, se usó un *T-test* para comprobar si había diferencias significativas entre el aislado inicial/tardío de cada cepa.

También se usó un *T-test* pareado/desapareado de dos colas para analizar las diferencias entre las diferentes colecciones en la sensibilidad media (fibrosis quística aislado inicial-fibrosis quística aislado final/bacteriemia-fibrosis quística) a las diferentes proteínas inmunitarias testadas. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

5. Resultados

5.1 Ensayo de supervivencia al sistema del complemento

Para realizar el ensayo de supervivencia al sistema del complemento se usó suero humano, que se suele utilizar como marcador de su actividad bactericida.

Mediante un test ANOVA (*One-way ANOVA*) se determinó que tanto la colección bacteriana de fibrosis quística como la de bacteriemia son colecciones heterogéneas, es decir, las diferentes cepas de cada colección responden de manera diferente al sistema del complemento. En otras palabras, puede decirse que no hay una tendencia clara en los valores de supervivencia dentro de cada colección, sino que el conjunto de cepas aporta valores muy diferentes para constituir la media final.

Como podemos observar en la figura 3A, muchas de las cepas de fibrosis quística son bastante sensibles al suero, la mayoría de ellas presentan una supervivencia menor al 35% siendo destacable la sensibilidad de la pareja de aislados 6 o la 15. Por otro lado, algunas cepas, tales como la pareja 11, son excepcionalmente resistentes a la actividad del sistema del complemento, llegando a casi un 100% de supervivencia.

A parte del test ANOVA, se realizó un T-test de las diferentes parejas de aislados para saber si había diferencias significativas entre el aislado inicial y el tardío. Se asumió que las diferencias significativas eran aquellas que mostraban un $p\text{-valor} < 0,05$. Es destacable el caso de las parejas de aislados, 5 y 12 (tanto 12-146 como 12-299). Mientras que en el aislado 5 se ve una disminución de la resistencia significativa entre el aislado inicial y el tardío, en los aislados 12 se ve lo contrario, un aumento significativo de la resistencia.

En cuanto a la cepas de bacteriemia, como se puede ver en la figura 3B, muchas de las cepas son muy resistentes al suero, presentando más de la mitad de ellas un 100% de supervivencia o más. Además, todas las cepas a excepción de la 12 presentan una supervivencia mayor al 50%. Es destacable, sin embargo, la alta sensibilidad de la cepa 12 al sistema del complemento, puesto que presenta un porcentaje de supervivencia muy bajo, menor al 10%.

En cuanto a la comparación de colecciones bacterianas, es destacable que las cepas de fibrosis quística son significativamente más sensibles al suero. El análisis se realizó mediante un T-test despareado y, tanto la comparación de las cepas bacterianas con las cepas de fibrosis quística iniciales como la comparación de las cepas de bacteriemia con las cepas de fibrosis quística tardías, mostraron un $p\text{-valor} < 0,05$. En la figura 3C se puede observar este hecho. Por otra parte, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas iniciales vs tardías de fibrosis quística ($p\text{-value} > 0,05$ test T de Student pareado).

5.2 Ensayo de supervivencia a la BPI

Para realizar este ensayo se usó, como se ha indicado anteriormente, BPI comercial. En primer lugar se analizó, mediante un ANOVA (*one way ANOVA*), la heterogeneidad de las diferentes colecciones bacterianas. Se pudo comprobar que, tanto la colección de fibrosis quística como la de bacteriemia, son colecciones heterogéneas cosa que indica que las diferentes cepas en cada colección responden de manera diferente a la BPI.

Observando las cepas de fibrosis quística, vemos en la figura 4A que muchas de las ellas muestran una supervivencia mayor al 60%. Aun así, destaca la cepa 5, en la que tanto el aislado inicial como el final presentan una supervivencia cercana al 0%; y la cepa 6 cuyo aislado inicial presenta una supervivencia menor al 10%. Añadir que, en este caso, sólo 9 de las 12 parejas de los aislados de fibrosis pudieron ser evaluadas, por cuestiones de disponibilidad de tiempo.

En cuanto a las cepas de bacteriemia, la mayor parte de ellas presentaron una supervivencia mayor al 50%. De esta colección destacan la cepa 142 y 181 que presentan una supervivencia mayor al 100%; así como la cepa 19 y la 43 que presentan una supervivencia menor al 25% (figura 4B).

Finalmente, en cuanto a la comparación de colecciones bacterianas, se realizó un T-test asumiendo como significativamente diferentes aquellas colecciones que presentaban un p-valor < 0,05. Tal y como se puede comprobar en la figura 4C, ninguna de las colecciones bacterianas presenta diferencias significativas entre sí.

6. Discusión

6.1 Ensayo de supervivencia al sistema del complemento

Como se ha mencionado en la introducción, se acepta que las cepas de fibrosis quística son, por norma general, más sensibles a la acción del sistema del complemento (Schiller, et al., 1989). Esto es debido a que suelen presentar un LPS deficiente en cadenas O, que si bien parecen ser menos activadoras de la vía alternativa, parece reducir la resistencia ante la lisis por el CAM activado por las otras vías (Schiller, et al., 1989). Además, a medida que el proceso de infección se va haciendo crónico, las cepas adoptan toda una serie de cambios que ayudan a la bacteria a una mejor adaptación (Balasubramanian, et al., 2015). Es posible que el hecho de adquirir estas adaptaciones haga que estas cepas pierdan otras características, como las que les confieren resistencia al sistema del complemento puesto que, en el pulmón con fibrosis, no necesitan de esta resistencia para sobrevivir (al quedar protegidas por moco y alginato). De este modo, las cepas de fibrosis quística serían sensibles a la acción del sistema del complemento, hecho visualizable en los ensayos *in vitro* realizados.

Nuestros resultados concuerdan bastante con estas ideas, si bien es cierto que en otros trabajos, aunque con un menor número de cepas estudiadas, la sensibilidad media al complemento se mostró mayor que en nuestro estudio. De hecho, es interesante remarcar el alto número de cepas que hemos incluido en este trabajo, pues nunca antes se habían estudiado colecciones tan amplias en relación a los parámetros aquí analizados.

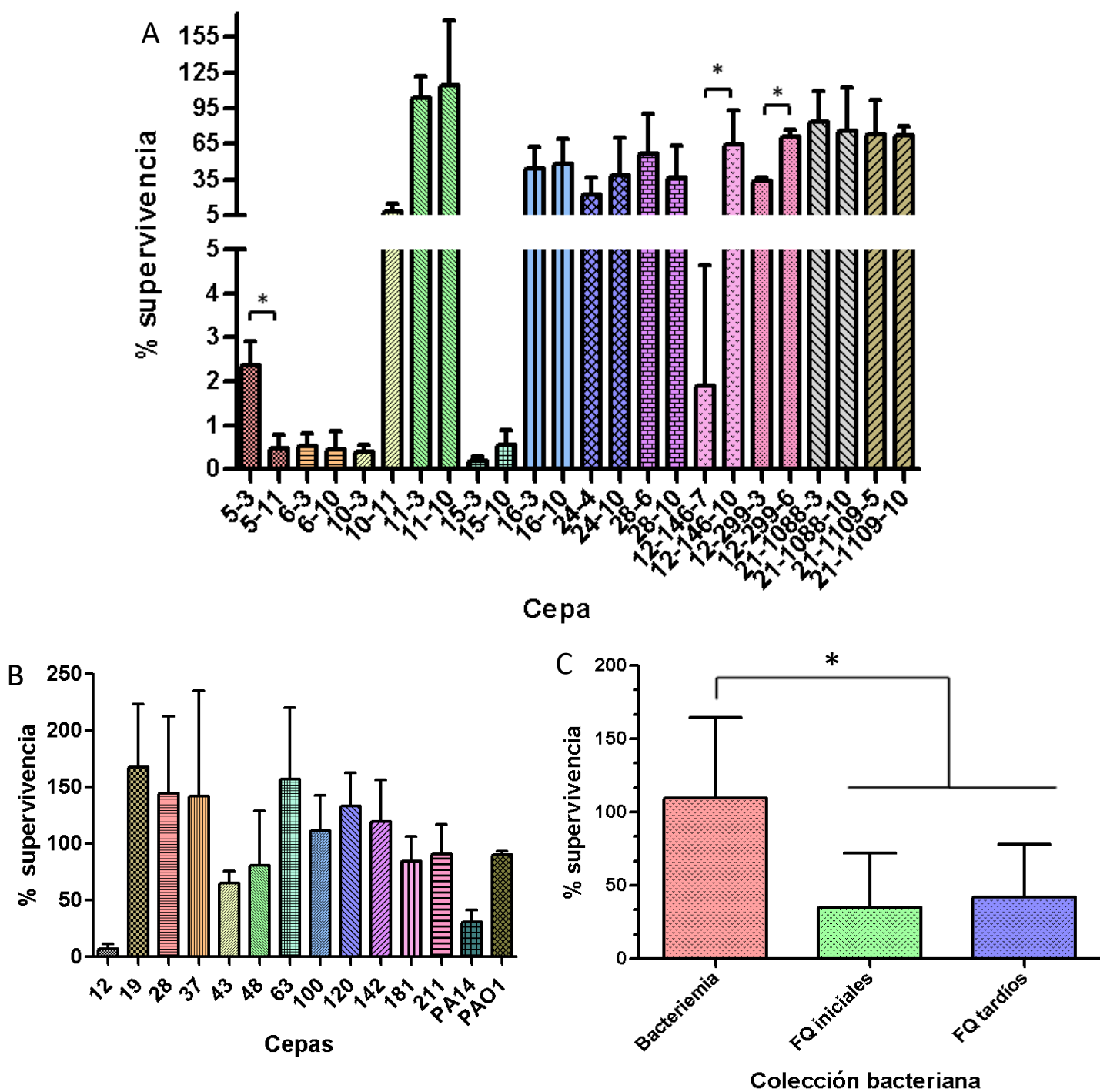


Figura 3: Supervivencia al sistema del complemento de cepas de fibrosis quística (A), bacteriemia (B). Comparación entre las medidas de supervivencia de las diferentes colecciones (C). * Estadísticamente significativo: p -value < 0.05 en el test T de Student.

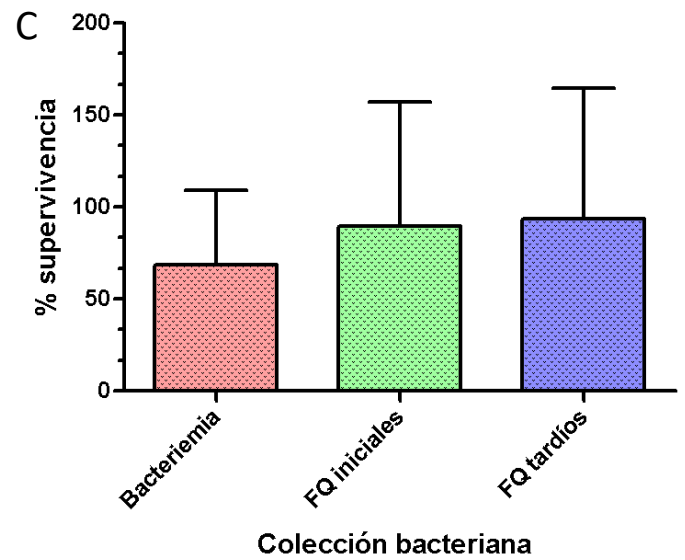
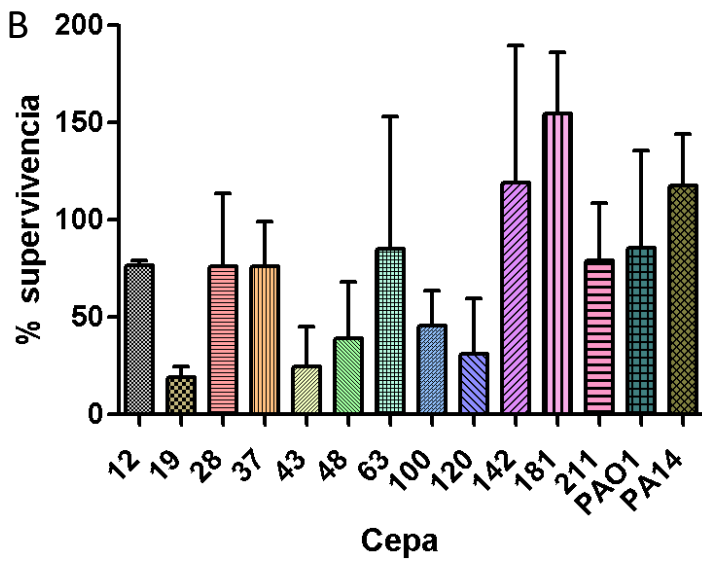
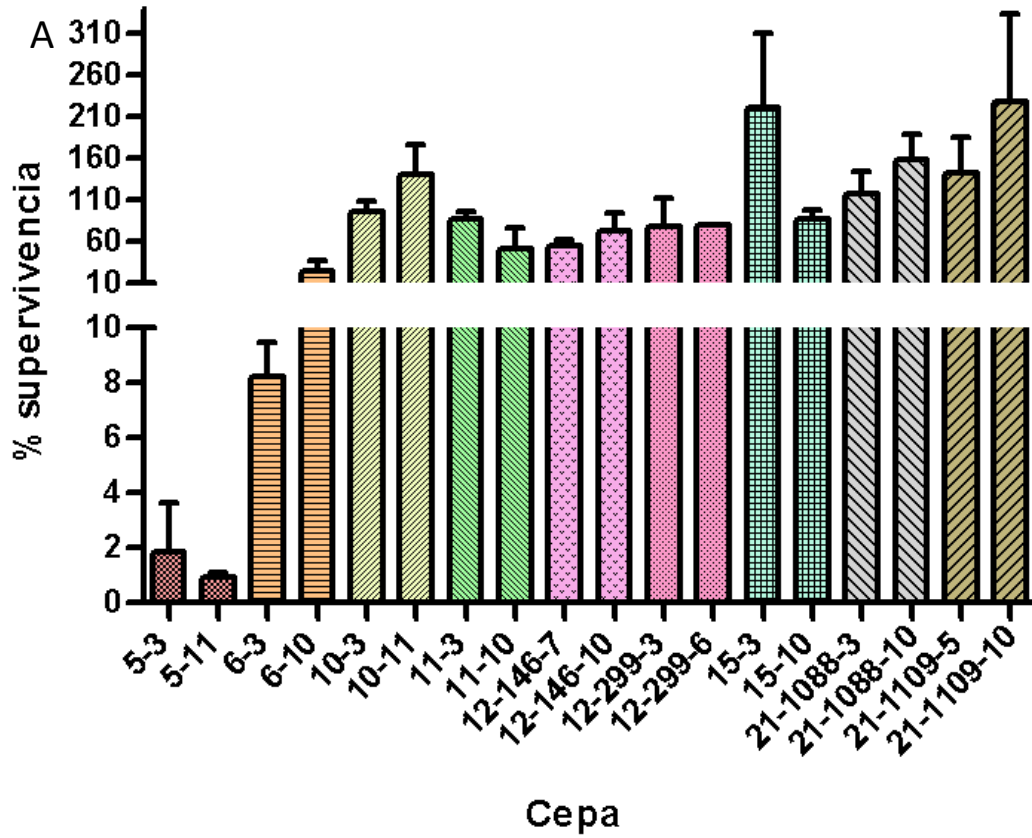


Figura 4: Supervivencia a la proteína inductora de la permeabilidad bacteriana (BPI) de cepas de fibrosis quística (A), bacteriemia (B). Comparación entre las medidas de supervivencia de las diferentes colecciones (C). * Estadísticamente significativo: p -value < 0.05 en el test T de Student.

No obstante, es importante destacar que las cepas teóricamente van sufriendo los cambios a medida que avanza la infección crónica, así que los aislados tardíos deberían ser más sensibles a la acción del sistema del complemento que los aislados iniciales. Este hecho no se observa de manera clara en los resultados obtenidos en este trabajo. Una posible explicación sería que, al recoger las muestras tardías de nuestro estudio, las cepas aún no hubieran acumulado las mutaciones responsables del cambio fenotípico esperado o, por el contrario, cuando los dos aislados se mostraron sensibles, quizás el aislado inicial ya había acumulado las mutaciones responsables del incremento de sensibilidad.

Por otra parte, no hay que olvidar que estos fenómenos son sólo observaciones en general, tendencias que ocurren con cierta frecuencia; la bibliografía no afirma que en el 100% de los casos, las cepas procedentes de fibrosis deban ser más sensibles al complemento. Quizás el nivel de complemento (concentración) en las secreciones mucosas de cada paciente, que no es constante en la población, menos aún si hablamos de fibrosis quística, sea el factor definitivo que marque la necesidad o no de la cepa de hacerse resistente al CAM.

En cuanto a las cepas de bacteriemia, se ha observado que presentan una resistencia estadística y significativamente mayor a la que presentan las cepas de fibrosis quística. Como ya se ha comentado, las cepas de bacteriemia suelen presentar un gran número de cadenas O en su LPS que las hace resistentes a la acción del sistema del complemento (Schiller, et al., 1989). Es normal que se dé esta resistencia ya que, si no se produjera, las cepas no llegarían a provocar una infección, el sistema del complemento las mataría antes en sangre, como es obvio. Por eso, es particularmente llamativo, por lo excepcional, el caso de la cepa 12 de bacteriemia, por su gran sensibilidad.

Algunas hipótesis podrían explicar cómo una cepa tan sensible es capaz de causar una bacteriemia: quizás, al tratarse de un estudio multicéntrico con la participación de muchos trabajadores diferentes, podría haberse dado el caso de una contaminación con una cepa de *P. aeruginosa* sensible al suero, que realmente no fuese la que causó la bacteriemia; otra idea plausible es que esta cepa procediese de un paciente con algún tipo de inmunodeficiencia primaria del complemento, lo que habilitaría a una cepa sensible al mismo para causar una bacteriemia.

Alternativamente, quizás mecanismos no visualizables en el ensayo realizado *in vitro*, pero sí activos *in vivo*, podrían proteger a esta cepa ante la acción del complemento en el paciente original. En cualquier caso, futuros estudios serían necesarios para esclarecer este llamativo fenotipo de la cepa 12.

6.2 Ensayo de supervivencia a BPI

En contra de lo que sugiere la bibliografía, nuestras cepas, tanto de fibrosis como de bacteriemia, se mostraron bastante resistentes a la acción de la BPI. No obstante, puede tratarse de un artefacto, pues las condiciones del ensayo *in vitro*, el buffer en el que se halla disuelta la BPI comercial, su conservación, etc... podrían influir negativamente en su actividad.

Teniendo en cuenta estos factores, las cepas de fibrosis quística de nuestro estudio son, de manera general, bastante resistentes a los efectos de la BPI. Si sumamos que la BPI funcionaba correctamente, esto quizás es debido a muchas de las adaptaciones que sufren las cepas durante el curso de la infección crónica que provocan que la bacteria se vuelva resistente a múltiples componentes del sistema inmune. A este hecho ayudaría la presencia de moco espeso en los pacientes que padecen fibrosis quística.

Otro de los principales motivos por los que *P. aeruginosa* se volvería resistente al efecto de la BPI es la forma de vida que adopta, en forma de biofilm gracias a la sobreproducción de alginato, haciendo que la proteína no sea capaz de unirse al LPS y realizar su función (Lorè, et al., 2012). Sin embargo, hay que tener en cuenta que, al ser un ensayo *in vitro*, en nuestro estudio estos factores no tendrían por qué influir en el resultado, sino más bien todo lo contrario; así pues, sería más lógico que las cepas, ya sin esa protección de carácter físico, se mostrasen muy sensibles *in vitro*, cosa que no observamos.

Así pues, es más plausible pensar que factores como los que hemos mencionado al principio de este punto (causando una reducida actividad de la BPI comercial), son los que sustentan los resultados obtenidos. Otra alternativa serían datos adicionales que aporta la bibliografía: la resistencia a la BPI también puede ser por un cambio en el LPS que hace que la proteína ya no sea afín para éste, que no se una y que no provoque poros en la membrana de la bacteria (Holweg, et al., 2011). Como consecuencia, *P. aeruginosa* permanecería en el pulmón de los pacientes de fibrosis quística durante largos periodos de tiempo.

No obstante, si esto fuese cierto, reduciría la importancia que otros trabajos dan a una resistencia mediada por la pobre difusión a través de moco/alginato, sugiriendo por tanto que esta proteína sí atacaría a las cepas durante la fibrosis.

En cuanto a las cepas de bacteriemia, se ha visto en nuestros resultados que, aunque no son estadística y significativamente más sensibles a la BPI que las cepas de fibrosis quística, sí que presentan una tendencia a serlo. Esto quizás es debido a que *P. aeruginosa* en fibrosis sí que realmente necesita adaptarse a resistir la acción de la BPI más allá de una presunta reducción de la difusión a través de moco/alginato.

Es destacable la especialmente elevada sensibilidad de la pareja 5 de fibrosis quística, tanto a los efectos del complemento como a los de la BPI, coincidencia que no se observó (al menos de manera tan clara) en ninguna otra cepa / pareja en el presente estudio.

7. Conclusiones

A falta de conocer las bases genéticas responsables, parece clara una mayor sensibilidad de las cepas de fibrosis quística al complemento, en comparación con las cepas de bacteriemia (lo cual cuadra con la bibliografía clásica), al contrario de lo que ocurre con la sensibilidad ante la BPI, bastante baja en ambas colecciones (a excepción de ciertas cepas puntuales).

Los resultados obtenidos parecen arrojar nuevas ideas en relación a la actividad de la BPI *in vivo* en la fibrosis: *P. aeruginosa* necesitaría acumular mutaciones que la hagan resistente, más allá de la presunta acción protectora de moco / alginato (asumiendo un correcto funcionamiento de nuestra BPI).

Sería interesante ahondar en las bases genéticas responsables de la aumentada sensibilidad de algunas de las cepas (bacteriemia 12, pareja 5 de fibrosis, etc.), para descubrir nuevas dianas que, una vez atacadas, causasen un incremento drástico en la sensibilidad ante complemento / BPI. Si podemos identificar esas dianas y, en el futuro se diseñan fármacos que las ataquen, sensibilizaríamos drásticamente a *P. aeruginosa* ante elementos inmunes de los que ya disponemos, como complemento y BPI, rehabilitándolos como potentes aliados defensivos en el contexto de infecciones por *P. aeruginosa*, sobre todo agudas, en las que la bacteria no dispone de protección por moco / alginato (como sí ocurre en la fibrosis).

8. Referencias

Balasubramanian Deepak, Kumari Hansi and Mathee Kalai Pseudomonas aeruginosa AmpR: an acute–chronic switch regulator [Journal]. - [s.l.] : Pathogens and disease, 2015.

Ben Haj Khalifa A [et al.] Virulence factors in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and modes of regulation [Journal]. - [s.l.] : Annales de biologie clinique, 2011.

Cabot Gabriel [et al.] Genetic Markers of Widespread Extensively Drug-Resistant Pseudomonas aeruginosa High-Risk Clones [Journal]. - [s.l.] : Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012.

Cantón Rafael [et al.] Consenso español para la prevención y el tratamiento de la infección bronquial por Pseudomonas aeruginosa en el paciente con fibrosis quística [Journal]. - [s.l.] : Archivos de Bronconeumología, 2014.

Charles M P [et al.] Ventilator-associated pneumonia [Journal]. - [s.l.] : The Australasian medical journal, 2014.

Cigana C [et al.] Pseudomonas aeruginosa exploits lipid A and mucopeptides modification as a strategy to lower innate immunity during cystic fibrosis lung infection [Journal]. - [s.l.] : PLoS One, 2009.

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

Delves Peter J [et al.] Roitt's Essential Immunology, 12th edition [Book]. - [s.l.] : Wiley-Blackwell, 2012.

Evans T J Small colony variants of Pseudomonas aeruginosa in chronic bacterial infection of the lung in cystic fibrosis [Journal]. - [s.l.] : Future Microbiol., 2015.

Gemma Sabrina, Molteni Monica and Rossetti Carlo Lipopolysaccharides in Cyanobacteria: A Brief Overview [Journal]. - [s.l.] : Advances in Microbiology, 2016.

Holweg Alexander, Schnare Markus and Gessner André The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in the innate defence of the lower airways [Journal]. - [s.l.] : Biochemical Society Transactions, 2011.

Hraiech Sami, Brégeon Fabienne and Rolain Jean-Marc Bacteriophage-based therapy in cystic fibrosis-associated *Pseudomonas aeruginosa* infections: rationale and current status [Journal]. - [s.l.] : Drug Desigf, Development and Therapy, 2015.

Koh A Y [et al.] Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia [Journal]. - [s.l.] : Infection and Immunity, 2009.

Koh A Y, Priebe G P and Pier G B Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of gastrointestinal colonization and dissemination in neutropenia [Journal]. - [s.l.] : Infection and Immunity, 2005.

López-Causapé Carla [et al.] Clonal Dissemination, Emergence of Mutator Lineages and Antibiotic Resistance Evolution in *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Chronic Lung Infection [Journal]. - [s.l.] : Public Library of Science, 2013.

Lorè Nicola Ivan [et al.] Cystic Fibrosis-Niche Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* Reduces Virulence in Multiple Infection Hosts [Journal]. - [s.l.] : Plos one, 2012.

Lovewell Rustin R, Patankar Yash R and Berwin Brent Mechanisms of phagocytosis and host clearance of *Pseudomonas aeruginosa* [Journal]. - [s.l.] : American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology, 2014. - Vol. 306 (7).

Mahenthiralingam E, Campbell M E and Speert D P Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis [Journal]. - [s.l.] : Infection and Immunity, 1994.

Mahon Connie R and Manuselis Jr George Textbook of Diagnostic Microbiology [Book]. - Philadelphia, Pennsylvania : W.B. Saunders Company, 1995.

Mannion B A [et al.] Preferential binding of the neutrophil cytoplasmic granule-derived bactericidal/permeability increasing protein to target bacteria. Implications and use as a means of purification [Journal]. - [s.l.] : Journal of immunology, 1989.

Martínez-Ramos Inmaculada [et al.] Overexpression of MexCD-OprJ Reduces *Pseudomonas aeruginosa* Virulence by Increasing Its Susceptibility to Complement-Mediated Killing [Journal]. - [s.l.] : Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014.

Morita Yuji, Tomida Junko and Kawamura Yoshiaki Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials [Journal]. - [s.l.] : Frontiers in Microbiology, 2014.

Mulet Xavier [et al.] Biological Markers of *Pseudomonas aeruginosa* Epidemic High-Risk Clones [Journal]. - [s.l.] : Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013.

Pérez-Gallego Marcelo [et al.] Impact of AmpC Derepression on Fitness and Virulence: the Mechanism or the Pathway? [Journal]. - [s.l.] : mBio, 2016.

Rimoin, Pyeritz and Korf Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics [Book]. - Philadelphia : Elsevier, 2013.

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

Schiller Characterization of the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to complement-mediated killing: role of antibodies to the rough lipopolysaccharide on serum-sensitive strains. [Journal]. - [s.l.] : Infection and Immunity, 1988. - Vol. 56 (3).

Schiller Neal L, Hatach Richard A and Joiner Keith A Complement Activation and C3 Binding by Serum-Sensitive and [Journal]. - [s.l.] : Infection and immunity, 1989.

Valentini Martina and Filloux Alain Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria [Journal]. - [s.l.] : Journal of biological chemistry, 2016.

Weiss J [et al.] The role of lipopolysaccharides in the action of the bactericidal/permeability-increasing neutrophil protein on the bacterial envelope [Journal]. - [s.l.] : Journal of immunology, 1984.

Younger John G [et al.] Murine Complement Interactions with *Pseudomonas aeruginosa* [Journal]. - [s.l.] : Am J Respir Cell Mol Biol, 2003.